

# TRATTAMENTO TERMICO DEI DERIVATI NON CONCENTRATI DEL POMODORO

Giuseppe Pirone, Maria Paola Previdi, Liliana La Pietra, Giuseppe Dipollina

I processi industriali di sterilizzazione termica delle conserve alimentari hanno come scopo la stabilizzazione microbiologica ed enzimatica dei prodotti, al fine di permetterne la conservazione a temperatura ambiente e quindi il consumo differito.

La stabilità microbiologica delle conserve alimentari è condizionata dall'efficacia dei trattamenti termici applicati, dall'ermeticità dei contenitori e dalle temperature di conservazione. L'alterazione di una conserva alimentare, quindi, è conseguenza di un trattamento termico inefficace, di un'insufficiente ermeticità dei contenitori o di un raffreddamento delle confezioni non idoneo e/o del loro magazzinaggio a temperature elevate.

Nel primo caso, una frazione della popolazione microbica sopravviverà e si svilupperà nel prodotto; nel secondo caso, microrganismi presenti nell'ambiente esterno (acqua di raffreddamento, aria, superfici ecc.) penetreranno nei contenitori e inquineranno l'alimento. Il permanere delle confezioni a temperature elevate può causare l'accrescimento dei batteri termofili sopravvissuti al trattamento termico (1-4).

La stabilizzazione microbiologica di un prodotto sterilizzato deve essere valutata in termini di probabilità di sopravvivenza dei microrganismi presenti prima del trattamento termico. Non è possibile, infatti, ottenere la sterilità assoluta di una popolazione microbica attraverso trattamenti termici poiché l'inattivazione dei microrganismi con il calore segue una legge esponenziale (1, 2, 5-8).

Per questi motivi è stato introdotto il concetto di "sterilità commerciale" che è ottenuta quando la probabilità di sopravvivenza dei microrganismi capaci di accrescersi nel prodotto considerato e, quindi, la possibilità di alterazione della conserva alimentare, viene ridotta a livelli considerati accettabili.

L'entità del trattamento termico necessaria per stabilizzare microbiologicamente un alimento conservato può essere definita quando si conoscono:

- 1) la termoresistenza ( $D_T$  e  $z$ ) nello stesso substrato del microrganismo più termoresistente che può contaminarlo e che è in grado di accrescersi;
- 2) la concentrazione reale o presunta delle cellule (o spore) di tale microrganismo.

Deve essere, inoltre, definita la probabilità di sopravvivenza accettabile in termini di "probabilità di unità non sterile" (PNSU), intesa anche come determinazione del punto finale (*endpoint*) del processo industriale di sterilizzazione termica (6, 9).

Si definisce "effetto sterilizzante" o "effetto letale" il tempo richiesto a una data temperatura di riferimento per ottenere una definita inattivazione microbica (2, 5-8).

Il trattamento termico conseguente deve essere, quindi, sufficiente a garantire per il prodotto considerato il conseguimento della sterilità commerciale.

L'effetto sterilizzante o effetto letale può essere calcolato utilizzando la seguente formula (10, 11):

$$F_z^T = D_T \times (\text{Log } N_0 - \text{Log } N_F) = D_T \times n$$

dove:

- ▶  $D_T$  = tempo di riduzione decimale del microrganismo di riferimento da inattivare (tempo necessario a inattivare, alla temperatura costante  $T$ , il 90% delle cellule o spore microbiche inizialmente esistenti);
- ▶  $z$  = intervallo di variazione della temperatura di mantenimento  $T$ , per il quale il valore  $D_T$  aumenta o diminuisce di 10 volte;
- ▶  $N_0$  = concentrazione microbica iniziale determinata o presunta;
- ▶  $N_F$  = probabilità di sopravvivenza considerata accettabile (PNSU);
- ▶  $n$  = numero di riduzioni decimali conseguenti.

