



RIFERIMENTO: CT 18.020

Data: 27 maggio 2019

CLIENTE: Fratelli Bianco S.r.l.

Sperimentazione per la sanificazione della linea di produzione della pasta ripiena mediante impiego di ozono gassoso

REPORT FINALE

Studio effettuato da MIAC S.c.p.a. - Polo AGRIFOOD

Via G.B. Conte 19, 12025 Dronero (CN)

Referente tecnico: Daniele Sconfienza

daniele.sconfienza@poloagrifood.it

Indice

1. INTRODUZIONE.....	2
2. STATO DELL'ARTE.....	2
2.1. L'ozono	2
2.2. Effetto dell'ozono	3
2.3. Possibili applicazioni nel settore alimentare.....	4
3. MATERIALI E METODI	5
3.1. Sistema di ozonizzazione.....	5
3.2. Protocollo sperimentale.....	6
3.3. Analisi sensoriale	8
4. RISULTATI.....	10
4.1. Qualità microbiologica dell'aria	10
4.2. Qualità microbiologica della pasta fresca	11
4.3. Test duo-trio	13
5. Considerazioni finali.....	13
6. Appendice	14
6.1. Appendice I.....	14
6.2. Appendice II.....	16
7. Bibliografia.....	22

1. INTRODUZIONE

Fratelli Bianco Srl è un pastificio specializzato nella produzione di pasta fresca di alta qualità. I prodotti che maggiormente contraddistinguono l'azienda sono quelli della tradizione locale e piemontese: agnolotti, ravioli del Plin e Ravioles della Val Varaita. I prodotti sono confezionati in atmosfera modificata e conservati a temperatura di refrigerazione e presentano una shelf-life di circa 20 giorni.

L'attività del presente progetto di ricerca e sviluppo messo in atto dall'azienda Fratelli Bianco, denominato dalla stessa BIANCO₃, prevede la messa a punto di un protocollo di trattamento con ozono gassoso nel tunnel di abbattimento termico presente nella linea di produzione di pasta fresca, con l'obiettivo di migliorare le condizioni igieniche dello stesso e garantire così una ricaduta positiva sul prodotto finale in termini di caratteristiche microbiologiche e shelf-life.

Il progetto BIANCO₃ prevede tra l'altro uno studio dello stato dell'arte esistente in azienda in termini di valutazione dei parametri microbiologici inerenti al processo di produzione della pasta fresca e una successiva sperimentazione utile a definire le condizioni migliori di trattamento con ozono.

La sperimentazione riguarda inoltre la valutazione della qualità organolettica della pasta prodotta mediante le linee sanificate tramite ozono.

L'obiettivo finale è quello di rendere il prodotto più sicuro, riducendone la carica microbica con positivo effetto sull'incremento della shelf life.

2. STATO DELL'ARTE

2.1. L'ozono

In Europa l'attenzione verso lo sviluppo di procedure innovative per la decontaminazione degli alimenti e degli ambienti di lavorazione è aumentata notevolmente e tra le sostanze che hanno riscosso maggiore interesse c'è l'ozono (O₃). I processi di sanificazione rivestono un ruolo centrale nel prevenire e limitare le contaminazioni da parte dei microrganismi patogeni ed alteranti: la Food and Drug Administration (FDA) ha infatti inserito la sanificazione ambientale fra le "top 10" problematiche del settore alimentare.

Recentemente, oltre alle metodiche di disinfezione già in uso, quali l'applicazione di trattamenti termici o di composti chimici, è stato proposto in diverse realtà produttive l'utilizzo dell'ozono come principio di disinfezione alternativo. Utilizzato da tempo per usi non alimentari, l'O₃ è stato riconosciuto nel 2001 dalla FDA come "Generally Recognized as Safe" (GRAS) e pertanto approvato, sia in fase gassosa sia acquosa, per il trattamento e la conservazione di alimenti.

Nell'Unione Europea l'impiego dell'ozono all'interno dell'industria alimentare è regolamentato dal Reg. UE 528/2012 (BPR). Attualmente, tale principio attivo generato in situ (a partire dall'aria ambiente) è registrato secondo quanto previsto dall'articolo 93 del BPR per i seguenti impieghi:

- disinfettanti e alghicidi non destinati all'applicazione diretta sull'uomo o animali;
- settore dell'alimentazione umana e animale;
- acqua potabile.

L'ozono è un gas instabile composto da tre atomi di ossigeno (O_3) ed è presente allo stato naturale nell'atmosfera. È uno dei più potenti disinfettanti conosciuti ed ha un elevato potere ossidante (10 volte il cloro); è molto efficace anche a basse concentrazioni nei confronti di un'ampia gamma di microrganismi e non lascia nessun residuo né sottoprodotto tossico.

L'efficacia disinfettante dell' O_3 è stata dimostrata nei confronti di diversi microrganismi associati agli alimenti [1]. Inoltre, diversi studi hanno evidenziato l'efficacia antibatterica ed antimicotica dell'ozono gassoso come agente di disinfezione negli ambienti di lavorazione degli alimenti [2, 3].

L'utilizzo dell'ozono può essere vantaggioso anche dal punto di vista economico se si considera che i costi per l'acquisto e la manutenzione delle unità di erogazione risultano più bassi rispetto al costo di approvvigionamento dei prodotti disinfettanti. Va anche sottolineato che l'impiego di prodotti chimici per la disinfezione nell'industria alimentare pone un problema di inquinamento dovuto al crescente accumulo ambientale, mentre l'ozono non lascia residui. L' O_3 è caratterizzato da una breve emivita e ciò rappresenta un vantaggio in termini di impatto ambientale [4]. La sua molecola si decompone spontaneamente a O_2 minimizzando i rischi per la salute umana, legati all'inalazione di elevate quantità di ozono [5].

