

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

---

DOTTORATO DI RICERCA IN

**Ingegneria Agraria**

Ciclo XXII

Settore scientifico-disciplinare di afferenza: **AGR09**

Titolo della tesi

**TRATTAMENTI AD ARIA CALDA PER LA  
DECONTAMINAZIONE SUPERFICIALE  
DELLE UOVA IN GUSCIO**

Presentata da **Dott.ssa Chiara Cevoli**

Coordinatore Dottorato

**Prof. Ing. Adriano Guarnieri**

Relatore

**Ing. Angelo Fabbri**

---

Esame finale anno 2010



# INDICE

INTRODUZIONE.....	1
CAPITOLO 1	
STATO DELL'ARTE	
La Salmonella come agente patogeno di origine alimentare .....	5
Salmonella: caratteristiche generali.....	6
Dinamica di contaminazione del guscio d'uovo .....	7
Tecniche di decontaminazione delle uova in guscio.....	8
Bibliografia.....	21
CAPITOLO 2	
CARATTERIZZAZIONE TERMOFISICA DEI COMPONENTI DELL'UOVO	
Introduzione.....	29
Materiali e metodi.....	30
Risultati e discussione.....	34
Bibliografia.....	36
CAPITOLO 3	
MODELLO NUMERICO PER IL TRATTAMENTO AD ARIA CALDA IN REGIME DI CONVEZIONE FORZATA DELLA SUPERFICIE DELL'UOVO IN GUSCIO	
Introduzione.....	37
Materiali e metodi.....	38
Risultati e discussione.....	48
Bibliografia.....	54
CAPITOLO 4	
PROTOTIPO PER IL TRATTAMENTO AD ARIA CALDA IN REGIME DI CONVEZIONE FORZATA DELLA SUPERFICIE DELLE UOVA IN GUSCIO	
Introduzione.....	57
Materiali e metodi.....	58
Risultati e discussione.....	68
Bibliografia.....	75

## CAPITOLO 5

### EFFETTI DEL TRATTAMENTO AD ARIA CALDA IN REGIME DI CONVEZIONE FORZATA SULLA QUALITÀ DELL'UOVO

Introduzione.....	77
Materiali e metodi.....	82
Risultati e discussione.....	89
Bibliografia.....	94

## CAPITOLO 6

### VALUTAZIONE DEL POTERE DECONTAMINANTE DEL TRATTAMENTO AD ARIA CALDA IN REGIME DI CONVEZIONE FORZATA: PROVE MICROBIOLOGICHE

Introduzione.....	95
Materiali e metodi.....	97
Risultati e discussione.....	101
Bibliografia.....	106

## CAPITOLO 7

### TRATTAMENTO AD ARIA CALDA IN REGIME DI CONVEZIONE NATURALE PER LA DECONTAMINAZIONE SUPERFICIALE DELLE UOVA IN GUSCIO

Introduzione.....	107
Materiali e metodi.....	108
Risultati e discussione.....	115
Bibliografia.....	121

## CAPITOLO 8

### STUDIO NUMERICO DEL FENOMENO DIFFUSIVO DELLA CO<sub>2</sub> ALL'INTERNO DELL'UOVO

Introduzione.....	123
Materiali e metodi.....	126
Risultati e discussione.....	141
Bibliografia.....	149

## INTRODUZIONE

Il Consiglio dell'Unione Europea (direttiva 1999/74/CE) ha definito per il 2012 gli standards minimi di benessere delle galline ovaiole. I sistemi di allevamento in gabbie tradizionali saranno sostituiti da allevamenti in gabbie modificate o a terra. Tuttavia queste tipologie di allevamenti incrementano potenzialmente il rischio di contaminazione delle uova in guscio da parte di batteri e parassiti con un successivo aumento della carica batterica che potrà diventare significativamente più elevata di quella presente su uova provenienti da allevamenti in gabbie convenzionali (EFSA 2005).

L'allevamento delle galline ovaiole in gabbia ha avuto storicamente più successo poiché consente un più agevole controllo dei problemi igienico-sanitari, in quanto l'animale è confinato in spazi più piccoli e non è a contatto con le deiezioni ed altri elementi presenti nell'ambiente. Grazie alla sua capacità unica di persistere durante i successivi cambiamenti che avvengono nell'ambiente e nella popolazione dei roditori, la *Salmonella* Enteritidis rappresenta, in Europa, il sierotipo più frequentemente isolato negli allevamenti di galline ovaiole (EFSA, 2007).

Negli ultimi due decenni, sia in Europa che in America, si è verificato un aumento dei casi di Salmonellosi associati al consumo di uova. Nel 2006, la *Salmonella* è stata responsabile del 53,9% dei casi segnalati di tossinfezione alimentare (EFSA, 2007). La Salmonellosi umana generalmente, è caratterizzata da febbre acuta, dolori addominali, nausea e talvolta vomito. I sintomi spesso sono lievi e la maggior parte delle infezioni sono limitate e della durata di pochi giorni. Tuttavia, in alcuni pazienti, l'infezione può essere più grave e la disidratazione può provocare la morte. La salmonellosi associata al consumo di uova è un importante problema di salute pubblica in tutto il mondo (Roberts et al., 1994). A questo proposito, dovrebbe essere prevista l'introduzione di misure efficaci per ridurre la contaminazione di uova in guscio da parte della *Salmonella* Enteritidis o altri

batteri patogeni e, quindi, prevenire qualsiasi potenziale rischio per la sicurezza del consumatore.

Negli Stati Uniti, al momento, il lavaggio delle uova è il trattamento più utilizzato per la decontaminazione della superficie dell'uovo. Questa tipologia di trattamento, per le uova di categoria A, è vietata in Europa (ad eccezione dei Paesi Bassi e Svezia) perché danneggia la cuticola e favorisce la penetrazione dei microrganismi all'interno dell'uovo. Infatti, anche se il lavaggio migliora l'aspetto delle uova e riduce la carica microbica presente sul guscio, le non corrette pratiche di lavaggio facilitano la penetrazione di *Salmonella* Enteritidis all'interno dell'uovo (Kim & Slavik, 1996).

Quindi, a dispetto della sua ampia applicazione commerciale, il lavaggio delle uova non elimina il rischio di trasmissione della salmonellosi.

Pertanto dovrebbero essere introdotti trattamenti alternativi per la decontaminazione delle uova in guscio. Con successo variabile, il mondo della ricerca ha studiato metodi alternativi (fisici e chimici) per inattivare la *Salmonella* spp. e la flora microbica naturalmente presente sulla superficie del guscio. Alcune di queste procedure di decontaminazione includono trattamenti con disinfettanti (Worley et al., 1992; Knape et al., 2001), perossido di idrogeno (Padron, 1995), ozono (Koidis et al., 2000), acqua idrolizzata (Russell, 2003), radiazioni ultraviolette (UV) (Kuo et al., 1997a), luce pulsata (Dunn, 1996), raggi gamma e raggi X (Tellez et al., 1995; Serrano et al., 1997), gas plasma (Davies & Breslin, 2003) e aria calda (Hou et al., 1996; James et al., 2002).

Le radiazioni inattivano in modo efficace la *Salmonella* Enteritidis presente nell'uovo, ma il trattamento provoca una drastica riduzione della qualità (Lith et al., 1995; MA, 1996). La pastorizzazione in acqua calda è una tecnologia approvata dal Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti ed è già stata introdotta in commercio per inattivare la *Salmonella* Enteritidis all'interno dell'uovo (USDA, 1997). Tuttavia, tempi di riscaldamento troppo prolungati

provocano la denaturazione delle proteine, con conseguente effetto negativo sulla torbidità dell'albume (Hou et al., 1996).

A questo proposito la pastorizzazione ad aria calda può rappresentare una valida alternativa per la decontaminazione della superficie delle uova in guscio, anche in relazione al divieto di utilizzare l'acqua in UE. Pochi studi sono stati pubblicati sull'impiego di questa tecnica, al fine di valutare il potere decontaminante. Hou et al. (1996) hanno osservato una riduzione della carica batterica di *Salmonella* Enteritidis di 5 log<sub>10</sub> su uova trattate con aria calda in forno a 55 °C per 180 minuti. James et al. (2002) hanno verificato l'applicabilità di un trattamento a flusso di aria calda per la pastorizzazione della superficie delle uova. Purtroppo tali autori non hanno valutato il potenziale decontaminante della tecnica tramite test microbiologici.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di sviluppare tecniche innovative per la decontaminazione superficiale delle uova in guscio basate sull'utilizzo di aria calda in regime di convezione naturale o forzata. Inizialmente sono stati sviluppati due modelli numerici CFD utili a studiare il trattamento ad aria calda, in regime di convezione forzata e naturale, della superficie di uova in guscio. Tali modelli hanno permesso di stimare la distribuzione ottimale della temperatura di pastorizzazione nell'uovo (interna ed esterna) nell'ottica di attenuare il rischio di coagulazione dell'albume durante il trattamento termico. In seguito è stato ideato e messo a punto un prototipo da laboratorio in grado di effettuare diverse tipologie di trattamento in termini di temperatura e velocità dell'aria calda, velocità dell'aria fredda, velocità di rotazione dell'uovo e durata del trattamento. Infine è stato valutato l'impatto dei trattamenti termici ad aria calda sulla qualità dell'uovo e il loro potere decontaminante su uova in guscio sperimentalmente infettate con *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*.



# CAPITOLO 1

## STATO DELL'ARTE

### **La Salmonella come agente patogeno di origine alimentare**

Le *Salmonella* spp. sono ampiamente presenti in natura e possono causare infezioni negli uomini e negli animali. La *Salmonella* è stato il primo batterio, nel 1888, ad essere identificato come causa di malattie provocate dall'ingestione di carne infettata (D'Aoust, 1989). Attualmente, la *Salmonella* spp. è considerata la causa di un elevato numero di tossinfezioni provocate dal consumo di acqua, uova pollame, ortaggi, frutta fresca, succhi di frutta in molti paesi sviluppati o in via di sviluppo (D'Aoust, 2001). La *Salmonella* è il più importato patogeno presente negli alimenti, si stima che annualmente si verifichino circa 1.4 milioni di infezioni e 600 casi di morte dovuti al consumo di alimenti contaminati con *Salmonella* (Mead et al., 1999). Inoltre, i casi di salmonellosi sono collegati ad un costo annuale di circa 2.3 miliardi di dollari (Frenzen et al., 1999).

Il genere *Salmonella* è diviso in due specie, *Salmonella enterica*, che comprende sei sottospecie, e *Salmonella bongori*; attualmente il genere comprende un totale di 2449 sierotipi. Popoff et al., (1998). La *Salmonella enterica*, sottospecie Enterica, è la sottospecie più diffusa nelle infezioni alimentari e provoca più del 99% dei casi di salmonellosi (Bell & Kyriakides, 2002). La *Salmonella enterica*, sierotipo Typhimurium LT2, è il tipo più resistente del genere, tuttavia tutti i sierotipi possono potenzialmente causare malattie nell'uomo (D'Aoust, 2001). La *Salmonella enterica*, sottospecie Enterica, può essere divisa in due categorie in base all'abilità specifica di infettare gli animali o l'uomo (Poppe, 1999). La *Salmonella* in grado di infettare l'uomo include la *Salmonella* Typhi Human che causa febbre tifoidea e la *Salmonella* Paratyph A, B, e C, che è responsabile della febbre paratifoidea (D'Aoust, 2001). Esempi di *Salmonella* capaci di infettare gli

animali sono la *Salmonella Choleraesuis* che causa enterocoliti, polmoniti e setticemia nei suini, la *Salmonella Pullorum* e la *Salmonella Gallinarum* che causano malattie nei polli e nei tacchini (Poppe, 1999). Si stima che circa 2400 sierotipi non adattati, riscontrati negli uomini e negli animali, siano responsabili di salmonellosi (Bell & Kyriakides, 2002). A partire dal 1940, c'è stata una forte crescita di casi isolati di sierotipi non adattati di *Salmonella* negli animali e nell'uomo (Guthrie, 1992). Nelle ultime due decadi, le malattie causate da *Salmonella enterica*, sottospecie Enteritidis, sono aumentate in tutto il mondo a causa dell'ingestione di uova contaminate che sono considerati la prima causa di salmonellosi nel mondo (Guard-Petter, 2001).