Per calcolare l'effetto sterilizzante o letale da impartire a un alimento è necessario quindi individuare il microrganismo di riferimento.

A tale proposito i prodotti alimentari conservati sono suddivisi in base ai valori di pH, in relazione alla diversa capacità di sviluppo e alla differente termoresistenza dei microrganismi in funzione di questo parametro: "acidi" con  $\text{pH} \leq 4,60$  e "non acidi" con  $\text{pH} > 4,60$  in relazione alla diversa capacità di sviluppo e alla differente termoresistenza dei microrganismi in funzione di questo parametro (1, 7, 12, 13).

Ai due gruppi così differenziati vengono impartiti trattamenti termici di diversa entità.

Per le conserve alimentari aventi  $\text{pH} \leq 4,60$  il trattamento termico viene effettuato a temperature, in genere, non superiori a  $100^\circ\text{C}$ ; esso ha lo scopo d'inattivare le spore (oltre che le cellule) dei microrganismi di alterazione, capaci, cioè, di svilupparsi ai bassi valori di pH ma non le spore dei microrganismi non in grado di germinare in tali ambienti acidi. Alle conserve alimentari con  $\text{pH} > 4,60$  viene applicato il trattamento termico di sterilizzazione, più intenso, che ha lo scopo d'inattivare tutte le spore presenti nel prodotto in quanto potenzialmente in grado di svilupparsi in esso poiché il valore di pH non ha funzione inibitoria della germinazione sporale; tutte le cellule vegetative, naturalmente, saranno inattivate data la loro minore resistenza termica (5-7, 13, 14).

L'impiego di diversi trattamenti termici è dovuto fondamentalmente alla diversa possibilità di sviluppo, in funzione del valore di pH, del batterio patogeno *Clostridium botulinum*, microrganismo di enorme rilevanza sanitaria in quanto responsabile di intossicazioni letali dovute all'ingestione di neurotossine prodotte in seguito allo sviluppo del batterio nell'alimento. Dati scientifici attestano che il pH minimo inibente lo sviluppo (germinazione) di spore di *C. botulinum* è pari a 4,60 (15-18).

Altro parametro che influenza l'entità dei trattamenti termici è il valore di  $a_w$  (attività dell'acqua); al di sotto del valore 0,90 non si verifica, nella generalità dei casi, germinazione sporale (19-21).

L'effetto sterilizzante  $F_z^T$  è usualmente calcolato a temperature di riferimento T di  $85$  o  $95^\circ\text{C}$  per le conserve alimentari (compreso derivati del pomodoro molto acidificati) con  $\text{pH} < 4,2$  e per il concentrato di pomodoro, di  $100^\circ\text{C}$  per le conserve alimentari aventi  $4,2 \leq \text{pH} < 4,6$  e alla temperatura di  $121^\circ\text{C}$  per le conserve alimentari con  $\text{pH} > 4,6$  (22).

Nelle conserve di derivati non concentrati del pomodoro ( $4,2 \leq \text{pH} < 4,6$ ) possono svilupparsi alcuni microrganismi poco resistenti al calore quali batteri lattici, enterobatteri, lieviti e muffe e alcune specie di batteri sporigeni quali "clostridi butirrici" (*Clostridium pasteurianum*, *C. butyricum*, *C. acetobutylicum*, ecc.), *Bacillus coagulans* e, più raramente, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus polymyxa*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* e *Alicyclobacillus acidocaldarius* (3, 4, 13, 14, 22-30).

Le cellule vegetative, nella maggior parte dei casi, sono inattivate rapidamente già a temperature intorno a  $60-65^\circ\text{C}$ : i valori di  $D_{65-60}$  sono prossimi a 1-5 minuti (5, 7).