L' O_3 è presente in natura come un gas blu dall'odore acre pungente e la sua concentrazione nell'atmosfera è di circa 0,04 ppm ($1 \text{ ppm} \sim 2 \text{ mg/m}^3$). È un gas solubile in soluzione acquosa con una solubilità inversamente proporzionale alla temperatura e al pH. L' O_3 possiede un'emivita di circa 20 minuti. Data la sua breve emivita, l' O_3 non può essere prodotto e conservato, ma è necessario che venga generato in situ al momento del suo impiego e/o utilizzo.

2.2. Effetto dell'ozono

L'azione ossidante esplicata dall' O_3 ha fatto sì che sin dalla sua scoperta sia stato utilizzato come agente battericida, fungicida e inattivante di virus. L' O_3 rispetto ad altri disinfettanti è caratterizzato da una maggiore efficacia e da un più ampio spettro d'azione sui microrganismi (batteri, muffe, lieviti, virus).

Il principale meccanismo di azione dell' O_3 , e più in particolare delle specie reattive dell'ossigeno, è la perossidazione lipidica, che genera composti biologicamente attivi in grado di causare, a livello cellulare, danni ai fosfolipidi di membrana. La tossicità dell' O_3 dipende, inoltre, dalla sua capacità di ossidare gli amminoacidi alterando irreversibilmente la struttura e la funzione delle proteine [6].

Una delle conseguenze più gravi legate all'attività dei radicali liberi derivanti dall' O_3 è quella che si esplica a livello del DNA. I radicali liberi, infatti, producono una serie di lesioni al DNA, causando

rottore, distorsioni della doppia elica e dei legami crociati fra le basi azotate. L'O₃ distrugge i microrganismi ossidando progressivamente i componenti vitali della cellula. La superficie della cellula batterica è stata indicata come target primario dell'ozonizzazione. Il doppio strato dei lipidi insaturi è particolarmente vulnerabile all'attacco dell'O₃ [7].

I Gram-negativi, infatti, sono meno sensibili dei Gram-positivi e i batteri sporigeni si dimostrano più resistenti dei non sporigeni [6].

Il tempo di contatto e il dosaggio per la disinfezione con O₃ sono molto bassi ed efficaci se comparati con altri disinfettanti. Gli effetti germicidi, in generale, sono influenzati dal tempo di contatto, dalla temperatura, dal pH e dalla presenza di materiale organico e inorganico nella soluzione. Una durata maggiore del tempo di contatto, un pH e una temperatura più bassa migliorano l'effetto battericida [6].

2.3. Possibili applicazioni nel settore alimentare

L'azione antimicrobica dell'O₃, sia in fase acquosa sia gassosa, può apportare effetti positivi nella lavorazione e nella conservazione degli alimenti prolungandone la shelf-life [8-9]. Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che né l'aspetto né il sapore degli alimenti viene alterato dall'ozonizzazione, previo controllo delle condizioni di trattamento.

L'O₃ è già stato sperimentato su prodotti ittici, nell'industria casearia, di lavorazione e trasformazione della carne e del pesce, nel settore bevande (incluso vino e birra), per la riduzione della contaminazione microbica, della crescita di biofilm di *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* e per l'abbattimento degli insetti nei silos di riso, mais, soia e grano.

L'O₃ controlla efficacemente anche lo sviluppo di muffe e batteri nelle celle frigorifere destinate alla conservazione degli alimenti, oltre a distruggere gli odori ed evitare quindi il passaggio di aromi non graditi da un prodotto all'altro [10].

In bibliografia scientifica non sono attualmente reperibili lavori relativi alla sperimentazione dell'O₃ gassoso nel settore della pasta fresca. Tuttavia, in tale settore è ipotizzabile l'impiego dell'O₃ per il trattamento dell'aria e delle superfici per il controllo della carica microbica. Nel primo caso l'applicazione può ipoteticamente riguardare i tunnel di raffreddamento, di asciugatura e le camere bianche, mentre nel secondo caso nastri trasportatori e attrezzi da lavoro.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Sistema di ozonizzazione

Per la sperimentazione è stato utilizzato un ozonizzatore BIOFRESH OZ1000 MS1. Tale sistema è composto da un gruppo erogante, un pannello di gestione e un sensore di processo. Il gruppo erogante da cui si produce l'ozono è composto a sua volta da due componenti principali: un concentratore di ossigeno con setacci molecolari ed il generatore di ozono da 4 g/h.

Il concentratore di ossigeno con setacci molecolari garantisce il processo di preparazione dell'aria ovvero il processo in grado di generare ossigeno puro, superiore al 90%, in modo da garantire sia una purezza di ozono generato senza la presenza di sottoprodotti sia una alta concentrazione di ozono. Durante questa fase, l'aria viene seccata e gli altri gas impuri vengono rimossi.

Il generatore di ozono invece, una volta convogliato al suo interno l'ossigeno prodotto in loco dal concentratore, provvederà a generare ozono attraverso il passaggio dell'ossigeno all'interno di una camera di produzione ad effetto corona.

Il livello dell'ozono (concentrazione) è costantemente monitorato da un sensore di rilevamento e gestito da un pannello di controllo in funzione dei livelli di concentrazione precedentemente programmati.



3.2. Protocollo sperimentale

La sperimentazione ha previsto l'applicazione di differenti concentrazioni e tempi di trattamento con ozono gassoso per la decontaminazione dell'aria presente all'interno del tunnel di abbattimento termico.

In tabella 1 sono riportate le condizioni di trattamento applicate durante la sperimentazione.

Tabella 1. Condizioni di sperimentali di trattamento del tunnel di abbattimento con O₃

Codifica	Condizioni di trattamento
CT	Controllo con ozonizzatore spento
LOW_O3	60 ppb di O ₃ durante l'orario lavorativo (mediamente dalle ore 5:00 – 19:00)
MEDIUM_O3	600 ppb di O ₃ durante l'orario lavorativo (mediamente dalle ore 5:00 – 19:00)
HIGH_O3	600 ppb di O ₃ durante l'orario lavorativo (mediamente dalle ore 5:00 – 19:00) e 150 ppb di O ₃ durante l'orario non lavorativo (mediamente dalle ore 19:00 – 5:00)

Per valutare l'efficacia dei vari protocolli adottati sono stati effettuati molteplici campionamenti microbiologici dell'aria e della pasta fresca.