### **Salmonella: caratteristiche generali**

La *Salmonella* fa parte della famiglia delle *Enterobacteriaceae*, è un batterio Gram negativo, a bastoncello ( $0.7-1.5 \times 2.0-5.0$  mm), mobile e non sporigeno. La *Salmonella Pullorum* e la *Salmonella Gallinarum*, adattate al pollame, non sono mobili (D'Aoust, 1989; Bell & Kyriakides, 2002). Le Salmonelle sono batteri anaerobi facoltativi, produttori di gas da glucosio sono capaci di utilizzare il citrato come loro unica fonte di carbonio (D'Aoust, 1989). In aggiunta, comunemente le salmonelle producono idrogeno disolfuro, lisina e ornitina decarbossilasi, ma non urasi e triptofano (Bell & Kyriakides, 2002). La *Salmonella* spp. cresce a 2-47°C, l'intervallo di temperatura con maggiore velocità di crescita è 25-43°C (D'Aoust, 2001). La sua termoresistenza cresce a bassi valori di attività dell'acqua; tuttavia, in condizioni di elevata attività dell'acqua, la *Salmonella* Senftenberg, ceppo 775 W, è particolarmente termo resistente (D'Aoust, 2001; Bell & Kyriakides, 2002). Le *Salmonella* spp. Sono in grado di moltiplicarsi a pH 3.6-9.5, ma il loro optimum di crescita è a pH 6.5-7.5 (D'Aoust, 2001).

## **Dinamica di contaminazione del guscio d'uovo**

La contaminazione microbica degli impianti di allevamento delle galline ovaiole con agenti patogeni come la *Salmonella* spp gioca un ruolo chiave nella contaminazione delle uova in guscio. Jones et al. (1996), nel 72% dei campioni di uova prelevati in un impianto di lavorazione, hanno isolato più di otto diversi sierotipi di *Salmonella*. I sierotipi più diffusi sono risultati essere la *Salmonella* Heidelberg e la *Salmonella* Montevideo.

La contaminazione delle uova in guscio con *Salmonella* Enteritidis si verifica principalmente per contaminazione esogena (orizzontale) e per contaminazione endogena (verticale) (Humphrey et al., 1991, Braun & Fehlhaver, 1995; Fajardo et al., 1995). La contaminazione esogena è dovuta al contatto dell'uovo in guscio con ambienti contaminati e conseguente penetrazione di *Salmonella* attraverso i pori del guscio e successiva proliferazione all'interno dell'uovo (Hammack et al., 1993; Fajardo et al., 1995). Il contatto delle uova con il materiale fecale è una delle cause più frequenti di contaminazione da Salmonelle (Gast & Beard, 1990; Humphrey, 1994). La penetrazione e la successiva migrazione della *Salmonella* spp nel contenuto delle uova, possono essere facilitati da una serie di fattori che includono l'umidità del guscio d'uovo (Bruce & Drysdale, 1994), lo stoccaggio a temperatura ambiente (Rizk et al. 1966), lo stato di integrità del guscio (Humphrey et al., 1989; Todd, 1996) e lo stato di integrità della cuticola (Padron, 1990; Bruce e Drysdale, 1994).

La contaminazione verticale (endogena) si verifica quando le ovaie della gallina sono infettate con microrganismi, tra cui la *Salmonella*, che possono risalire l'ovidotto e quindi contaminare l'uovo durante la sua formazione (Fajardo et al., 1995 Thiagarajan, 1995; Humphrey, 1999). Studi basati sull'infezione artificiale e naturale delle galline ovaiole hanno messo in evidenza che, sia il tuorlo che l'albume possono essere contaminati da *Salmonella* Enteritidis per via endogena (Shivaprasad et al., 1990; Humphrey, 1994). Shivaprasad et al. (1990) ha osservato

che infettando le ovaie delle galline con *Salmonella Enteritidis* quest'ultima veniva trasmessa sia all' albume che al tuorlo. Tuttavia, Gast & Beard (1990) hanno dimostrato che galline infettate artificialmente con *Salmonella Enteritidis* producono uova contaminate sia nell' albume che nel tuorlo intero, ma non nel tuorlo interno, suggerendo quindi che il sito di contaminazione potrebbe essere la membrana vitellina situata attorno al tuorlo.

Humphrey et al. (1991) analizzando 5.700 uova in guscio e hanno determinato che la maggior parte delle uova contaminate (72%) conteneva meno di 20 cellule di *Salmonella Enteritidis*.

### **Tecniche di decontaminazione delle uova in guscio**

Il mondo della ricerca ha incominciato a prestare maggiore attenzione ai possibili metodi, fisici o chimici, per la decontaminazione delle uova in guscio solamente nell'ultimo decennio. I motivi di tale affermazione risiedono principalmente nel fatto che solo in Europa non è consentito il lavaggio delle uova come metodo di sanitizzazione e che negli ultimi due decenni si è verificato un aumento di casi di Salmonellosi associati al consumo di uova, sia in Europa che in America, in particolare di *Salmonella Enteritidis*.

Hou et al. (1996) in *Pasteurization of intact shell eggs* hanno pubblicato uno studio circa l'efficacia della pastorizzazione di uova inoculate artificialmente con *Salmonella Enteritidis*. Le tecniche che hanno proposto sono l'aria calda generata in forni a convezione e l'acqua calda (bagnomaria). Tali tecniche sono state utilizzate singolarmente o accoppiate per differenti condizioni di temperatura e durata del trattamento. Gli autori hanno concluso che uova trattate in acqua per 25 minuti a 57°C riportano una riduzione di  $3\log_{10}$ , mentre uova trattate con aria calda a 55°C per 180 minuti riportano un abbattimento di  $5\log_{10}$ . La combinazione delle due tecniche (acqua a 55°C per 25 minuti seguita da aria calda a 55°C per 60

minuti) produce una riduzione di  $7 \log_{10}$  in termini di *Salmonella* Enteritidis all'interno dell'uovo. Gli autori non hanno riportato differenze significative per i valori dell'indice di Haugh, di pH, ed indice del tuorlo e il colore, tra campione trattato e controllo, mentre hanno riportato differenze significative per parametri viscosità e torbidità dell'albume probabilmente a causa della denaturazione delle proteine. Lith et al. (1995) hanno proposto uno studio sull'inefficacia dei trattamenti ad acqua calda ( $57^{\circ}\text{C}$  per 20-30 minuti) per la pastorizzazione di uova inoculate internamente con  $10^1$ - $10^3$  *Salmonella* Enteritidis. Inoltre, gli stessi autori, hanno suggerito che trattamenti a temperature superiori ai  $57^{\circ}\text{C}$  della durata di più di 20 minuti possono causare fenomeni di coagulazione dell'albume e ridurre la qualità delle uova.

James et al. (2002) hanno pubblicato un interessante lavoro dal titolo *Surface pasteurization of shell eggs* circa l'applicazione di quattro differenti metodi di pastorizzazione (getto di aria calda, acqua bollente, radiazione infrarossa e vapore) per la decontaminazione superficiale delle uova. Lo scopo principale del lavoro è stato determinare la temperatura interna ed esterna al guscio al fine di identificare la massima temperatura applicabile senza danneggiare il contenuto interno dell'uovo. Le temperature e i tempi che hanno utilizzato sono i seguenti: aria calda  $180^{\circ}\text{C}$  per 8 secondi, acqua calda  $95^{\circ}\text{C}$  per 10 secondi, radiazione infrarossa  $210^{\circ}\text{C}$  per 30 secondi, vapore  $100^{\circ}\text{C}$  per 2 secondi.

In tale lavoro non sono state effettuate prove di tipo microbiologico, gli autori hanno valutato il potenziale decontaminante delle diverse tecniche solamente tramite confronto bibliografico.

I risultati di tale studio mettono in luce le potenzialità dei trattamenti termici come metodo di pastorizzazione della superficie delle uova. In particolare suggeriscono che è possibile raggiungere sulla parte esterna di un uovo temperature sufficienti per ridurre significativamente la carica microbica superficiale senza raggiungere internamente temperature utili all'attivazione della denaturazione delle proteine

dell'albume. Tuttavia, rimangono da indagare quelle che sono le reali resistenze termiche dei gusci e del contenuto dell'uovo.

L'efficacia dell'acqua bollente per l'inattivazione della *Salmonella* Enteritidis sulla superficie delle uova è stata valutata in precedenza anche da Gast et al. (1993). Tale autore ha concluso che uova inoculate con *Salmonella* Enteritidis PT13 ( $10^9$  UFC/ml), immerse in acqua bollente per 5 secondi, riportano livelli non rilevabili di microrganismi sul guscio. In uno studio simile, Himathongkham et al. (1999) hanno riportato che in uova inoculate con *Salmonella* Enteritidis ( $10^8$  UFC / ml) ed immerse in acqua bollente per 3 secondi, la carica microbica era sotto i livelli di rilevamento. Tuttavia, questi ricercatori hanno indicato che i trattamenti in acqua bollente possono provocare la rottura del guscio.

Davies & Breslin (2003), in uno studio dal titolo *Investigations into Possible Alternative Decontamination Methods for Salmonella enteritidis on the Surface of Table Eggs*, hanno investigato circa quattro tecniche alternative per la decontaminazione della superficie di uova contaminate artificialmente. In particolare hanno testato il gas plasma ad aria ionizzata, l'ozono in ambiente secco ed umido, il Protecta II (erba naturale con potenzialità antibatterica) e un prodotto commerciale chiamato Radical Waters Biocide contenente HClO, O<sub>3</sub>, HO e HO<sub>2</sub> (metodo chimico). Gli autori hanno concluso che tra le tecniche sperimentate solamente il Radical Waters Biocide ha mostrato un effetto decontaminante sulla superficie delle uova (riduzione di  $4\log_{10}$  di *Salmonella*). Il trattamento a base di gas plasma (20 minuti) ha prodotto un'inattivazione di circa il 15% , il trattamento ad ozono di circa 25% mentre l'utilizzo dell'erba antimicrobica non ha mostrato nessun effetto decontaminante.

Un plasma è un gas ionizzato composto da ioni, elettroni e particelle neutre. Ioni e neutroni sono considerati particelle pesanti e possono trovarsi in uno stato eccitato a causa dell'alta energia contenuta nel plasma. In contrasto coi gas ordinari, i

plasmi sono elettricamente conduttivi a causa della presenza di portatori di carica liberi.

La sterilizzazione con il plasma è una tecnica innovativa, alternativa alle convenzionali tecniche di sterilizzazione (Moisan et al., 2001). Questa tecnologia presenta alcuni vantaggi tra cui la possibilità di sterilizzare anche sistemi sensibili al calore. Secondo Pelletier, 1992, le specie attive nel plasma possono distruggere una vasta gamma di microrganismi o disturbare le loro funzioni attraverso reazioni con le proteine interne ed il materiale genetico. Ratner et al., (1990) hanno indicato che la sterilizzazione col plasma è efficiente con la maggior parte dei gas (per esempio ossigeno, azoto, aria, idrogeno, alogeno, anidride carbonica, acidi organici, aldeidi) qualunque sia il tipo di carica.