Le specie di *Bacillus* e di *Clostridium* mesofili che possono svilupparsi nei prodotti acidi, pur formando spore provviste di valori di resistenza termica inferiori a quelli di altre specie appartenenti agli stessi generi, sono tuttavia resistenti a trattamenti con temperature prossime a  $100^\circ\text{C}$  (2, 3, 7, 13, 14, 23, 24). La stabilizzazione dei prodotti acidi non concentrati può essere ottenuta soltanto inattivando o inibendo le spore di tali batteri.

I derivati non concentrati del pomodoro, e soprattutto i pomodori pelati, sono soggetti con una certa frequenza all'alterazione da clostridi butirrici che si manifesta con evidente gonfiaggio dei contenitori, diminuzione del pH, produzione di acido butirrico e sviluppo di odori anomali.

Il tempo di riduzione decimale delle spore di *C. pasteurianum* (il più termoresistente fra i clostridi butirrici) in succo di pomodoro a  $\text{pH} = 4,5$  (con conteggio delle spore sopravvivenenti in terreno colturale allo stesso pH) è pari a 0,65 minuti a  $100^\circ\text{C}$ , con  $z = 10^\circ\text{C}$  (31).

La contaminazione massima riscontrata nei pomodori freschi è di circa  $10^4$  spore per grammo (32).

La stabilizzazione termica dei pomodori pelati e prodotti analoghi richiede quindi l'applicazione di tempi e temperature che tengano conto della contaminazione massima del prodotto fresco e della probabilità finale di alterazione ritenuta accettabile.

Nella pratica industriale, al valore di pH pari a 4,5, accettando una probabilità di alterazione  $N_f$  di 1 su  $10^5$  contenitori ( $10^{-5}$ ) da g 400 avremo:

$$F_{100}^{10} = 0,65' \times [\log(10^4 \times 4 \cdot 10^2) - \log 10^{-5}] = 0,65' \times [\log(4 \cdot 10^6) - \log 10^{-5}] = 0,65' \times 11,6 = 7,5'.$$

In definitiva, un'elevata stabilità microbiologica/sterilità commerciale è ottenuta con trattamenti termici il cui effetto letale è:

$$F_{100}^{10} \geq 7,5 \text{ minuti.}$$

Oppure, nel caso di contenitori da g 800:

$$F_{100}^{10} = 0,65' \times [\log (10^4 \times 8 \cdot 10^2) - \log 10^{-5}] = 0,65' \times [\log (8 \cdot 10^6) - \log 10^{-5}] = 0,65' \times 11,9 = 7,7'.$$

In definitiva, un'elevata stabilità microbiologica/sterilità commerciale è ottenuta con trattamenti termici il cui effetto letale è:

$$F_{100}^{10} \geq 7,7 \text{ minuti.}$$

Nel calcolo effettuato, il valore massimo di contaminazione da spore di clostridi butirrici considerato è da ritenersi elevato, essendo riscontrabile in situazioni non idonee di trasporto e di sosta del pomodoro fresco conferito; il miglioramento dei sistemi di raccolta e di trasporto può diminuire il livello massimo d'inquinamento microbiologico e, di conseguenza, è possibile diminuire l'entità dell'effetto sterilizzante.

La possibilità di germinazione delle spore e quindi dell'instaurarsi dell'alterazione dipende, inoltre, dal pH all'equilibrio del prodotto finito; la probabilità di sviluppo sporale diminuisce, infatti, al diminuire del valore di pH. In letteratura è stata riportata una diminuzione della probabilità di germinazione sporale di 100 volte per ogni diminuzione di pH di 0,1 unità del prodotto confezionato (33); applicando un principio di precauzione si può considerare, più prudentemente, una diminuzione della probabilità di 10 volte per ogni diminuzione di pH di 0,1 unità.

È quindi possibile diminuire l'entità dell'effetto letale in funzione del pH all'equilibrio del prodotto.

Per esempio, portare il valore di pH del prodotto in maniera accurata e omogenea a 4,30 equivale a ridurre di 2 ordini di grandezza la popolazione iniziale; queste riduzioni decimali "equivalenti" possono essere sommate a quelle fornite dal trattamento termico.