I campionamenti dell'aria sono stati effettuati esponendo all'interno del tunnel di abbattimento termico delle piastre petri contenenti appropriati terreni di coltura per un tempo di 13 minuti, corrispondenti al periodo medio di permanenza della pasta fresca all'interno del tunnel durante il processo produttivo. I parametri microbiologici presi in considerazione per la valutazione della qualità microbiologica dell'aria sono di seguito elencati:

- Conta batterica totale a 30°C (CBT)
- Muffe
- Lieviti
- Enterobatteri

Tali parametri rappresentano i principali indicatori di igiene di processo, comunemente utilizzati nell'industria alimentare. Per ognuno dei protocolli sperimentati, il campionamento dell'aria è stato effettuato in due distinti momenti della giornata al fine di avere un dato robusto. Compatibilmente con la disponibilità dell'azienda, i campionamenti sono stati effettuati nei giorni finali della settimana produttiva (mercoledì-giovedì), sia al mattino che alla sera, che rappresentano le condizioni peggiori per quanto riguarda il grado di contaminazione dell'abbattitore. Per ogni campionamento sono state esposte 3 piastre (repliche) per ognuno dei terreni di coltura utilizzati.

Pertanto, per ognuno dei protocolli testati, sono state effettuate 6 repliche (3 al mattino + 3 alla sera) per ognuno dei parametri microbiologici presi in considerazione.

Per quanto riguarda la valutazione dell'impatto del trattamento di sanificazione ambientale mediante ozono gassoso sulla pasta fresca, sono state svolte le analisi su 3 differenti referenze e in 4 punti del processo produttivo per ognuno dei protocolli testati.

Le referenze oggetto di valutazione sono state selezionate in base alle loro caratteristiche chimico-fisiche, alle loro dimensioni e al loro rapporto superficie/volume oltre che per la rilevanza in termini di mercato per il pastificio F.lli Bianco. Di seguito sono elencate le referenze oggetto della valutazione:

- Ravioles della Val Varaita
- Plin con ripieno di erbette
- Ravioli con ripieno di carne e verdure

I punti di campionamento lungo il processo produttivo sono stati i seguenti:

- Pre-pastorizzazione
- Post-pastorizzazione e incartamento
- Uscita dell'abbattitore termico
- Post-confezionamento ovvero sul prodotto confezionato in atmosfera modificata

Il campionamento è stato effettuato mediante sacchetti sterili. I parametri microbiologici presi in considerazione per la valutazione della qualità microbiologica della pasta fresca sono di seguito elencati:

- Conta batterica totale a 30°C (CBT)
- Muffe
- Lieviti
- Enterobatteri
- Batteri lattici

Tali parametri rappresentano i principali indicatori di igiene di processo, comunemente utilizzati nell'industria alimentare. In particolare, i batteri lattici rappresentano un indicatore microbiologico legato alla materia prima, principalmente rappresentata dagli sfarinati (semola, semolato, farine), il cui principale gruppo di microrganismi non patogeni ma alteranti è dato proprio dai batteri lattici [11].

Compatibilmente con la disponibilità dell'azienda, i campionamenti sono stati condotti verso la metà della settimana, in modo tale che la linea produttiva presentasse delle contaminazioni derivanti dai giorni precedenti di lavorazione.

Le analisi microbiologiche sono state eseguite dal laboratorio accreditato UNI CEI EN ISO IEC 17025 Laemmegroup s.r.l. adottando metodiche analitiche accreditate.

Tabella 2.

Tabella 5.7 - Numero minimo necessario di risposte esatte per concludere che esiste una differenza percepibile tra i campioni (test unilaterale $p = 1/2$).

n	α					
	0.30	0.20	0.10	0.05	0.01	0.001
10	7	7	8	9	10	10
11	7	8	9	9	10	11
12	8	8	9	10	11	12
13	8	9	10	10	12	13
14	9	10	10	11	12	13
15	10	10	11	12	13	14
16	10	11	12	12	14	15
17	11	11	12	13	14	16
18	11	12	13	13	15	16
19	12	12	13	14	15	17
20	12	13	14	15	16	18
21	13	13	14	15	17	18
22	13	14	15	16	17	19
23	14	15	16	16	18	20
24	14	15	16	17	19	20
25	15	16	17	18	19	21
26	15	16	18	18	20	22
27	16	17	18	19	20	22
28	16	17	19	19	21	23
29	17	18	19	20	22	24
30	17	18	20	20	22	24
31	18	19	20	21	23	25
32	18	19	21	22	24	26
33	19	20	21	22	24	26
34	20	20	22	23	25	27
35	20	21	22	23	25	27
36	21	22	23	24	26	28
40	23	24	25	26	28	31
44	25	26	27	28	31	33
48	27	28	29	31	33	36
52	29	30	32	33	35	38
56	31	32	34	35	38	40
60	33	34	36	37	40	43
64	35	36	38	40	42	45
68	37	38	40	42	45	48
72	39	41	42	44	47	50
76	41	43	45	46	49	52
80	43	45	47	48	51	55
84	45	47	49	51	54	57
88	47	49	51	53	56	59
92	50	51	53	55	58	62
96	52	53	55	57	60	64
100	54	55	57	59	63	66
104	56	57	60	61	65	69
108	58	59	62	64	67	71
112	60	61	64	66	69	73
116	62	64	66	68	71	76
122	65	67	69	71	75	79
140	74	76	79	81	85	89

Per i valori di n non riportati nel prospetto calcolare i valori mancanti nel modo seguente: numero minimo di risposte $x =$ numero approssimato per eccesso al più vicino numero intero maggiore di $x = (n + 1)/2 + z \cdot \sqrt{0.25n}$, dove z varia con il livello di significatività come segue: 0.84 per $\alpha = 0.20$; 1.28 per $\alpha = 0.10$; 1.64 per $\alpha = 0.05$; 2.33 per $\alpha = 0.01$; 3.10 per $\alpha = 0.001$.