Berardinelli et al. (2009) hanno condotto uno studio sull'utilizzo di un generatore di plasma a RBD (resistive barrier discharge) per decontaminare la superficie delle uova in guscio da *Salmonella* Enteritidis. Le uova sono state trattate sotto la scarica dove la temperatura del gas era vicina a quella ambiente, minimizzando così il rischio di alterazioni dei componenti termolabili dell'uovo. I risultati hanno messo in luce il potere decontaminante del prototipo su uova inoculate con *Salmonella* Enteritidis, riportando una riduzione della carica batterica variabile tra 1 e 5 log<sub>10</sub> in funzione della durata del trattamento (0-90 minuti). Vannini et al. (2009) hanno testato il medesimo prototipo a RBD proposto da Berardinelli et al (2009), su uova inoculate con *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*. Tali autori hanno riportato una riduzione della carica batterica compresa tra 1.5 e 4 log<sub>10</sub> in funzione della specie microbica, del tempo di esposizione al gas plasma e dell'umidità relativa presente durante il trattamento.

Per quanto riguarda i metodi fisici grande interesse è stato rivolto anche all'utilizzo di diverse tipologie di radiazioni: gamma, UV, IR e microonde.

Per quanto riguarda le radiazioni gamma Tellez et al. (1995) hanno condotto uno studio incentrato sull'utilizzo di radiazioni gamma Cobalto-60 (<sup>60</sup>Co) a 2 kGy e a 3

kGy per inattivare la *Salmonella* Enteritidis presente sulla superficie delle uova. Tali autori hanno rilevato una riduzione massima di 8 log<sub>10</sub> collegata però ad un notevole scadimento qualitativo delle uova. Tale scadimento qualitativo è stato riscontrato anche nel trattamento da 1 kGy che comportava anche una efficacia minore a livello di abbattimento microbico (circa 4log<sub>10</sub>).

Ferrero & Del Maestro (1998) hanno proposto un lavoro circa i cambiamenti reologici che si possono riscontrare in uova di gallina irradiate. Tali autori hanno concluso che uova trattate con radiazioni gamma Cobalto-60 (<sup>60</sup>Co) a 5kGy non presentano alterazioni in termini di viscosità dell'albume e del tuorlo, ma riportano cambiamenti nel colore del guscio.

Serrano et al. (1997) hanno condotto uno studio sull'utilizzo dei raggi X a 0.5-1.5 kGy per inattivare la *Salmonella* dalle uova in guscio e ad hanno concluso che radiazioni a 0.5kGy sono sufficienti per inattivare il microrganismo fino a livelli non rilevabili.

Le radiazioni ultraviolette (UV) alla lunghezza d'onda di 254 nm hanno potenzialità decontaminanti nell'aria, nei liquidi e sulle superfici (Wong et al., 1998; Bintsis et al, 2000). Queste particolari radiazioni hanno il vantaggio di essere certamente meno invasive rispetto alle radiazioni gamma, di avere un'efficacia consistente verso i microrganismi, dei costi di impiego relativamente contenuti e di essere di semplice utilizzo.

Inoltre, alcuni studi, hanno evidenziato un potenziale decontaminante delle radiazioni UV in particolare sulla *Salmonella* spp. e i naturali contaminanti presenti sulla superficie delle uova (Latala & Dobrzanski, 1989; Berrang et al., 1995; Goerzen & Scott, 1995). Secondo Kou et al. (1997) le radiazioni UV a 620 μW/cm<sup>2</sup> hanno effettivamente diminuito la carica microbica di *Salmonella* Typhimurium presente sulla superficie dell'uovo di 2,4 log<sub>10</sub> in 5 minuti. Un ulteriore studio di Kou et al. (1997) riporta che la rotazione dell'uovo a 1 rpm durante l'esposizione alle radiazioni UV migliora, in modo significativo,

l'inattivazione microbica ( $4,350 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  per 20 minuti con inattivazione di  $2,5 \log_{10}$  della microflora naturale).

Bailey et al. (1996) hanno riportato che trattamenti con raggi UV a  $146 \mu\text{W}/\text{sec}$ , della durata di tre giorni, non hanno effetto decontaminante su uova inoculate con *Salmonella* Typhimurium.

Un recente studio di Rodríguez et al. (2005) ha messo in evidenza le potenzialità dell'utilizzo dei raggi UV combinati con l'ozono in forma gassosa per la decontaminazione superficiale delle uova. Gli autori hanno utilizzato raggi UV da  $100$  a  $2500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  per un tempo compreso tra 0 e 5 minuti e ozono gassoso da 0 a  $15 \text{ lb}/\text{in}^2$  per un tempo compreso tra 0 e 20 minuti per trattare uova contaminate artificialmente con *Salmonella* Enteritidis. Tali tecniche sono state utilizzate sia singolarmente o in modo combinato. I risultati hanno mostrato una riduzione significativa della carica batterica sulle uova trattate (riduzioni fino a  $5.9 \log_{10}$ ). Bisogna precisare che in tale lavoro gli autori non hanno considerato i possibili effetti negativi del trattamento sulle proprietà qualitative delle uova.

All'interno dei metodi fisici, applicabili come tecniche di decontaminazione, le microonde rappresentano una buona alternativa, ma sono pochi gli studi riguardanti la pastorizzazione dell'uovo in guscio con microonde.

I sistemi di pastorizzazione a flusso di microonde sono effettuati attraverso un generatore di un campo elettromagnetico combinato con aspersione di acqua. Il campo magnetico generato avrà frequenza ed intensità tali da eccitare la molecola di acqua. I metodi di pastorizzazione con flusso di microonde, a causa dei potenziali benefici dovuti ai tempi ridotti di esposizione termica necessari per inattivare i microrganismi patogeni, mantengono un'elevata qualità del prodotto e per questo hanno generato molto interesse nell'industria delle bibite. Esistono vari studi riguardanti il succo di mele (Tajchakavit, et al. 1998) ed il latte (Nikdel et al. 1993). Molte ricerche hanno messo a fuoco l'inattivazione microbica (Fujikawa et al. 1992) ed enzimatica dovuta alla pastorizzazione con microonde.

Per quanto riguarda l'utilizzo delle microonde come tecnica di pastorizzazione delle uova, Stadelman et al. (1996) hanno pubblicato un interessante studio sull'utilizzo combinato dei forni a convezione (55°C) o dell'acqua (57°C) e dei forni a microonde. Gli autori hanno trattato uova con tuorlo inoculato con  $10^7$  *Salmonella* Enteritidis riportando una riduzione della carica microbica di  $7 \log_{10}$  dopo 120 minuti di trattamento combinato forno a convezione-microonde e dopo 30 minuti di trattamento combinato acqua e microonde. Gli autori hanno anche aggiunto che tali trattamenti non hanno effetti negative sulla qualità dell'uovo. Tuttavia, anche se il riscaldamento a microonde è efficace e veloce, risulta non essere uniforme e difficilmente applicabile a livello commerciale (Schuman et al. 2000).

Dev et al. (2007), hanno pubblicato un lavoro dal titolo *Dielectric properties of egg components and microwave heating for in-shell pasteurization of egg*. In tale studio sono stati valutati gli effetti della temperatura (0-62°C) e della frequenza (200 MHz- 1GHz) delle microonde sulle proprietà dielettriche dei componenti interni dell'uovo, ma non è stata effettuata nessuna valutazione di tipo microbiologico (potenziale decontaminante). Gli autori hanno concluso che, a livello di temperature raggiungibili, il trattamento proposto è paragonabile al metodo dei bagni in acqua calda.

Degno di nota è lo studio condotto da Dunn (1996) che ha testato l'efficacia della luce pulsata su uova precedentemente contaminate con *Salmonella*. La luce pulsata è caratterizzata da brevi flashes di luce emessa a lunghezze d'onda appartenenti agli UV (25%), al visibile (45%) e alle radiazioni infrarosse (30%). I flashes di luce sono molto brevi (200-300  $\mu$ s) e la loro intensità è circa ventimila volte quella della luce del sole. La luce pulsata è prodotta attraverso la conversione di corrente alternata in corrente continua ad alto voltaggio in una lampada tubolare. Questa tecnologia è risultata essere vantaggiosa sia in termini di tempo (meno di un secondo di trattamento con  $4 \text{ J/cm}^2$  di luce pulsata) che di efficacia

(abbattimento di  $8 \log_{10}$ ), non solo a livello della superficie del guscio ma anche dei pori (Dunn, 1996). Hierro et al (2009) hanno studiato gli effetti decontaminanti della luce pulsata ( $4-12 \text{ J/cm}^2$ ) su uova inoculate sperimentalmente con *Salmonella* Enteritidis. Gli autori hanno concluso che la presenza della cuticola sul guscio gioca un ruolo fondamentale sul potere decontaminante della tecnica in quanto la sua presenza ne accentua l'effetto.

Un limite della tecnica lo si trova nel relativo costo della tecnica (Brackett et al. 2000), nel controllare il riscaldamento dell'alimento e nell'omogeneità del trattamento (Gomez-Lopez et al. 2007).

Nell'ambito delle tecniche di decontaminazione è necessario prestare attenzione anche ai metodi chimici. Sicuramente il metodo chimico più importante è il lavaggio.

L'obiettivo principale del lavaggio è rimuovere i contaminanti dalla superficie dell'uovo, migliorare l'aspetto visivo e la qualità (Zeidler, 2001). Il lavaggio è una tecnica regolarmente utilizzata in USA, obbligatoria secondo il piano di produzione della Federal Grading Service (USDA, 1966; 2003). Le moderne tecniche di lavaggio utilizzano acqua contenente sanitizzanti e detergenti utili a ridurre la carica microbica presente sull'uovo. Anche se il lavaggio delle uova è una procedura abituale in USA, Canada, Australia e più recentemente in Giappone, è proibita in Europa per le uova di classe A (Bartlett et al., 1993; Zeidler, 2001; Hutchison, et al. 2003; 2004).

Il lavaggio delle uova è un processo continuo e segue quattro fasi principali: bagnatura, lavaggio, risciacquatura e asciugatura (Hutchison et al., 2003).

Durante la bagnatura l'uovo è soggetto a spruzzi di acqua calda utili a rimuovere dalla superficie la materia fecale.

Durante il lavaggio l'uovo viene spazzolato e spruzzato con acqua a temperatura di  $37.8-46.1^\circ\text{C}$  contenente detergenti per rimuovere materiale presente sul guscio e mantenere l'alcalinità dell'acqua a pH di circa 11 (Zeidler, 2001). La temperatura

dell'acqua deve essere almeno 11°C maggiore della temperatura dell'uovo; l'uovo non deve essere immerso nell'acqua durante il processo di lavaggio per prevenire la penetrazione dei microrganismi all'interno (Zeidler, 2001; USDA, 2003). Composti a base di oli minerali sono aggiunti all'acqua per prevenire la formazione di schiuma; l'acqua di lavaggio deve essere sostituita ogni 4 ore per mantenere le condizioni igieniche (Zeidler, 2001).

Lo step successivo è il risciacquo durante il quale le uova vengono spruzzate con acqua a 60°C contenente 50-200 ppm di cloro o composti di ammonio quaternario (Hutchison et al., 2003; USDA, 2003).