Si riporta di seguito la formula di calcolo dell'effetto sterilizzante per un derivato di pomodoro a pH = 4,30 in cui, tenendo conto della ridotta probabilità di germinazione a tale pH, il grado di inquinamento sporale considerato è  $10^2/g$  anziché  $10^4/g$ .

Per confezioni da g 400:

$$F_{100}^{10} = 0,65' \times [\log (10^2 \times 4 \cdot 10^2) - \log 10^{-5}] = 0,65' \times [\log (4 \cdot 10^4) - \log 10^{-5}] = 0,65' \times 9,6 = 6,2 \text{ minuti.}$$

Per confezioni da g 800:

$$F_{100}^{10} = 0,65' \times [\log (10^2 \times 8 \cdot 10^2) - \log 10^{-5}] = 0,65' \times [\log (8 \cdot 10^4) - \log 10^{-5}] = 0,65' \times 9,9 = 6,4 \text{ minuti.}$$

Fra le specie sopra indicate, il batterio più termoresistente fra quelli che possono alterare i derivati non concentrati del pomodoro per trattamento termico non sufficiente è il *B. coagulans* (*termofilo-mesofilo facoltativo*), responsabile del flat-sour, alterazione con diminuzione del pH ma nessuno o limitatissimo sviluppo di gas e sviluppo di odori anomali (*medicinale - fenolico*) (1, 19, 26, 30, 34-38). I livelli di contaminazione del pomodoro fresco presentano un'elevata variabilità (da 0 a  $1,8 \cdot 10^3$  spore/g), ma si può assumere come livello massimo più probabile ( $p = 0,95$ ) quello di  $5,5 \cdot 10^2$  spore/g (39).

Riguardo la resistenza al calore di spore di *B. coagulans*, essa è stata, recentemente, determinata su sei ceppi, responsabili di alterazione di conserve di pomodoro per flat-sour, in succo di pomodoro a pH pari a 4,3 e 4,5 e conteggio delle spore sopravvivenenti in terreno colturale allo stesso pH (40).

A pH = 4,5 il tempo di riduzione decimale più alto a 100°C, è risultato essere di 0,79 minuti ( $D^{100} = 0,79'$ ); a pH 4,3 il valore massimo di  $D^{100}$  è risultato 0,58 minuti ( $D^{100} = 0,58'$ ).

A pH = 4,3 calcoliamo, rispetto a *B. coagulans*, un valore di  $F_{100} = 6,0$  minuti, applicando al formato g 400 la formula  $F_T^Z = DT \times (\log N_0 - \log N_T)$  con il valore massimo di  $D_{100}$  riscontrato e con una probabilità finale massima di alterazione da *B. coagulans* (*PNSU probabilità di unità non sterile*) di 1 confezione su  $10^5$  ovvero  $10^{-5}$ .

A pH pari a 4,3 il valore  $F_{100} = 6,2$  minuti, precedentemente calcolato per *C. pasteurianum* è pertanto sufficiente anche verso *B. coagulans* con *PNSU* di  $10^{-5}$ .

A pH = 4,5 invece calcoliamo, rispetto a *B. coagulans*, un  $F_{100} = 8,2$  minuti, con *PNSU* di  $10^{-5}$ ; tale valore dell'effetto sterilizzante necessario è, seppur di poco, superiore a quello calcolato per *C. pasteurianum* con la stessa probabilità finale di alterazione.

A pH pari a 4,5 il valore di  $F_{100} = 7,5$  minuti calcolato per *C. pasteurianum* in derivati del pomodoro è efficace anche verso *B. coagulans*, accettando  $10^{-4}$  come *PNSU* per quest'ultimo.