4. RISULTATI

4.1. Qualità microbiologica dell'aria

I risultati delle analisi microbiologiche effettuate sull'aria del tunnel di raffreddamento hanno evidenziato che l'ozono ha degli effetti non trascurabili sulla vitalità delle cellule microbiche. I risultati mediati sono riportati in figura 1.

In particolare, le muffe sono risultate essere più sensibili nei confronti dell'ozono rispetto ai batteri. Rispetto al controllo (CT), per quanto concerne le muffe, è stata osservata una riduzione di circa 1 logaritmo nelle condizioni LOW_O3 e MEDIUM_O3, mentre con il protocollo HIGH_O3 si è osservata una riduzione di circa 2 logaritmi.

Per quanto riguarda la conta batterica totale il trattamento LOW_O3 ha permesso una scarsa riduzione della stessa (circa 0,2 logaritmi). I trattamenti MEDIUM_O3 e soprattutto HIGH_O3 hanno mostrato una maggiore efficacia nella riduzione della CBT, con una riduzione di circa 1 logaritmo per quest'ultimo.

I lieviti e gli enterobatteri sono risultati essere per lo più non rilevabili in tutti i trattamenti effettuati, compreso il controllo. Pertanto, non è stato possibile valutare l'efficacia dell'ozono nei loro confronti.

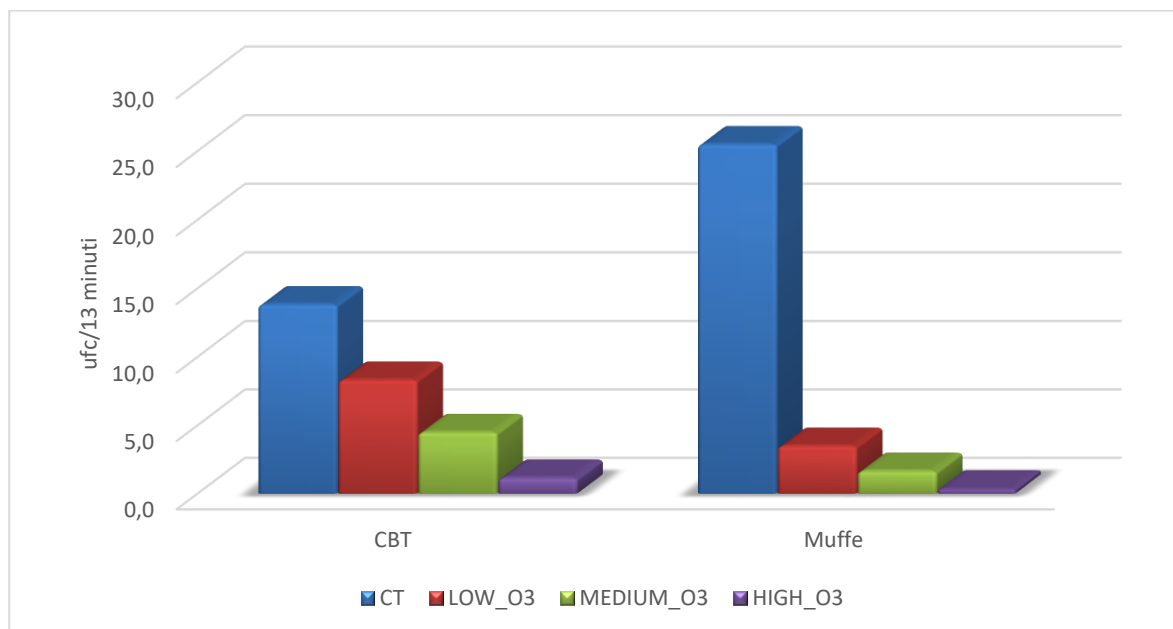


Figura 1. Concentrazione della contaminazione microbica dell'aria (CBT e muffe) presente all'interno del tunnel di abbattimento termico. Ognuno dei risultati riportati corrisponde alla media di 6 repliche (vedere sezione 3.2).

I risultati non hanno evidenziato un punto di contaminazione preferenziale all'interno del tunnel di abbattimento termico. Inoltre, va sottolineato che per quanto riguarda i protocolli MEDIUM_O3 e

HIGH_O3, uno dei due campionamenti è stato effettuato nella giornata di giovedì, ovvero in una condizione potenzialmente peggiore rispetto a quelle effettuate per il controllo e il protocollo LOW_O3, in cui i campionamenti erano stati effettuati solo nella giornata di mercoledì. Ciononostante, i risultati hanno evidenziato un'interessante riduzione della carica microbica.

In appendice I sono riportati i risultati non elaborati e i corrispondenti rapporti di prova.

4.2. Qualità microbiologica della pasta fresca

Le analisi microbiologiche effettuate su 3 differenti referenze di pasta fresca (Ravioles della Val Varaita, plin con ripieno di erbe, ravioli con ripieno di carne e verdure) lungo l'intero processo produttivo hanno evidenziato la presenza di un certo effetto positivo di alcuni dei trattamenti con ozono sulla qualità microbiologica. In figura 2 sono riportati i risultati mediati espressi in LOG ufc/g, mentre in tabella 2 sono riportati i valori di riduzione logaritmica medi della carica batterica che intercorrono tra le varie fasi del processo.

È possibile osservare che il livello di abbattimento medio della carica batterica introdotto dal processo di pastorizzazione è di circa 3 logaritmi e presenta una discreta ripetibilità nel corso del tempo.

Per quanto concerne la fase di abbattimento termico, in cui è possibile osservare l'efficacia o meno del trattamento con ozono gassoso per la purificazione dell'aria, è possibile osservare che non si osservano miglioramenti sensibili con il trattamento LOW_O3, mentre è possibile apprezzare un certo effetto per quanto riguarda i trattamenti MEDIUM_O3 e HIGH_O3, con una riduzione logaritmica media della carica batterica superiore a 0,5 logaritmi in entrambi i casi (0,8 e 0,6 rispettivamente).