L'ultimo step è l'asciugatura che include la rimozione meccanica dell'acqua dalla superficie dell'uovo (USDA, 2003).

L'efficacia del lavaggio dipende da una serie di fattori che includono in particolare, la qualità, la temperatura e il pH dell'acqua, le caratteristiche dei sanitizzanti e dei detergenti utilizzati durante il processo (Moats, 1978; Stadelman, 1995). Zeidler et al. (2001) hanno dimostrato che durante un processo ottimale di lavaggio la carica microbica presente sul guscio si riduce di 2-3 log<sub>10</sub>.

Altri studi attribuiscono alle condizioni di lavaggio la qualità microbica dell'acqua e l'efficacia della procedura nel ridurre la carica microbica di *Salmonella* spp. presente sulla superficie (Moats, 1979; Bartlett et al., 1993; Hutchison et al., 2003). Precedentemente, Anellis et al. (1954) e Cotterill (1968) hanno dimostrato che la *Salmonella* spp. era meno resistente al calore a pH alcalini. Holley & Proloux (1986) hanno riportato che la *Salmonella* spp. proliferava in acqua a 38-42°C se il pH era minore di 9.5. Kinner & Moats (1981) hanno dimostrato che la carica batterica diminuiva sul guscio delle uova lavate con acqua a pH 11 senza tener conto della temperatura. Catalano & Knabel (1994) hanno riportato che la *Salmonella* Enteritidis è stata inattivata sui gusci di uova lavate con acqua a pH 11 e successivamente raffreddati. Worley et al. (1992) hanno testato l'attività antimicrobica di composti a base di N-alamina contro la *Salmonella* Enteritidis presente sul guscio d'uovo e hanno riportato che i composti 1-bromo-3-chloro-

2,2,5,5-tetramethylimidazolidin-4-one (DBC) e 1,3-dichloro-2,2,5,5-tetramethylimidazolidin-4-one (DC) sono stati più efficaci rispetto al cloro contro i microrganismi. Kim and Slavik (1996) hanno lavato le uova con composti a base di ammonio quaternario e hanno concluso che tali composti riducono al massimo di  $1.2 \log_{10}$  la carica microbica di *Salmonella* Enteritidis. Inoltre questi ricercatori hanno notato effetti negativi sulla cuticola.

Altri metodi chimici, quale l'utilizzo del perossido d'idrogeno, dell'ozono e dell'acqua idrolizzata, sono stati parzialmente efficaci nel decontaminare la superficie delle uova.

Altri autori, oltre a Davies e Breslin (2003) (descritto in precedenza in riferimento a *Investigations into Possible Alternative Decontamination Methods for Salmonella enteritidis on the Surface of Table Eggs* ) hanno testato le potenzialità decontaminanti dell'ozono, in fase acquosa e gassosa, su uova naturalmente o artificialmente contaminate con *Salmonella*. Whistler & Sheldon (1988) hanno riportato che, trattamenti della durata di 2 ore con ozono al 3% in fase acquosa, producono una inattivazione della flora microbica sulla superficie dell'uovo di  $2.5 \log_{10}$ . Bailey et al. (1996) invece, trattando per tre giorni uova contaminate artificialmente con *Salmonella* Typhimurium, hanno testato l'efficace dell'ozono gassoso a 0.2-0.4 ppm. Gli autori hanno concluso che dopo il trattamento, sul 91% delle uova era ancora presente il microrganismo.

Koidis et al. (2000) hanno indagato circa l'effetto decontaminante dell'ozono acquoso (1.4-3.0 ppm), per due temperature di trattamento, sulla *Salmonella* Enteritidis presente sul guscio d'uovo. Tali autori hanno riportato che, trattamenti a 22°C con 1.4-ppm di ozono, diminuiscono la carica microbica di  $1 \log_{10}$  in 90 sec. Perry et al. (2008) hanno valutato l'effetto decontaminante del calore combinato all'ozono gassoso su uova inoculate sperimentalmente con *Salmonella* Enteritidis. Le uova sono state sottoposte al riscaldamento per immersione (57°C per 21 min), al trattamento con ozono (vuoto a 67.5 kPa, seguita da ozonizzazione ad una concentrazione massima  $140 \text{ g di ozono m}^{-3}$  e 184-198 kPa per 40 min) o alla

combinazione dei due trattamenti. L'ozono e l'ozono combinato al calore hanno ridotto la carica microbica rispettivamente di 0.11 log<sub>10</sub> e 4.2 log<sub>10</sub>.

L'acqua contenente radicali (acqua idrolizzata) con attività antimicrobica può essere generata dal passaggio di acqua mineralizzata in una cella elettrochimica, che produce cariche positive di acqua contenente ipoclorito, ozono, e radicali idroperossile (HO<sub>2</sub>·) e idrossile (·OH) (Davies & Breslin, 2003). In relazione all'utilizzo di soluzioni idrolizzate, Rusell (2003) ha studiato gli effetti di una soluzione salina (20%) elettrolizzata contenente 8-ppm di cloro libero (pH 2.1; 1,150 mV potenziale redox) su uova contaminate artificialmente con *Salmonella* Typhimurium. Il trattamento è avvenuto tramite uno spray ed è durato 24 ore. Gli autori hanno riportato un'inattivazione del microrganismo di 4-6 log<sub>10</sub>. Davies & Breslin (2003) in un lavoro citato in precedenza, hanno trattato con acqua idrolizzata contenente radicali e cloro, uova contaminate con *Salmonella* Enteritidis. Questi ricercatori hanno determinato una riduzione della carica batterica di 4log<sub>10</sub>.

Il trattamento con perossido di idrogeno è stato testato per l'inattivazione di *Salmonella* su gusci di uova da cova (Padron, 1995; Cox et al., 2000). Padron (1995) ha concluso che il trattamento di uova contaminate esternamente con *Salmonella* Typhimurium, in immersione di perossido di idrogeno al 6%, determina una riduzione del 95% della carica microbica. In aggiunta, questo ricercatore ha indicato che l'applicazione di una pressione di 16-psi durante il trattamento, aumentava la penetrabilità del sanitizzante attraverso i pori del guscio. Bailey et al. (1996) hanno riportato una riduzione del 55% della carica batterica di *Salmonella* Typhimurium presente sul guscio dopo trattamento con perossido di idrogeno al 2,5%, per un periodo di 3 giorni. Cox et al. (2000) hanno determinato una riduzione della carica microbica di *Salmonella* Typhimurium del 65% e del

33% su uova trattate rispettivamente con perossido di idrogeno (1,4%) e con un tensioattivo a pressione atmosferica.

Nell'ultimo decennio sono stati pubblicati alcuni studi sull'utilizzo dei metodi numerici per l'analisi dei processi termici delle uova. Tenendo conto della complessità del sistema in esame, i metodi numerici rappresentano un utile approccio per la valutazione dei processi di trasferimento di calore durante la pastorizzazione delle uova in guscio. Diversamente dalle soluzioni analitiche approssimative, i metodi numerici consentono di trattare con geometrie complesse, con distribuzioni di temperature non omogenee, condizioni al contorno e proprietà fisiche variabili. L'analisi CFD (*Computational Fluid Dynamics*) costituisce una base solida per predire i profili transitori di velocità e di temperatura, all'interno dell'uovo, durante i trattamenti di pastorizzazione.

Denys et al. (2003) hanno pubblicato un lavoro sulla determinazione del coefficiente di convezione termica sulla superficie di un uovo durante un trattamento ad aria calda. In tale studio hanno utilizzato un modello CFD combinato ad un metodo sperimentale. In particolare la metodologia ha seguito tre fasi: 1) determinazione del profilo dell'uovo tramite fotografie digitali; 2) generazione di una geometria computazionale; 3) stima dei profili di temperatura in uova riempite con un fluido conduttivo. I profili CFD sono stati confrontati con i dati sperimentale ed è stato determinato il coefficiente di convezione termica attraverso una procedura di ottimizzazione. Il modello sviluppato in questo studio è servito come base per ulteriori ricerche sulla simulazione dei profili di temperatura durante la pastorizzazione di uova in guscio.

Utilizzando sempre i metodi della fluidodinamica computazionale, Denys, et al (2004) hanno analizzato i profili termici e di velocità presenti nell'albume relativi ad un trattamento di pastorizzazione in acqua calda delle uova in guscio. I profili termici calcolati sono risultati in buon accordo con i dati sperimentali osservati su uova di differenti dimensioni. Il confronto con i dati sperimentali ha dimostrato che le correnti convettive nel tuorlo sono trascurabili e che lo scambio termico

avviene solo per conduzione. Nell'albume, invece, lo scambio termico è guidato anche da fenomeni di convezione naturale. Comunque i movimenti convettivi naturali all'interno dell'uovo comunque, non hanno influenzato il valore del coefficiente di convezione relativo alla superficie dell'uovo. Per la valutazione del potenziale decontaminante del processo di pastorizzazione, gli autori hanno inserito nell'analisi CFD un modello cinetico di morte della *Salmonella* Enteritidis. I tempi e le temperature minime necessarie per determinare una riduzione della carica batterica di  $5 \log_{10}$  sono stati ottenuti su base teorica. Gli autori hanno concluso che la combinazione dell'analisi CFD e dei modelli cinetici di inattivazione può essere utile per valutare il fenomeno della pastorizzazione delle uova in guscio.

Sabliov et al. (2002) hanno pubblicato uno studio sullo sviluppo di un modello ad elementi finiti sul trasferimento del calore durante il raffreddamento criogeno di uova in guscio. L'uovo è stato considerato di forma ellittica, composto da tuorlo, albume, camera d'aria e guscio, ciascuno dei quali isotropo. I profili di temperatura simulati sono risultati essere in buon accordo con i dati sperimentali.

Lin et al. (1999), tramite un modello assialsimmetrico ad elementi finiti, hanno studiato l'effetto di diversi livelli di raffreddamento e delle caratteristiche dimensionali dell'uovo sulla pressione indotta dai fenomeni termici. Tali autori hanno concluso che le caratteristiche geometriche dell'uovo influiscono significativamente sui fenomeni di rottura dello stesso durante il raffreddamento.

## **Bibliografia**

- Anellis, A., Lubas, J., & Rayman, M.M.. (1954) Heat resistance in liquid eggs of some strains of the genus *Salmonella*. *Food Research*. 19, 377-395.
- Bailey, J.S., Buhr, R.J., Cox, N.A., & Berrang, M.E. (1996). Effect of hatching cabinet sanitation treatments on *Salmonella* cross-contamination and hatchability of broiler eggs. *Poultry Science* 75, 191-196.
- Bartlett, F.M., Laird, J.M, Addison, C.L., & Mckellar, R.C.. (1993) The analysis of egg wash water for the rapid assessment of microbial quality. *Poultry Science* 72, 1584-1591.
- Bell, C., & Kyrikiades, A.. (2002) *Salmonella*. Blackwell Science Ltd., London.
- Berardinelli, A., Ragni, L., Vannini, L., Montanari, C., Sirri, F., Guarnieri, A., & Guerzoni, M.E. (2009) Atmospheric-pressure gas plasma for decontamination of food products. *XXXIII CIOSTA - CIGR V Conference "Technology and management to ensure sustainable agriculture, agro-systems, forestry and safety"* Reggio Calabria (Italy)
- Berrang, M.E, Cox N.A., Bailey J.S., & Buhr R.J. (1995). Efficacy of ultra violet light treatment for elimination of *Salmonella* on hatching eggs. *Poultry Science*. 4, 422-429.
- Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Robinson, R.K. (2000). Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80, 637-645.
- Brackett, R. (2000) Commercial processing technologies. Presented on the 6th annual symposia series on food safety in the 21st century: Shell eggs and egg products – safety issues. *Inst. Food Technologists, Chicago, IL, May 18*.
- Braun, P., & Felhaber, K.. (1995) Migration of *Salmonella* Enteritidis from the albumen into the egg yolk. *International Journal of Food Microbiology*. 25, 95-99.
- Bruce, J., & Drysdale, E.M. (1994). Trans-shell transmission. In R.G. Board and R. Fuller (ed.), *Microbiology of the avian egg*. Chapman and Hall, New York. 63-91.