Analoghe considerazioni, a entrambi i valori di pH, possono essere fatte per il formato da g 800. Bisogna, comunque, considerare che le alterazioni da *B. coagulans* di derivati del pomodoro sottoposti agli usuali trattamento termici a temperature prossime a 100°C sono poco frequenti; esse riguardano, quasi esclusivamente, prodotti trattati termicamente, a temperature superiori a 110°C: è possibile che in tali condizioni si verifichi un sensibile aumento del valore di  $z$  delle spore.

In questi casi è consigliata un effetto letale del trattamento termico pari a:  $F_{121} = 0,7$  minuti (34).

È da rilevare che in precedenti ricerche effettuate sull'effetto di trattamenti termici sub-letali aventi come effetto due sole riduzioni decimali su  $10^4$  spore/ml di ceppi di *B. coagulans*, isolati da conserve di pomodoro alterate per flat-sour, questi si sono dimostrati adeguati a impedirne l'accrescimento in succo di pomodoro a pH 4,45. Le spore sopravvivenenti, in numero di  $10^2$ /ml, si inattivavano rapidamente (circa 30 giorni) grazie all'azione sinergica di acidità, concentrazione idrogenionica e trattamento termico sub-letale (22, 35, 41).

Nella tabella seguente sono riportati i valori di  $F_{100}$  ai due valori di pH e le relative probabilità finali di alterazione (PNSU) per i due microrganismi sporigeni di interesse.

#### Valori dell'effetto sterilizzante $F_{100}$ e probabilità di alterazione

Valore di pH* (all'equilibrio)	$F_{100}$	PNSU – <i>C. pasteurianum</i>	PNSU – <i>B. coagulans</i>
4,3 (g 400)	6,2 minuti	$10^{-5}$	$10^{-5}$
4,3 (g 800)	6,4 minuti	$10^{-5}$	$10^{-5}$
4,5 (g 400)	7,5 minuti	$10^{-5}$	$10^{-4}$
4,5 (g 800)	7,7 minuti	$10^{-5}$	$10^{-4}$

\* Piccole oscillazioni (es.: 0,05 unità pH) intorno ai valori sono, nella pratica industriale, irrilevanti.

Riguardo i batteri termofili sporigeni, essi (in forma di spora) possiedono elevata resistenza al calore; i trattamenti termici non possono essere dimensionati sui loro valori di  $D_{100}$  poiché risulterebbero così intensi da provocare scadimento delle caratteristiche organolettiche dei prodotti.

Nei derivati non concentrati del pomodoro è relativamente frequente l'alterazione da *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (anaerobio, gasogeno) e, in anomale condizioni di aerobiosi, di *Alicyclobacillus acidocaldarius*.

Essi causano alterazione solo quando le temperature di sosta nei serbatoi della linea di lavorazione di succhi, passate, triturati ecc., o di fine raffreddamento e/o magazzinaggio delle confezioni, sono sufficientemente elevate da permetterne lo sviluppo.

Le spore di *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* sono presenti nella materia prima a concentrazioni massime di  $3 \cdot 10^3$ /g in succhi di riempimento e  $4,5 \cdot 10^2$ /g in pelati (42). Tali spore presentano una termo resistenza molto elevata; il valore di  $D^{115}$  a pH 4,5 varia da 3,3 a 8,7 minuti in funzione dei diversi ceppi testati con valori di  $z$  da 7,3 a 8,3°C e a pH 4,3 è di 3,8 – 6,3 minuti e  $z$  da 7,8 a 9,3°C (43).

Spore di *Alicyclobacillus acidocaldarius* sono frequentemente ritrovate nei derivati del pomodoro ma a livelli di concentrazione molto bassi cioè poche unità per grammo di prodotto.

Tali spore presentano una termoresistenza discretamente elevata:  $D_{100}$  di 18,9 – 21,7 minuti con valori di  $z$  di 6,45 e 11,12°C, rispettivamente (44).

Questi microrganismi crescono solo nell'intervallo di temperatura 37-65°C e in presenza di ossigeno a concentrazioni superiori a quelle presenti nelle confezioni di conserve (45, 46).