Inoltre, un altro interessante dato emerso durante la sperimentazione, che tuttavia sarebbe da confermare con ulteriori campionamenti, è legato all'apparente riduzione della carica microbica in seguito al confezionamento osservato nei prodotti che sono venuti a contatto con l'ozono. Tale effetto potrebbe essere imputabile al repentino passaggio del prodotto da un ambiente altamente ossidante (tunnel di abbattimento termico) a un ambiente altamente riducente (confezione in atmosfera modificata priva di ossigeno). È possibile che nel periodo trascorso all'interno dell'abbattitore termico vengano selezionati batteri maggiormente resistenti a condizioni fortemente ossidanti, dopodiché nel corso di pochi minuti i batteri così selezionati si vengono a trovare in condizioni fortemente riducenti, non adatte al loro metabolismo e questo potrebbe portare a morte cellulare. Pertanto, se si considera la riduzione logaritmica della carica microbica all'uscita del pastorizzatore e dopo il confezionamento, per i trattamenti MEDIUM_O3 e HIGH_O3 si è osservata una riduzione circa 1 logaritmo (1,5 e 0,7 rispettivamente).

In appendice II sono riportati i risultati non elaborati e i corrispondenti rapporti di prova.

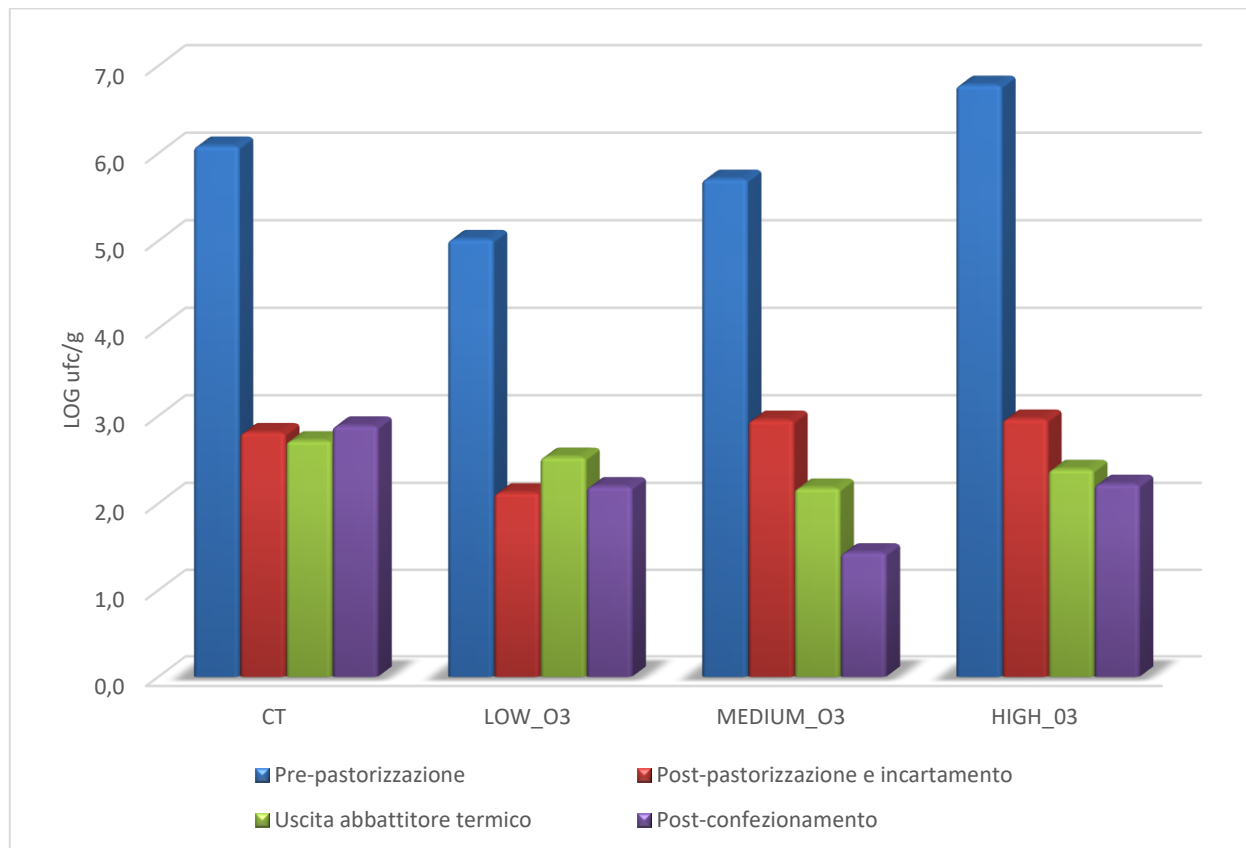


Figura 2. Evoluzione della concentrazione della conta batterica totale a 30°C (CBT) della pasta fresca lungo il processo produttivo. Ognuno dei risultati riportati corrisponde alla media delle 3 differenti tipologie di pasta fresca oggetto della sperimentazione.

Tabella 3. Riduzione logaritmica (base 10) della conta batterica totale a 30°C (CBT) lungo le varie fasi del processo di produzione di pasta fresca.

FASI DI PROCESSO	Delta Log [ufc/g]			
	CT	LOW_O3	MEDIUM_O3	HIGH_O3
Pre-pastorizzazione / Post-pastorizzazione e incartamento	3,3	2,9	2,8	3,8
Post-pastorizzazione e incartamento / Uscita abbattitore termico	0,1	-0,4	0,8	0,6
Uscita abbattitore termico / Post-confezionamento	-0,2	0,3	0,7	0,2
Post-pastorizzazione e incartamento / Post-confezionamento	-0,1	-0,1	1,5	0,7

4.3. Test duo-trio

L'obiettivo del lavoro è stato quello di valutare eventuali differenze sensoriali tra la pasta fresca entrata in contatto con l'ozono e la pasta ottenuta senza sanificazione ambientale con O₃. L'analisi sensoriale è stata effettuata nei giorni 22-23/05 e ha visto la partecipazione di un gruppo di 28 assaggiatori non addestrati (16 donne e 12 uomini), ma formati in modo adeguato e puntuale sullo svolgimento del test. 16 assaggiatori su 28 hanno fornito la risposta corretta. Secondo i dati della tabella riportata precedentemente e scegliendo come livello di significatività $\alpha=0,05$, risultano necessarie almeno 19 risposte esatte per poter affermare che esiste una differenza significativa tra i campioni.