Catalano, C.R., & Knabel, S.J. (1994). Destruction of Salmonella Enteritidis by high pH and rapid chilling during simulated commercial egg processing. *Journal of Food Protection* 57, 592-595.

Cotterill, O.J. (1968) Equivalent pasteurization temperatures to kill Salmonella in liquid egg white at various pH levels. *Poultry Science*. 72, 1584-1591.

Cox, N.A., Berrang M.E, Buhr R.J., & Bailey J.S. (2000). Bactericidal treatment of hatching eggs IV. Hydrogen peroxide applied with vacuum and a surfactant to eliminate *Salmonella* from hatching eggs. *The Journal of Applied Poultry Research*. 9, 530-534.

D'Aoust, J.-Y. (1989). Salmonella. In M.P. Doyle (ed) *Foodborne bacterial pathogens*, Marcel Dekker, New York; 327-445.

D'Aoust, J.-Y. (2001). Salmonella. In R.G. Labbé, and S. Garcia (ed) *Guide to foodborne pathogens*, Wiley-Interscience, New York; 163-191

Davies, R.H., & Breslin, M. (2002). Investigations into possible alternative decontamination methods for Salmonella enteritidis on the surface of table eggs. *Journal of Veterinary Medical Education* 50, 38-41.

Denys S., Pieters, J.G., Dewettinck, K. (2003). Combined CFD and experimental approach for determination of the surface heat transfer coefficient during thermal processing of eggs. *Journal of Food Science* 68, 943-951.

Denys S., Pieters, J.G., Dewettinck, K. (2004). Computational fluid dynamics analysis of combined conductive and convective heat transfer in model eggs. *Journal of Food Engineering* 63, 281-290.

Denys, S., Pieters, J.G., Dewettinck, K. (2005). Computational fluid dynamics analysis for process impact assessment during thermal pasteurization of intact eggs. *Journal of Food Protection* 68, 366-374.

Dev, R.S.S., Orsat, V., Gariépy, Y., & Raghavan G.S.V. (2007) Physical Properties of Egg White after In-Shell Pasteurization by using Microwave or by Immersion in Hot Water *ASABE Annual International Meeting*

Dev, S.R.S., Raghavan, G.S.V, & Gariépy, Y.(2008). Dielectric properties of egg components and microwave heating for in-shell pasteurization of eggs. *Journal of Food Engineering*. 86, 207-214.

Direttiva 1999/74/CE del Consiglio. *Gazzetta ufficiale n. L 203 del 03/08/1999.0053-0057.*

Dunn, J. (1996). Pulsed light and pulsed electric field for foods and eggs. *Poultry Science*. 75, 1133-1136

European Food Safety Authority. (2005). The welfare aspects of various systems of keeping laying hens. *The EFSA Journal* 197, 1-23

European Food Safety Authority. (2007). Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of Salmonella in holdings of laying hen flocks of Gallus gallus. *The EFSA Journal*, 97

Fajardo, T.A., Anantesawaran, R.C., Pur, V.M, & . Knabel, S.J. (1995) Penetration of Salmonella Enteritidis into eggs subjected to rapid cooling. *Journal of Food Protection*. 58, 473-477.

Ferrero, F.S.L., & Del Maestro, N.L. (1998). Rheological changes in irradiated chicken eggs. *Radiation Physical Chemistry* 52, 59-62.

Frenzen, P.D., Buzby, J.C., & Roberts, T. (1999). An updated estimate of the economic costs of human illness due to foodborne Salmonella in the United States. *Proceedings of the 3rd. international symposium on the epidemiology and control of Salmonella in pork*, August, Washington, D.C.

Fujikawa, et al., (1992) Kinetics of Escherichia coli Destruction by Microwave Irradiation. *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 920-924.

Gast, R.K. & Beard, C.W. (1990) Production of Salmonella Enteritidis contaminated eggs by experimentally infected hens. *Avian Diseases*. 34,438-446.

Gast, R.K. & Beard, C.W. (1992) Detection and enumeration of Salmonella Enteritidis in fresh and stored eggs laid by experimentally infected hens. *Journal of Food Protection*. 55, 152-156.

Gast, R.K. (1993) Immersion in boiling water to disinfect egg shells before culturing egg contents for Salmonella Enteritidis. *Journal of Food Protection*. 56, 533-535.

Goerzen, P.R., & Scott, T.A.. (1995) Ultraviolet light sanitation for broiler hatching eggs. *Poultry Science* 74, 83.

- Gòmez, L.V.M., Ragaert, P., Debevere, J., & Devlieghere, F. (2007). Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends in Food Science & Technology* 18, 464-473.
- Guard-Petter, J. (2001) The chicken, the egg and Salmonella Enteritidis. *Environmental Microbiology*. 3, 421-430.
- Guthrie, R.K. (1992) *Salmonella*, CRC, Boca Raton, FL.
- Hammack, T.S., Sherrod, P.S., Bruce, V.R., June, G.A. Satchel, F.B., & Andrews, W.H. (1993). Growth of Salmonella Enteritidis in grade A eggs during prolonged storage. *Poultry Science*. 72, 373-377.
- Hierro, E., Manzano, S., Ordóñez, J.A., de la Hoz, L., & Fernández, M. (2009) Inactivation of Salmonella enterica serovar Enteritidis on shell eggs by pulsed light technology. *International Journal of Food Microbiology* 135,125–130
- Himathongkhama, S., Riemanna, H., & Ernstb, R. (1999). Efficacy of disinfection of shell eggs externally contaminated with *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology* 49, 161–167.
- Holley, R.A. & Proloux, M. (1986) Use of egg washwater pH to prevent survival of Salmonella at moderate temperatures. *Poultry Science*. 65, 922-928
- Hou, H., Singh R.K., Muriana, P.M. & Stadelman W.J. (1996). Pasteurization of intact shell eggs. *Food Microbiology*. 13, 93–101.
- Humphrey, T.J. (1994) Contamination of eggs with potential human pathogens, In R.G. Board and R. Fuller (ed.), *Microbiology of the avian egg*. Chapman and Hall, New York. 93-116.
- Humphrey, T.J. (1999) Contamination of eggs and poultry meat with Salmonella enterica serovar Enteritidis. In A.M. Saeed, R.K.Gast, M.E. Potter, and P.G. Wall (ed.), *Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals: epidemiology, pathogenesis, and control*, Iowa State University Press, Ames.183-192
- Humphrey, T.J., Baskerville, A., Mawer, S.L, Rowe, B., & Hopper, S. (1989) Salmonella Enteritidis PT4 from the contents of intact eggs: a study involving naturally infected hens. *Epidemiology and Infection*. 103, 415-423.

- Humphrey, T.J., Whitehead, A., Gawler, A.H.L, Henley, A., & Rowe, B.. (1991) Numbers of Salmonella Enteritidis in the contents of naturally contaminated hen's eggs. *Epidemiology and Infection*.106, 489-496.
- Hutchison, M.L., Gittins, J., Walker, A., Moore, A., Burton, C., & Sparks,N. (2003) Washing table eggs: a review of the scientific and engineering issues. *World's Poultry Science Journal*, 59, 233-248.
- Hutchison, M.L., Gittins, J., Walker, A., Sparks, N., Humphrey, T.J, Burton, C., & Moore, A. (2004) An assessment of the microbiological risks involved with egg washing under commercial conditions. *Journal of Food protection*. 67, 4-11.
- James, C., Lechevalier, V., & Ketteringham, L. (2002). Surface pasteurisation of shell eggs. *Journal of Food Engineering*. 53, 193–197.
- Jones, F.T., D.V. Rives, & J.B. Carey. (1995) Salmonella contamination in commercial eggs and an egg production facility. *Poultry Science*. 74, 753-757.
- Kim, J.-W & Slavik, M.F. (1996) Changes in eggshell surface microstructure after washing with cetylpyridinium chloride or trisodium phosphate. *Journal of Food protection*. 59, 859-863.
- Kinner, J.A. & Moats, W.A. (1981) Effect of temperature, pH, and detergent on the survival of bacteria associated with shell eggs. *Poultry Science*. 60,761-767.
- Koidis, P., Bori, M, & Vareltzis, K. (2000) Efficacy of ozone treatment to eliminate Salmonella Enteritidis from eggshell surface. *Arch. Lebensmittelhyg*. 51, 4-6.
- Kuo, F.L., Carey J.B, & Ricke S.C.. (1997). UV irradiation of shell eggs: effect on populations of anaerobes, molds, and inoculated Salmonella Typhimurium. *Journal of Food Protection*. 60, 639-643.
- Latala, A., & Dobrzanski Z. (1989). Effect of ultraviolet radiation on the microbiological contamination of the shells of eggs for human consumption. *Med. Wet*. 45, 420-422.
- Lin, J., Puri, V.M., Anantheswaran, R.C., (1999). Finite element analysis of stresses during cooling of eggs with different physical characteristics. *American Society of Agricultural Engineers*, 15,: 509-513
- Lith, L.A.J.T. van, Putirulan, F.F., & Mulder, R.W.A.W. (1995) Pasteurization of table eggs to eliminate Salmonellae. *Arch. Geflügelk*. 59, 157-160.

- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., & Tauxe, R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5, 607-625.
- Moats, W.A. (1978) Egg washing-a review. *Journal of Food Protection*. 41, 919-92
- Nikdel, S., Chen, C.S., Parish, M. E., Mackellar, D.G., & Friedrich L.M. (1993) Pasteurization of citrus juice with microwave energy in a continuous-flow unit. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 41, 2116-2119.
- Padron, M.N. (1990) Salmonella Typhimurium penetration through the eggshell of hatching eggs. *Avian Disease*. 34, 463-465.
- Padron, M. (1995) Egg dipping in hydrogen peroxide solution to eliminate Salmonella Typhimurium from eggshell membranes. *Avian Disease*. 39, 627-639.
- Perry, J.J., Rodriguez-Romo, L.A., & Yousef, A.E. (2008) Inactivation of Salmonella enterica serovar enteritidis inshell eggs by sequential application of heat and ozone. *Applied Microbiology*. 46, 620-625.
- Popoff, M.Y., J. Bockemül, & Brenner F.W. (1998) Supplement 1997 (no. 41) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*. 149, 601-604.
- Poppe, C. (1999). Epidemiology of Salmonella enterica serovar Enteritidis. In A.M. Saeed, P.K. Gast, M.E. Potter, and P.G. Wall (ed.) *Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals*. Iowa State University Press. Ames, IA. 3-18.
- Rizk, S.S., Ayres, J.C., & Craft, A.A. (1966) Effect of holding condition on the development of salmonellae in artificially inoculated hens' eggs. *Poultry Science*. 45, 823-829.
- Rodríguez, R.R.L. (2004) Control of Salmonella enterica serovar enteritidis in shell eggs by ozone, ultraviolet radiation and heat. *phD Dissertation The Ohio State University*.
- Roberts, J. A., Sockett, P. N. (1994). The socio-economic impact of human Salmonella enteritidis infection. *International Journal of Food Microbiology*. 21, 117-129

Rodríguez, R.R.L., & Yousef A.E. (2005) Inactivation of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis on Shell Eggs by Ozone and UV Radiation *Journal of Food Protection*. 4, 711–717

Russell S. M. (2003). The effect of electrolyzed oxidative water applied using electrostatic spraying on pathogenic and indicator bacteria on the surface of eggs. *Poultry Science*. 82, 158-162.