L'alterazione è, quindi, più probabile lungo la linea di lavorazione specialmente in presenza di soste in serbatoi a temperature adatte al loro accrescimento; questo determina un'alterazione delle caratteristiche organolettiche del prodotto (*off-flavour*) (46).

Al fine di ridurre il rischio di alterazione da parte di questi microrganismi è di fondamentale importanza la buona qualità della materia prima, un adeguato lavaggio (*Alicyclobacillus spp.* è di origine tellurica), buone condizioni igieniche di lavorazione, un rapido ed efficace raffreddamento dopo il trattamento termico, la riduzione dei tempi di sosta di nei serbatoi e la conservazione del prodotto confezionato a temperature inferiori ai 37°C per impedire la germinazione delle spore sopravvissute. In base ai dati disponibili, si ritiene che i trattamenti termici riportati in tabella assicurino una sufficiente

sicurezza commerciale rispetto alla possibilità di alterazione da *C. pasteurianum* e da *B. coagulans* in prodotti stabilizzati mediante gli usuali trattamenti termici effettuati a temperature prossime a 100°C. Diminuzioni dell'entità dell'effetto sterilizzante possono essere effettuate diminuendo il valore del pH dei prodotti in maniera accurata e omogenea e/o riducendo la concentrazione iniziale delle spore dei batteri di alterazione con il miglioramento del lavaggio delle materie prime e dell'igiene generale delle linee di lavorazione.

La concentrazione sporale nelle materie prime può essere determinata analiticamente e inserita nella formula di calcolo dell'effetto sterilizzante.

Questa relazione è stata redatta sulla base dei dati rilevati nelle attività di ricerca del Dipartimento Microbiologia SSICA.

Essa aggiorna e integra la precedente versione:

"Stabilizzazione termica di derivati non concentrati del pomodoro", G. Pirone, M. P. Previdi, G. Dipollina, *Ind. Conserve*, 87, 141 (2012).

## BIBLIOGRAFIA

1. Laboratory Manual for Food Canners and Processors, Vol. 1, AVI Publishing Company New York, 3a Ed.(1968)
2. A Complete Course in Canning, Vol. 3, CTI Publications Inc., Baltimora (1996)
3. G. Pirone, L. La Pietra, *Ind. Conserve*, 78, 41 (2003)
4. E. Vicini, M. P. Previdi, G. Pirone, *M.A.N.*, 10, 105 (1992)
5. C. R. Stumbo, "Thermobacteriology in food processing", Academic Press New York, 2a Ed. (1973)
6. R. Massini, *Ind. Conserve*, 53, 86 (1978)
7. A. Casolari, "Lecture di microbiologia – Inattivazione dei microrganismi", Ed. Windytower, Parma (1991)
8. D. Holdsworth, R. Simpson, "Thermal Processing of Packaged Foods", Cap.4: Sterilization, Pasteurization and Cooking criteria, Springer, 2a Ed. (2007)
9. I. J. Pflug, *J. Food Protect.*, 50, 347 (1987)
10. I. J. Pflug, *J. Food Protect.*, 50, 342 (1987)
11. I. J. Pflug, *J. Food Protect.*, 50, 608 (1987)
12. The Bacterial Spore, Vol. 1 e 2, Ed. Hurst e Gould, Academic Press, New York, (1983)
13. E. Vicini, *Ind. Conserve*, 59, 22 (1984)
14. A. Palop, A. Martines - in "Thermal Food Processing - New Technologies and Quality Issues", Cap. 18: pH Assisted Thermal Processing. Ed. Da-Wen Sun, CRC Press, Boca Raton, U.S.A. (2006)
15. Foodborne Bacterial Pathogens, Ed. M. P. Doyle, M. Dekker Inc., New York (1989)
16. *Clostridium botulinum* - Ecology and Control in Foods, Ed. A. H. W. Hauschild, K. L. Doods, M. Dekker Inc., New York (1993)
17. Microorganisms in Foods, Vol. 5, "Characteristics of Microbial Pathogens", Ed. ICMSF, Blakie Academic and Professional, Londra (1996)
18. Microorganisms in Foods, Vol. 6, "Microbial Ecology of Foods Commodities", Ed. ICMSF, Blakie Academic and Professional, Londra (1998)
19. Microbial ecology of foods, Vol. 1, Ed. ICMSF, Academic Press, U.S.A. (1980)
20. J. A. Troller, *Food Technol.*, 1, 72, (1979)
21. W. H. Sperber, *J. Food Protect.*, 46, 142 (1983)
22. G. Pirone, M. P. Previdi, G. Dipollina, *Ind. Conserve*, 87, 141 (2012)
23. R. E. Anderson, *J. Food Sci.*, 49, 647 (1984)
24. L. La Pietra, G. Pirone, M. Longo, *Ind. Conserve*, "Progetti di Ricerca", 28 (2014)
25. S. Porretta, Il controllo della qualità dei derivati del pomodoro, edito da S.S.I.C.A. (Parma), 204 (1991)
26. P. J. Thomson, *J. Food Protect.*, 46, 154 (1981)
27. M. P. Previdi, I. Riccardi, *Ind. Conserve*, 76, 329 (2001)
28. G. Pirone, L. La Pietra, M. Impembo, M. Longo, G. Squitieri, *Ind. Conserve*, 80, 33 (2005)
29. L. La Pietra, G. Pirone, M. Longo, M. Impembo, E. Manganeli, *Ind. Conserve*, 85, 111 (2010)