Dai risultati ottenuti si può quindi constatare come il panel di assaggiatori, tutti potenziali consumatori, non abbia percepito differenze significative, a livello sensoriale, tra i prodotti ottenuti dopo aver sanificato le linee con l'ozono e quelli ottenuti senza la sanificazione con O₃.

5. Considerazioni finali

Alcuni dei trattamenti con ozono gassoso sperimentati all'interno del progetto BIANCO₃ hanno mostrato un certo grado di efficacia nei confronti dei microrganismi e nel migliorare le condizioni igienico-sanitarie sia dell'aria che, di riflesso, della pasta fresca. In particolare, le condizioni sperimentali testate che si sono rivelate più efficaci sono la MEDIUM_O3 e HIGH_O3, che hanno evidenziato un abbattimento della carica microbica presente nell'aria del tunnel di abbattimento, e di conseguenza anche sulla pasta fresca.

Va inoltre considerato che con ogni probabilità l'applicazione del trattamento HIGH_O3 nel lungo periodo è potenzialmente in grado di consentire un migliore contenimento della carica microbica presente all'interno dell'abbattitore termico, in quanto viene mantenuta lungo tutta la durata della settimana lavorativa una concentrazione di ozono sufficiente a impedire la proliferazione dei microrganismi.

Al contrario, il protocollo MEDIUM_O3 prevede che durante il periodo non lavorativo (notturno) l'ozonizzatore venga spento, non permettendo il controllo della proliferazione microbica durante questo lasso di tempo.

Il trattamento LOW_O3 si è invece dimostrato poco efficace nel ridurre la contaminazione microbica dell'aria e della pasta, e pertanto non è consigliabile la sua applicazione.

Infine, l'analisi sensoriale ha confermato che non si riscontrano differenze sensoriali significative tra la pasta ottenuta dopo aver sanificato le linee con l'ozono e quella ottenuta senza la sanificazione con O₃.

6. Appendice

6.1. Appendice I

Nelle tabelle seguenti sono riportati i risultati delle analisi microbiologiche effettuate sull'aria presente all'interno del tunnel di abbattimento termico.

Tabella 4. Protocollo di trattamento CT. Risultati delle prove microbiologiche riferite ai rapporti di prova da n° 18-LA39923 a n° 18-LA39934.

Parametro	Periodo campionamento	Inizio abbattitore (porta 1-2)	Metà abbattitore (porta 3-4)	Fine abbattitore (porta 5-6)
CBT (cfu/13 min)	1/08/18 mattino	1	0	4
	1/08/18 sera	9	58	11
Muffe (cfu/13 min)	1/08/18 mattino	32	30	33
	1/08/18 sera	22	24	12
Lieviti (cfu/13 min)	1/08/18 mattino	0	0	0
	1/08/18 sera	0	0	0
Enterobatteri (cfu/13 min)	1/08/18 mattino	0	0	0
	1/08/18 sera	0	0	0
Stafilococchi CG+ (cfu/13 min)	1/08/18 mattino	0	0	0
	1/08/18 sera	0	0	0
B. cereus (cfu/13 min)	1/08/18 mattino	0	0	0
	1/08/18 sera	0	0	0

Tabella 5. Protocollo di trattamento LOW_03. Risultati delle prove microbiologiche riferite ai rapporti di prova da n° 18-LA45397 a n° 18-LA45402.

Parametro	Periodo campionamento	Inizio abbattitore (porta 1-2)	Metà abbattitore (porta 3-4)	Fine abbattitore (porta 5-6)
CBT (cfu/13 min)	10/10/18 mattino	19	4	10
	10/10/18 sera	5	4	8
Muffe (cfu/13 min)	10/10/18 mattino	0	4	0
	10/10/18 sera	5	5	7
Lieviti (cfu/13 min)	10/10/18 mattino	0	1	0
	10/10/18 sera	0	0	0
Enterobatteri (cfu/13 min)	10/10/18 mattino	0	0	0
	10/10/18 sera	0	0	0

Tabella 6. Protocollo di trattamento MEDIUM_O3. Risultati delle prove microbiologiche riferite ai rapporti di prova da n° 19-LA06484 a n° 19-LA06489.

Parametro	Periodo campionamento	Inizio abbattitore (porta 1-2)	Metà abbattitore (porta 3-4)	Fine abbattitore (porta 5-6)
CBT (cfu/13 min)	14/02/19 mattino	4	8	0
	13/02/19 sera	11	2	2
Muffe (cfu/13 min)	14/02/19 mattino	1	3	0
	13/02/19 sera	3	1	2
Lieviti (cfu/13 min)	14/02/19 mattino	0	0	0
	13/02/19 sera	0	0	0
Enterobatteri (cfu/13 min)	14/02/19 mattino	0	0	0
	13/02/19 sera	0	0	0

Tabella 7. Protocollo di trattamento HIGH_O3. Risultati delle prove microbiologiche riferite ai rapporti di prova da n° 19-LA10030 a n° 19-LA10032, n° 19-LA10245, n° 19-LA10249, 19-LA10250.