Serrano, L.E., Murano, E.A., Shenoy, K., & Olson, D.G.. (1997) D values of *Salmonella* Enteritidis isolates and quality attributes of shell eggs and liquid whole eggs treated with irradiation. *Poultry Science* 76, 202-205

Shama, G. (2000) Ultraviolet light. In R.K. Robinson, C. Batt, and P. Patel (ed.) *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, London. 2208-2214

Shivaprasad, H.L., Timoney J.F., Morales, S., Lucio, B., & Baker, R.C.(1990) Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis infection in laying chickens. I. Studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding, and serological responses. *Avian Disease*. 34, 548-557.

Sabliov, C.M., Farkas, B.E., Keener, K.M., & Curtis, P.A. (2002). Cooling of shell eggs with cryogenic carbon dioxide: a finite element analysis of heat transfer. *Lebensmittel-Wissenschaft und—Technologie*, 35, 568–574

Stadelman, W.J. (1995). The egg industry, In W.J. Stadelman, and O.J. Cotterill (ed.), *Egg science and technology*. The Haworth Press, New York.

Stadelman, W.J., Singh, R.K., Muriana, P.M., & Hou, H. (1996) Pasteurization of eggs in the shell. *Poultry Science*. 75, 1122-1125.

Tajchakavit, S., Ramaswamy, H.S. & Fustier, P. (1998). Enhanced destruction of spoilage microorganisms in apple juice during continuous flow microwave heating. *Food Research International* 31, 713-722

Tellez, I.G., Trejo, R.M., Sanchez, R. E., Cenicerros, R. M., Luna, Q., Zazua P., & Hargis, B.M. (1995). Effect of gamma irradiation on commercial eggs experimentally inoculated with *Salmonella*. *Radiation Physical Chemistry*. 46, 789-792.

Thiagarajan, D. (1995) *Studies on the mechanism of transovarian transmission of Salmonella Enteritidis in laying hens*. Ph.D. thesis. Purdue University, West Lafayette.

Todd, E.C.D. (1996) Risk assessment of use of cracked eggs in Canada. *International Journal of Food Microbiology*. 30, 125-143.

USDA. 1966. Improved methods, techniques and equipment for cleaning eggs. Marketing Research Report No. 757.

USDA, Agricultural Marketing Service. 1997. Pasteurized shell eggs (pasteurized in-shell eggs). Vol. 162. No. 185: 49955-57. Fed. Regist. Washington, DC.

USDA. 2003. Egg-grading manual. Handbook n<sup>o</sup>.75. Available at [http://www.ams.usda.gov/poultry/pdfs/EggGrading\\_manual.pdf](http://www.ams.usda.gov/poultry/pdfs/EggGrading_manual.pdf). Accessed 7 February, 2003.

Vannini, L., Montanari, C., Berardinelli, A., Ragni, L., & Guerzoni, M.E (2009) May low-temperature gas plasma be considered an innovative technique to decontaminate table eggs? *New challenges in food preservation –Processing-Safety- Sustainability*. 11-13 November- Budapest Hungary (Poster)

Whistler P.E., Sheldon, B.W. (1989). Bactericidal activity, eggshell conductance, and hatchability effects of ozone versus formaldehyde disinfection. *Poultry Science*. 68, 1074-1077.

Wong, E., Linton, R.H. & Gerrad, D.E.(1998). Reduction of *Escherichia coli* and *Salmonella* Senftenberg on pork skin and pork muscle using ultraviolet light. *Food Microbiology*. 15, 415-423.

Worley, B.S., Wheatley, W.B., Lauten, S.D., Williams, D.E, Mora, E.C., & Worley, S.D. (1992) Inactivation of *Salmonella* Enteritidis on shell eggs by novel N-halamine biocidal compounds. *Journal of Industrial Microbiology*. 11, 37-42.

Zeidler, G. (2001). Processing and packaging shell eggs. In D.D. Bell, and D. Weaver Jr. (ed.), *Commercial chicken meat and egg production*, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA.

## CAPITOLO 2

# CARATTERIZZAZIONE TERMOFISICA DEI COMPONENTI DELL'UOVO

### **Introduzione**

Le proprietà termiche dei prodotti alimentari determinano le loro capacità di trasferire e accumulare calore e dipendono fortemente dalla composizione dei prodotti.

La conducibilità termica  $K$  ( $\text{W m}^{-1}\text{K}^{-1}$ ), il calore specifico  $C_p$  ( $\text{J kg}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) e la diffusività termica  $D$  ( $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ) sono le più importanti proprietà termiche utili alla valutazione dei processi di trasferimento termico come la refrigerazione, il congelamento, l'essiccazione e il riscaldamento. Recentemente si sta diffondendo l'offerta di dispositivi che permettono di misurare la conducibilità termica, la diffusività termica e la resistività termica di materiali biologici velocemente e con sufficiente precisione.

Nonostante ciò, mentre in letteratura sono presenti molteplici studi sulle proprietà termiche degli alimenti come i succhi di frutti (Choi & Okos, 1983; Constenlaet al., 1989; Telis-Romero et al., 1998), frutta e la verdura (Shyam S. & Sablani, 2003), latte (Minim et al., 2002; Reddy & Datta, 1994), caffè (Telis-Romero et al., 2000), prodotti da forno (Baik et al., 2001), i dati riguardanti le differenti componenti dell'uovo (guscio, albume e tuorlo) sono molto carenti.

Coimbra et al. (2005) hanno determinato la densità, la capacità termica e la conducibilità termica dei componenti liquidi dell'uovo in funzione della temperatura e del contenuto di acqua. Per quanto riguarda la componente solida (guscio), i dati relativi alla conducibilità termica non sono recenti e fanno riferimento a studi di Romanoff & Romanoff (1949), nei quali sfortunatamente non

viene descritta la metodica utilizzata per le determinazioni. Altri valori presenti in letteratura fanno riferimento al carbonato di calcio puro.

Obiettivo di tale attività è stato quello di determinare sperimentalmente conducibilità termica, resistività termica e diffusività termica del tuorlo, dell'albume e del guscio. Il calore specifico è determinabile, conformemente alla sua definizione, sulla base dei precedenti parametri.

La messa a punto di una metodica che fosse in grado di valutare le proprietà termiche del guscio d'uovo (solido) ha fatto emergere alcune problematiche, in quanto la strumentazione a disposizione si avvale di una sonda in grado di caratterizzare le proprietà termiche solamente dei liquidi. E' stata quindi messa a punto una metodica inedita basata sull'analisi di miscele di acqua distillata e frammenti di gusci.

## **Materiali e metodi**

### *Sonda KD2*

La sonda KD2 (Decagon Device Inc.; Pullman, USA) è composta da un ago di acciaio lungo 60 mm e diametro 1.2 mm, contenente sia un elemento riscaldante (resistenza) che una termocoppia, è presente inoltre un modulo di controllo costituito da una batteria, un microcontroller, un convertitore A/D e un circuito di controllo per l'emissione di corrente. Inizialmente il microcontroller stabilizza la temperatura e successivamente attiva un flusso di corrente elettrica al fine di incrementare la temperatura, fino al raggiungimento di un valore stabile, superiore a quello ambientale. In seguito il controller calcola la conduttività e la diffusività utilizzando i dati relativi alla curva di raffreddamento per un tempo di 30s. La resistività è calcolata come reciproco della conduttività.

L'equazione per la conduzione di calore radiale di un mezzo isotropico ed omogeneo è data da:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 T}{\partial r^2} + r^{-1} \frac{\partial T}{\partial r} \right) \quad (1)$$

Dove  $T$  è la temperatura in °C,  $t$  il tempo in secondi,  $D$  la diffusività in  $\text{m}^2\text{s}^{-1}$  ed  $r$  la distanza radiale in m.

Quando la sonda riscaldata elettricamente viene introdotta nel mezzo, l'aumento di temperatura da  $T_0$  (temperatura iniziale) ad una distanza  $r$  dalla sonda, è data da:

$$T - T_0 = \left( \frac{q}{4\pi K} \right) \left[ \ln(t) - \gamma - \ln \left( \frac{r^2}{4D} \right) \right] \quad (2)$$

Dove  $K$  è la conducibilità termica del mezzo in  $\text{W m}^{-1}\text{K}^{-1}$ ,  $q$  è la potenza termica prodotta in  $\text{W m}^{-1}$  e  $\gamma$  è la costante di Eulero (0.5772).  $q$  è noto in quanto è proporzionale alla corrente fornita dalla resistenza della sonda ( $q = \Delta V \cdot i$ ).

Dalla seguente equazione si può notare la relazione lineare tra  $\ln(t)$  e  $\Delta T$ ; la pendenza è data da:

$$m = \frac{q}{4\pi K} \quad \rightarrow \quad K = \frac{q}{4\pi m} \quad (3)$$

Dall'intersezione della linea di regressione con l'asse  $t$  ( $\Delta T = 0$ ), si ottiene:

$$\ln(t) = \gamma + \ln \left( \frac{r^2}{4D} \right) \quad (4)$$

Le ultime due equazioni determinano  $K$  e  $D$ .

Range di funzionamento

- conducibilità termica:  $0.1\text{-}2 \text{ W m}^{-1}\text{K}^{-1}$ ; precisione 5%
- resistività termica:  $0.5\text{-}10 \text{ m K W}^{-1}$ ; precisione 5%
- diffusività termica:  $0.1\text{-}1 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ ; precisione 10%.

*Preparazione dei campioni*

E' stato analizzato un campione di 30 uova provenienti da galline ovaiole di tipologia genetica Hy-Line Brown. Per ogni uova è stato misurato il diametro

equatoriale (mm), il diametro longitudinale (mm) e la massa (g). Successivamente guscio, tuorlo e albume sono stati separati e per ogni guscio è stato misurato lo spessore in tre punti attraverso un micrometro digitale, mentre per componenti liquidi, è stata misurata la massa (g) e la densità ( $\text{kg m}^{-3}$ ). Infine si è proceduto con la determinazione dei parametri fisici dell'albume e del tuorlo tramite la sonda KD2.

#### *Componenti liquide (albume e tuorlo)*

L' albume e il tuorlo, provenienti dal medesimo uovo, sono stati inseriti in due differenti cilindri graduati (50ml) ed immergendo completamente la sonda KD2 nei due costituenti si è proceduto alla determinazione della conducibilità termica, resistività termica e diffusività termica. Al fine di ristabilire l'equilibrio termico dello strumento, è stato importante attendere 5 minuti tra una determinazione e la successiva.

Il calore specifico è stato determinato per via analitica partendo dai valori di conducibilità e diffusività determinati sperimentalmente tramite la seguente equazione:

$$c_p = \frac{K}{D\rho} \quad (5)$$

Dove  $\rho$  è la densità ( $\text{kg m}^{-3}$ ).