30. W. H. Sperber, M. P. Doyle, "Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages", Ed. Springer, U.S.A. (2009)
31. G. Pirone, S. Mannino, M. Campanini, *Ind. Conserve*, 62, 135 (1987)
32. G. Pirone, L. La Pietra, *Ind. Conserve*, 63, 37 (1988)
33. M. Campanini, A. Casolari, F. Lancillotti, A. Lucisano, *Ind. Conserve*, 46, 182 (1971)
34. V. S. Troy, A. M. Schenck, "Flat-sour spoilage of tomato juice", Continental Can Company Inc., Chicago (1960)
35. G. K. York, J. R. Heil, G. L. Marsh, A. Ansar, R. L. Merson, T. Wolcott, S. Leonard, *J. Food Sci.*, 40, 764 (1975)
36. G. Pirone, S. Mannino, E. Vicini, *Ind. Conserve*, 64, 18 (1989)
37. A. Palop, A. Marco, J. Raso, F. J. Sala, S. Condon, *Int. J. Food Microbiol.*, 38, 25 (1997)
38. A. Palop, J. Raso, R. Pagan, S. Condon, F. J. Sala, *Int. J. Food Microbiol.*, 46, 243 (1999)
39. G. Pirone, L. La Pietra, *Ind. Conserve*, 68, 126 (1993)
40. G. Pirone, L. La Pietra, Rendicontazione Progetti di Ricerca 2016, *Ind. Conserve*, 102, 39 (2017)
41. G. Pirone, L. La Pietra, M. Longo, *Ind. Conserve*, 68, 420 (1993)
42. M. G. Pisciotta, M. Grimaldi, *Ind. Conserve*, 73, 242 (1998)
43. S. Garulli, M. P. Previdi, L. Miglioli, *Ind. Conserve*, 80, 133 (2005)
44. C. Lottici, M. P. Previdi, L. Bolzoni, *Ind. Conserve*, 81, 251 (2006)
45. M. P. Previdi, B. Franceschini, E. Manganeli, *Ind. Conserve*, 84, 179 (2009)
46. M. P. Previdi, B. Franceschini, M. Rapacciuolo, A. Zanotti, A. Trifirò, *Ind. Conserve*, 85, 1 (2010)