Parametro	Periodo campionamento	Inizio abbattitore (porta 1-2)	Metà abbattitore (porta 3-4)	Fine abbattitore (porta 5-6)
CBT (cfu/13 min)	20/03/19 mattino	0	1	1
	21/03/19 mattino	0	5	0
Muffe (cfu/13 min)	20/03/19 mattino	0	0	0
	21/03/19 mattino	0	1	1
Lieviti (cfu/13 min)	20/03/19 mattino	0	0	0
	21/03/19 mattino	0	0	1
Enterobatteri (cfu/13 min)	20/03/19 mattino	0	0	0
	21/03/19 mattino	0	3	0

6.2. Appendice II

Tabella 8. Protocollo di trattamento CT. Risultati delle prove microbiologiche riferite al rapporto di prova da n° 18-LA34410 a n° 18-LA34413. Data di campionamento: 7/08/2018

RAVIOLES VAL VARAITA					
Punto di campionamento	CBT (cfu/g)	Enterobatteri (cfu/g)	Batteri lattici (cfu/g)	Lieviti (cfu/g)	Muffe (cfu/g)
Pre-pastorizzazione	9,2x10 ⁵	2,4x10 ³	2,1x10 ⁵	2x10 ²	<10
Post-pastorizzazione e incartamento	1,2x10 ³	<10	<10	<10	4x10
Uscita abbattitore termico	1,1x10 ³	<10	6x10	<10	<10
Post-confezionamento	9,7x10 ²	<10	<10	<10	<10

Tabella 9. Protocollo di trattamento LOW_O3. Risultati delle prove microbiologiche riferite al rapporto di prova da n° 18-LA45058 a n° 18-LA45061. Data di campionamento: 9/10/2018

RAVIOLES VAL VARAITA					
Punto di campionamento	CBT (cfu/g)	Enterobatteri (cfu/g)	Batteri lattici (cfu/g)	Lieviti (cfu/g)	Muffe (cfu/g)
Pre-pastorizzazione	3,5x10 ³	4,4x10 ²	7,8x10 ²	0,4x10 ²	<10
Post-pastorizzazione e incartamento	0,7x10 ²	<10	<10	<10	<10
Uscita abbattitore termico	0,5x10 ²	<10	<10	<10	<10
Post-confezionamento	1,5x10 ²	<10	<10	<10	<10

Tabella 10. Protocollo di trattamento MEDIUM_O3. Risultati delle prove microbiologiche riferite al rapporto di prova da n° 19-LA06070 a n° 19-LA06073. Data di campionamento: 12/02/2019

RAVIOLES VAL VARAITA					
Punto di campionamento	CBT (cfu/g)	Enterobatteri (cfu/g)	Batteri lattici (cfu/g)	Lieviti (cfu/g)	Muffe (cfu/g)
Pre-pastorizzazione	1x10 ⁵	4,6x10 ³	1,3x10 ²	3,8x10 ²	6x10
Post-pastorizzazione e incartamento	<10	<10	<10	<10	<10
Uscita abbattitore termico	<10	<10	<10	<10	<10
Post-confezionamento	<10	<10	<10	<10	<10

Tabella 11. Protocollo di trattamento HIGH_O3. Risultati delle prove microbiologiche riferite al rapporto di prova da n° 19-LA09812 a n° 19-LA09815. Data di campionamento: 19/03/2019

RAVIOLES VAL VARAITA					
Punto di campionamento	CBT (cfu/g)	Enterobatteri (cfu/g)	Batteri lattici (cfu/g)	Lieviti (cfu/g)	Muffe (cfu/g)
Pre-pastorizzazione	5,2x10 ⁴	4,1x10 ³	1,3x10 ⁴	1,5x10 ²	1x10 ²
Post-pastorizzazione e incartamento	1,7x10 ²	<10	<10	<10	<10
Uscita abbattitore termico	3,2x10 ²	<10	<10	<10	<10
Post-confezionamento	1x10 ²	<10	<10	<10	<10

Tabella 12. Protocollo di trattamento CT. Risultati delle prove microbiologiche riferite al rapporto di prova da n° 18-LA34480 a n° 18-LA34483. Data di campionamento: 8/08/2018

PLIN ALLE ERBETTE					
Punto di campionamento	CBT (cfu/g)	Enterobatteri (cfu/g)	Batteri lattici (cfu/g)	Lieviti (cfu/g)	Muffe (cfu/g)
Pre-pastorizzazione	8,4x10 ⁵	1,1x10 ³	1,6x10 ⁵	1x10 ²	<10
Post-pastorizzazione e incartamento	4x10 ²	<10	<40	4x10	<10
Uscita abbattitore termico	1,5x10 ³	<10	<40	4x10	<10
Post-confezionamento	1,5x10 ³	<10	2,7x10 ²	4x10	<10

Tabella 13. Protocollo di trattamento LOW_O3. Risultati delle prove microbiologiche riferite al rapporto di prova da n° 18-LA45062 a n° 18-LA45065. Data di campionamento: 9/10/2018

PLIN ALLE ERBETTE					
Punto di campionamento	CBT (cfu/g)	Enterobatteri (cfu/g)	Batteri lattici (cfu/g)	Lieviti (cfu/g)	Muffe (cfu/g)
Pre-pastorizzazione	1,8x10 ⁵	<10	1,2x10 ⁵	<10	<10
Post-pastorizzazione e incartamento	0,8x10 ²	<10	<10	<10	<10
Uscita abbattitore termico	2,1x10 ²	<10	<40	<10	<10
Post-confezionamento	2,0x10 ²	<10	<10	<10	<10

Tabella 14. Protocollo di trattamento MEDIUM_O3. Risultati delle prove microbiologiche riferite al rapporto di prova da n° 19-LA06074 a n° 19-LA06077. Data di campionamento: 12/02/2019

PLIN ALLE ERBETTE					
Punto di campionamento	CBT (cfu/g)	Enterobatteri (cfu/g)	Batteri lattici (cfu/g)	Lieviti (cfu/g)	Muffe (cfu/g)
Pre-pastorizzazione	1,2x10 ⁶	1,4x10 ³	2x10 ⁵	5x10 ³	8x10
Post-pastorizzazione e incartamento	<10	<10	<10	<10	<10
Uscita abbattitore termico	<10	<10	<10	<10	<10
Post-confezionamento	<10	<10	<10	<10	<10

Tabella 15. Protocollo di trattamento HIGH_O3. Risultati delle prove microbiologiche riferite al rapporto di prova n° 19-LA10023, n° 19-LA10025, n° 19-LA10026, n° 19-LA10027. Data di campionamento: 19/03/2019