### *Componente solida (guscio)*

Per quanto riguarda la componente solida (guscio) è stata utilizzata una metodica inedita basata sull'analisi di miscele di acqua distillata e frammenti di guscio a concentrazioni note. Dieci gusci privi di membrane testacee sono stati finemente frammentati (granulometria di circa 0.02 mm) e successivamente sono state preparate diverse miscele (circa 10g di guscio per 3g di acqua) a concentrazione nota di acqua e guscio.

Per ogni miscela sono state condotte tre ripetizioni per la determinazione di conducibilità termica, resistività termica e diffusività termica.

La conducibilità termica del guscio è stata determinata tramite la seguente equazione derivante dal principio di conservazione dell'energia

$$K_m = \frac{K_a M_a + K_g M_g}{M_m} \quad \rightarrow \quad K_g = \frac{K_m M_m - K_a M_a}{M_g} \quad (6)$$

dove la conducibilità termica del guscio è calcolata come somma pesata delle conducibilità dei costituenti della miscela con riferimento al modello delle resistenze termiche in parallelo.

$K_a$ ,  $K_g$ ,  $K_m$  sono rispettivamente la conducibilità termica dell'acqua, del guscio e della miscela, mentre  $M_a$ ,  $M_g$ ,  $M_m$  sono rispettivamente la massa (g) dell'acqua, del guscio e della miscela.

Questa ipotesi è analoga a quella applicata da DeVries (1963) per la determinazione della conducibilità termica del suolo.

## **Risultati e discussione**

In tabella 2.1 sono riportate le medie e le relative deviazioni standard dei valori relativi ai parametri fisici e dimensionali misurati sul campione di 30 uova.

In tabella 2.2 sono riportati i valori medi con le relative deviazioni standard dei parametri termici misurati tramite la sonda KD2.

Le misure relative ai parametri termici di albume e tuorlo sono in accordo con i valori presenti in letteratura (Coimbra et al; 2006). I valori relativi alla conducibilità termica del guscio presenti in letteratura sono pochi. Questi dati appartengono al carbonato di calcio ( $K=2.25 \text{ W m}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) o a studi condotti da Romanoff & Romanoff (1949) ( $K=0.45 \text{ W m}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) e risultano essere molto differenti tra di loro.

Il valore di conducibilità termica determinato in questo lavoro ( $K\approx 1.03 \text{ W m}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) si inserisce tra i valori presenti in bibliografia e può rappresentarne la media.

Peso totale (g)	63.45	2.44
Peso guscio (g)	6.40	0.38
Peso albume (g)	37.84	2.16
Peso tuorlo (g)	16.83	0.93
Densità tuorlo (Kg m <sup>-3</sup> )	2300	9.50
Densità albume (Kg m <sup>-3</sup> )	1003	8.02
Densità tuorlo (Kg m <sup>-3</sup> )	1053	4.03
Diametro equatoriale (mm)	44.32	0.64
Diametro longitudinale (mm)	57.83	1.34
Spessore guscio (mm)	0.38	0.02

**Tabella 2.1:** valori medi relativi alle proprietà fisiche e dimensionali.

	<b>K (Wm<sup>-1</sup>k<sup>-1</sup>)</b>	<b>D (mm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>)</b>	<b>R (mKW<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cp (Jkg<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup>)</b>
Tuorlo	0.36 0.02	0.12 0.01	2.79 0.14	2849 172
Albume	0.55 0.02	0.14 0.01	1.83 0.06	3916 198
Guscio	1.03 0.08	0.36 0.06	0.98 0.02	1234 202

**Tabella 2.2:** valori medi e deviazioni standard relativi alle proprietà termiche dell'albume, guscio e tuorlo (K: conducibilità, D:diffusività, R:resistività, Cp:calore specifico).

## Bibliografia

Baik, O.D., Marcotte, M., Sablani, S.S., & Castaigne, F. (2001). Thermal and physical properties of bakery products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41(5), 321–352.

Choi, Y., & Okos, M.R. (1983). The thermal properties of tomato juice concentrates. *Transaction of ASAE*, 26, 305–311.

Constenla, D.T., Lozano, J.E., & Crapiste, G.H. (1989). Thermo physical properties of clarified apple juice as a function of concentration and temperature. *Journal of Food Science*, 54, 663–668.

DeVries, D.A. (1963). Thermal properties of soil. In *Physics of plant environment*. W.R. VanWick (ed.). North Holland Pub. Co., Amsterdam, 210-235

Coimbra J. S.R., Gabas A.L., Minim L.A., Garcia Rojas E. E., Telis V. R.N., & Telis-Romero J. (2006). Density, heat capacity and thermal conductivity of liquid egg products. *Journal of Food Engineering* 74, 186-190.

\* Fabbri, A., Cevoli, C., & Sirri, F. (2007). Measurement of thermal properties of table egg's components. In *European Symposium on the quality Eggs and egg products*, Prague, CZ.

Minim, L.A., Coimbra, J.S.R., Minim, V.P.R., & Telis-Romero, J. (2002). Influence of temperature, water and fat contents on the thermophysical properties of milk. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 47, 1488–1491.

Reddy, C.S., & Datta, A.K. (1994). Thermophysical properties of concentrated reconstituted milk during processing. *Journal of Food Engineering*, 21, 31–40.

Romanoff, A.L., & Romanoff, A.J. (1949). *The avian egg*. New York: John Wiley and Sons, Inc.

Telis-Romero, J., Gabas, A.L., Polizelli, M.A., & Telis, V.R.N. (2000). Temperature and water content influence on thermophysical properties of coffee extract. *International Journal of Food Properties*., 3, 375–384.

Telis-Romero, J., Telis, V.R.N., Gabas, A.L., & Yamashita, F. (1998). Thermophysical properties of brazilian orange juice as affected by temperature and water content. *Journal of Food Engineering*, 38, 27–40.

\* *L'articolo è diretta espressione dell'attività di ricerca illustrata nel precedente capitolo.*

# CAPITOLO 3

## MODELLO NUMERICO PER IL TRATTAMENTO AD ARIA CALDA IN REGIME DI CONVEZIONE FORZATA DELLA SUPERFICIE DELL'UOVO IN GUSCIO

### **Introduzione**

La costruzione di un modello numerico rappresenta un possibile metodo disponibile per effettuare uno studio preliminare al fine di analizzare il trasferimento di calore all'interno di uova sottoposte a trattamenti termici.

Data la complessità del sistema in esame, questo metodo consente di evitare numerosi e costosi lavori sperimentali intenti a determinare i movimenti dei flussi di calore che si instaurano durante i processi termici, permettendo inoltre, di conoscere in ogni punto dello spazio quali siano i valori delle grandezze di interesse, senza correre il rischio di perturbare il sistema con ulteriori apparati di rilevamento.

La possibilità di variare le condizioni al contorno la rendono inoltre una tecnica in grado di fornire e prevedere i risultati in modo semplice e veloce.

Denys et al. (2003; 2004; 2005) hanno proposto un modello CFD per valutare l'impatto di un ipotetico trattamento termico di pastorizzazione sulle uova in guscio. La validazione del modello è stata effettuata utilizzando uova trattate in un bagno d'acqua calda a temperatura costante di  $56\pm 1^\circ\text{C}$  per 20 min.

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di sviluppare un modello numerico CFD utile a studiare il trattamento ad aria calda a convezione forzata della superficie di uova in guscio. Il modello ha permesso di stimare la distribuzione ottimale della temperatura di pastorizzazione nell'uovo (interna ed esterna) nell'ottica di attenuare il rischio di coagulazione dell'albume durante il trattamento termico.

## Materiali e metodi

### *Sviluppo del modello CFD*

Attualmente sono disponibili diversi software commerciali di fluidodinamica computazionale utili alla risoluzione flessibile e simultanea delle equazioni di conservazione dell'energia, della massa e del momento (Scott & Richardson, 1997) ampiamente utilizzati nell'ambito dell'ingegneria alimentare (Bin et al. 2002; Fabbri, 2005). Nel caso specifico le equazioni riguardanti il trasferimento del calore dentro l'uovo durante il trattamento ad aria calda sono state risolte utilizzando Comsol Multiphysics 3.5 (COMSOL Inc., Burlington, MA, USA), un solutore commerciale di equazioni differenziali alle derivate parziali basato sulla tecnica degli elementi finiti. È stato scelto il risolutore UMFPACK, che è attualmente uno dei più collaudati per la risoluzione di sistemi asimmetrici lineari sparsi.

Durante il trattamento ad aria calda, l'uovo ruota attorno al proprio asse principale ed è investito da flussi d'aria calda e fredda sui lati opposti. I flussi alternati di aria calda e fredda permettono di raggiungere sulla superficie esterna del guscio picchi di temperatura che non sarebbero compatibili con i fenomeni di coagulazione dell'albume se mantenuti per tempi più lunghi.

Il fenomeno di *air impinging* sull'uovo è stato simulato utilizzando una condizione di flusso convettivo sulla superficie del guscio così da evitare anche uno studio completo dei flussi turbolenti di aria, che avrebbe comportato un notevole sforzo computazionale.

Inizialmente sono stati studiati due modelli: un modello completo 3D e uno 2D considerando solo una sezione equatoriale dell'uovo; è stato osservato che nella zona equatoriale il range di temperatura è sostanzialmente comparabile tra i due modelli.

Essendo questa l'area più critica per la stabilità dell'albume e, volendo studiare una soluzione di prima approssimazione, solo il modello 2D è stato ulteriormente

sviluppato. In aggiunta, i ridotti tempi di calcolo necessari per la soluzione di un modello 2D, hanno permesso di ripetere l'analisi per molteplici differenti condizioni.

Empiricamente è stata evidenziata l'importanza della camera d'aria nella diffusione termica, quindi si è deciso di considerarla in un ulteriore modello. Tale modello deve essere considerato di prima approssimazione in quanto in letteratura non sono presenti osservazioni circa l'effetto della camera d'aria sulla diffusione termica.

Il tuorlo non è stato preso in considerazione nel modello in quanto il maggior incremento di temperatura dovuto al fenomeno di convezione è stato osservato solamente attorno al guscio.

In figura 3.1 è riportata la geometria del modello ed è possibile notare le differenti dimensioni della mesh appartenenti al guscio e all'albume. Il raggio equatoriale ( $44.0 \pm 0.64$  mm), lo spessore del guscio ( $0.38 \pm 0.02$  mm) e le dimensioni della camera d'aria ( $4.20 \pm 0.12$  mm) sono state determinate attraverso misure dirette effettuate su 30 uova provenienti da galline Hy-Line Brown utilizzando un calibro digitale (CDJB15; Borletti, Italy) (raggio equatoriale) e un micrometro digitale (IDU25; Mitutoyo Corporation; Japan) (spessore del guscio, camera d'aria).

La camera d'aria è stata determinata, dopo rottura dell'uovo, misurando l'altezza della camera dalla base del guscio in tre punti equidistanti sulla circonferenza descritta dalla linea di unione della membrana al guscio e nel punto centrale della membrana stessa. L'altezza della camera d'aria è stata ottenuta mediando i quattro valori.

Per ottenere un accurato modello CFD bisogna descrivere nel modo più realistico possibile i materiali coinvolti, in questo lavoro è stato quindi necessario descrivere l'uovo tramite le sue reali proprietà termiche (conducibilità termica, calore specifico, diffusività termica). In tabella 3.1 sono riportati i valori delle proprietà termiche del guscio e dell'albume inserite nel modello. Bisogna ricordare che tali valori sono stati determinati sperimentalmente attraverso l'utilizzo della sonda

KD2 documentata nel capitolo 2 con riferimento al lavoro di Fabbri et al. (2007). Tutti i valori sono in buon accordo con quelli presenti in letteratura, fatta eccezione per la conducibilità termica del guscio ( $1.03 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$ ). Infatti in letteratura sono riportati solo due valori:  $2.25$  e  $0.456 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$ , il primo si riferisce al carbonato di calcio puro, il maggior costituente del guscio d'uovo, mentre il secondo è stato presentato da Romanoff & Romanoff attraverso una metodica non documentata (1949).