PLIN ALLE ERBETTE					
Punto di campionamento	CBT (cfu/g)	Enterobatteri (cfu/g)	Batteri lattici (cfu/g)	Lieviti (cfu/g)	Muffe (cfu/g)
Pre-pastorizzazione	2,1x10 ⁶	1,5x10 ³	8,7x10 ⁴	2,2x10 ²	1x10 ²
Post-pastorizzazione e incartamento	4,1x10 ²	<10	<10	<10	<10
Uscita abbattitore termico	3,8x10 ²	<10	<10	<10	<10
Post-confezionamento	4x10 ²	<10	<10	<10	<10

Tabella 16. Protocollo di trattamento CT. Risultati delle prove microbiologiche riferite al rapporto di prova da n° 18-LA34484 a n° 18-LA34487. Data di campionamento: 09/08/2018

AGNOLOTTI CARNE E VERDURE					
Punto di campionamento	CBT (cfu/g)	Enterobatteri (cfu/g)	Batteri lattici (cfu/g)	Lieviti (cfu/g)	Muffe (cfu/g)
Pre-pastorizzazione	1,9x10 ⁶	7,5x10 ²	2,7x10 ⁵	1,1x10 ²	<10
Post-pastorizzazione e incartamento	3,5x10 ²	<10	<10	<10	<10
Uscita abbattitore termico	3,2x10 ²	<10	<40	<10	<10
Post-confezionamento	1,2x10 ³	<10	9x10	<10	<10

Tabella 17. Protocollo di trattamento LOW_O3. Risultati delle prove microbiologiche riferite al rapporto di prova da n° 18-LA45393 a n° 18-LA45396. Data di campionamento: 10/10/2018

AGNOLOTTI CARNE E VERDURE					
Punto di campionamento	CBT (cfu/g)	Enterobatteri (cfu/g)	Batteri lattici (cfu/g)	Lieviti (cfu/g)	Muffe (cfu/g)
Pre-pastorizzazione	1,3x10 ⁵	3,0x10 ²	5,0x10 ⁴	2,4x10 ²	<40
Post-pastorizzazione e incartamento	2,5x10 ²	<10	<10	<10	<10
Uscita abbattitore termico	7,6x10 ²	<10	2,2x10 ²	<10	<10
Post-confezionamento	1,2x10 ²	<10	<40	<10	<10

Tabella 18. Protocollo di trattamento MEDIUM_O3. Risultati delle prove microbiologiche riferite al rapporto di prova da n° 19-LA06777 a n° 19-LA06780. Data di campionamento: 18/02/2019

AGNOLOTTI CARNE E VERDURE					
Punto di campionamento	CBT (cfu/g)	Enterobatteri (cfu/g)	Batteri lattici (cfu/g)	Lieviti (cfu/g)	Muffe (cfu/g)
Pre-pastorizzazione	2,3x10 ⁵	1,8x10 ²	4,6x10 ³	3,2x10 ²	1,5x10 ²
Post-pastorizzazione e incartamento	2,7x10 ³	<10	<10	<10	<10
Uscita abbattitore termico	4,5x10 ²	<10	<10	<10	<10
Post-confezionamento	8x10	<10	<10	<10	<10

Tabella 19. Protocollo di trattamento HIGH_O3. Risultati delle prove microbiologiche riferite al rapporto di prova da n° 19-LA09816 a n° 19-LA09819. Data di campionamento: 19/03/2019

AGNOLOTTI CARNE E VERDURE					
Punto di campionamento	CBT (cfu/g)	Enterobatteri (cfu/g)	Batteri lattici (cfu/g)	Lieviti (cfu/g)	Muffe (cfu/g)
Pre-pastorizzazione	1,6x10 ⁷	6,5x10 ²	2,4x10 ⁵	1,7x10 ²	<10
Post-pastorizzazione e incartamento	2,2x10 ³	<10	1,4x10 ³	<10	<10
Uscita abbattitore termico	<40	<10	<10	<10	<10
Post-confezionamento	<10	<10	<10	<10	<10

7. Bibliografia

- [1] Restaino L., Frampton E.W., Hemphill J.B, Palnikar P. "Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms". *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9), 3471-3475, 1995.
- [2] Moore G., Griffith C. and Peters A. (2000) Bactericidal properties of ozone and its potential application as a terminal disinfectant. *J. Food Protect.*; 63, 1100-1106.
- [3] Robbins J.B., Fisher C.W., Moltz A.G. and Martin S.E. (2004) Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. *J. Food Protect.*; 68, 494 -498.
- [4] Pascual A., Llorca I., Canut A. "Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities". *Trend for Food Science Technology*, 18, 29-35, 2007.
- [5] Horvath M., Bilitzky L. and Huttner J. (1985) Fields of utilization of ozone. R.J.H. Clark (ed.) *Ozone*. Elsevier Science Publishing Co., Inc., NY. p 257-316.
- [6] UTILIZZAZIONE DELL'OZONO NELL'INDUSTRIA ALIMENTARE. Ozone applications in the food industry. PIERLUIGI DI CICCIO (2013).
- [7] PRABHA V., Deb Barma R., Singh R., Madan A. "Ozone Technology in Food Processing: A Review". *Trends in Biosciences* 8 (16), 4031-4047, 2015.
- [8] Kuprianoff F. "The use of ozone for the cold storage of fruit". *Z. Kaltentech*, 10, 1-4, 1953.
- [9] Broadwater W.T., Hoehn R.C., King P.H. "Sensitivity of three selected bacterial species to ozone". *Applied Microbiology*, 26(3), 391-3, 1973.
- [10] Comitato Nazionale sulla Sicurezza Alimentare (CNSA): Parere sul trattamento con ozono dell'aria negli ambienti di stagionatura dei formaggi,
http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1514_allegato.pdf
- [11] Gozzi G. (2007). Contaminazione microbica nella pasta fresca. Pastaria. Consultato il 2/04/2019
www.pastaria.it/contaminazione-microbica/