### *Equazioni di governo e condizioni al contorno*

Il trasferimento del calore è governato dall'equazione di conservazione dell'energia:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} \right) \quad (1)$$

dove  $D$  (diffusività termica;  $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ) è differente per ogni costituente dell'uovo.

Il programma di simulazione scelto offre una ampia personalizzazione nella definizione delle condizioni al contorno (*boundary conditions*) (figura 3.2) del modello e quindi nella definizione del processo stesso che deve essere univoco dal punto di vista fisico e delle sue variabili note. Le condizioni al contorno in questo caso interessano la superficie esterna ed interna del guscio.

La temperatura iniziale è stata considerata uniforme in ogni punto della geometria ( $T=293 \text{ K}$ ). Tra guscio ed albume è stata impostata una condizione di continuità (*continuity*), in questa zona non esiste resistenza termica nella diffusione del calore. Questa scelta permette di rimanere dalla parte del sicuro, in quanto l'albume raggiunge temperature superiori a quelle che si andrebbero a riscontrare sperimentalmente. La condizione al contorno impostata nell'interfaccia tra la superficie esterna del guscio e l'aria, invece, fa riferimento al fenomeno della convezione (*heat flux*):

$$\dot{q} = h(T_\infty - T) \quad (2)$$

essendo  $\dot{q}$  il flusso di calore totale ( $\text{W m}^{-2}$ ),  $h$  il coefficiente di convezione ( $\text{W m}^{-2}\text{K}^{-1}$ ) e  $T_\infty$  la temperatura esterna (a distanza infinita), calda per una faccia e fredda per l'altra.

Il valore di  $h$  non è costante, ma dipende dalla geometria e dalle condizioni di flusso presenti nell'ambiente.

In questo studio  $h$  è stato determinato tramite il numero di Nusselt:

$$Nu = \frac{hL}{K_{air}} \quad (3)$$

dove  $K_{air}$  è la conducibilità termica dell'aria ed  $L$  il diametro equatoriale dell'uovo (m). Siccome il problema è stato impostato come bidimensionale, il coefficiente di convezione e anche il numero di Nusselt (locale) presentavano una forte variabilità spaziale lungo la superficie del corpo, in particolare variavano al variare dell'angolo di incidenza del flusso d'aria calda sulla superficie dell'uovo che in questo caso è stato considerato come un cilindro. Quindi è risultato fondamentale trovare una relazione tra il numero di Nusselt e la variazione dell'angolo.

La distribuzione angolare del numero di Nusselt locale attorno all'uovo può essere relazionata al numero di Reynolds e conseguentemente alla velocità locale dell'aria (*jet impinging*) (Khan et al. 2005; Tkaguki & Tamotsu 2006; Pop & Yan, 1998). In letteratura sono disponibili diversi studi teorici riguardanti la definizione del numero di Nusselt per un flusso d'aria calda attorno ad un cilindro (moto turbolento e moto stazionario).

La relazione usata nel presente studio (4) deriva dall'estrapolazione ( $R^2=0.979$ ) di una serie di curve riportate graficamente da Olsson (Olsson et al. 2004), descriventi il numero di Nusselt locale per quattro valori del numero di Reynolds (23,000; 50,000; 70,000; 100,000) e mostrate in figura 3.3.

$$Nu = a + (\text{Re}^b) \sin(c\theta + d) \quad (4)$$

$a = -26.9256$ ;  $b = 0.5465$ ;  $c = 0.4850$ ;  $d = 2.1578$  ( $R = 0.9897$ ;  $p < 0.05$ )

dove  $\theta$  è l'angolo d'incidenza del flusso d'aria sulla superficie del corpo e

$$\text{Re} = \frac{w_{\infty} L \rho}{\mu} \quad (5)$$

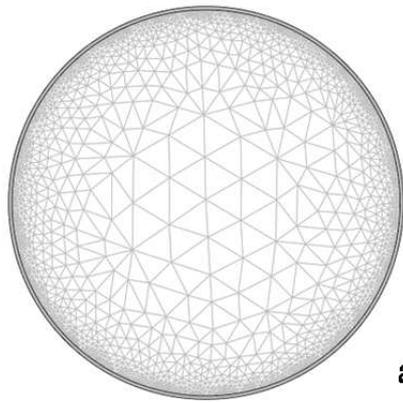
essendo  $w_{\infty}$  la velocità del flusso d'aria ( $\text{m s}^{-1}$ )(i.e. a grande distanza dall'ostacolo) e, come riportato in *Material Property Database* (MPDB- JAHM Software, Inc):

$$\rho = 346.52/T \text{ (densità dell'aria } \text{kgm}^{-3}\text{)}$$

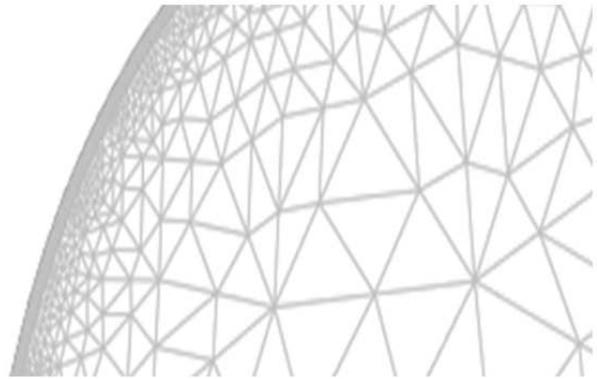
$$\mu = -7.887 \cdot 10^{-12} T^2 + 4.42710^{-8} T + 5.20410^{-6} \text{ (viscosità dinamica dell'aria (Pas}^{-1}\text{))}$$

$$K_{air} = 10^{0.8616 \cdot \log_{10}(T) - 3.7142}$$

Il rapporto tra il diametro dell'uovo e del getto era circa 0.5, mentre il rapporto tra il diametro del getto e la distanza tra getto e superficie dell'uovo era circa 0.3, tali dati soddisfano essenzialmente le condizioni sperimentali presentate da Olsson.

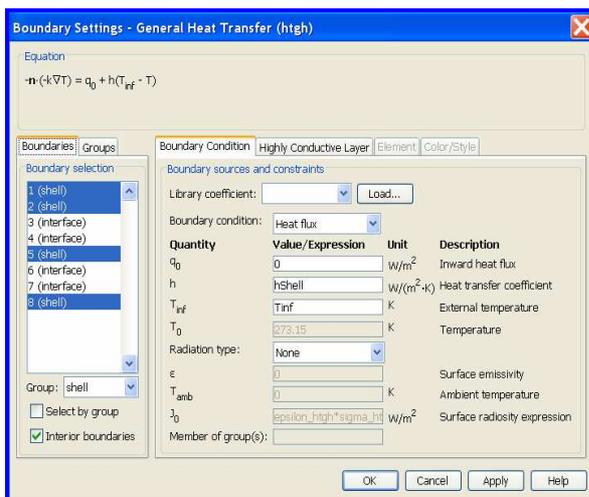


a)

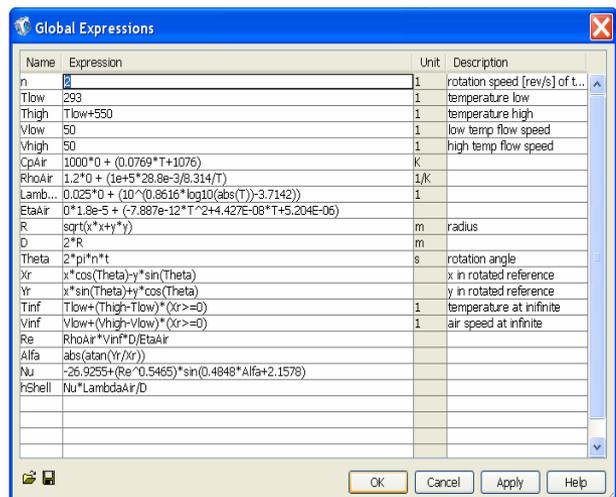


b)

**Figura 3.1:** a) mesh composta approssimativamente da 9000 elementi triangolari con funzione parabolica; b) densità variabile della mesh nell'area di maggior gradiente termico.

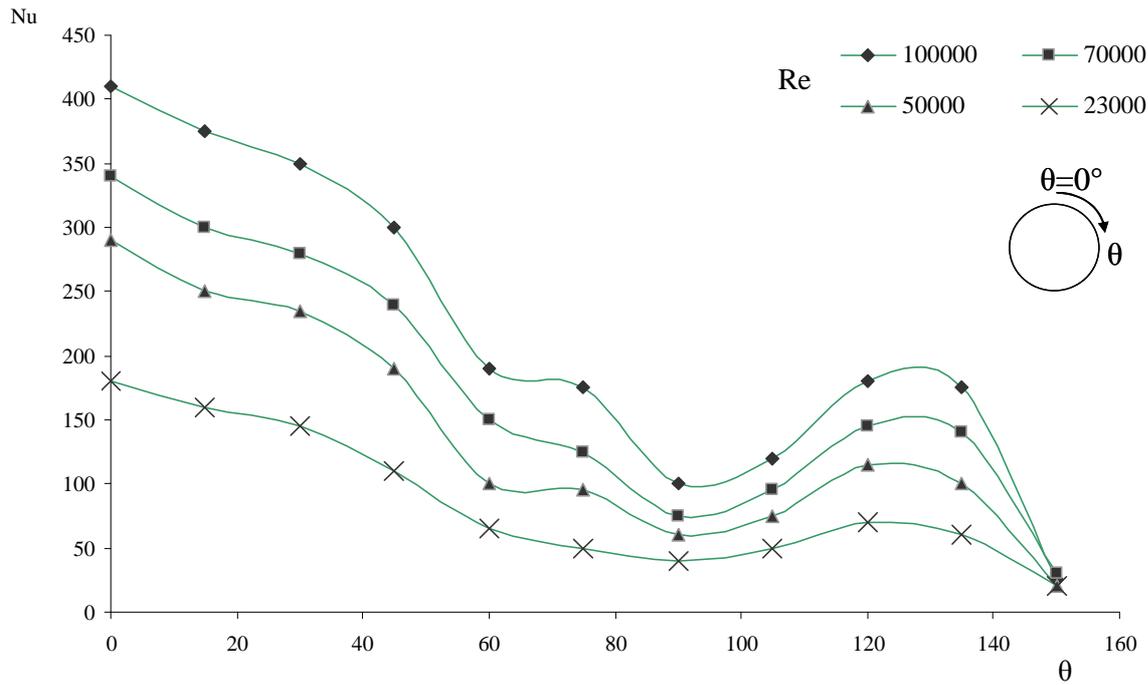


a)



b)

**Figura 3.2:** interfaccia del programma per l'inserimento dei valori relativi alle condizioni al contorno(a) e alle espressioni globali(b).



**Figura 3.3:** numero di Nusselt locale ( $Nu$ ) attorno al cilindro per differenti numeri di Reynolds (Olsson et al, 2004).

	$K$ ( $Wm^{-1}K^{-1}$ )	$C_p$ ( $Jkg^{-1}K^{-1}$ )	$\rho$ ( $kgm^{-3}$ )
Guscio	1.03	1234	2300
Albume	0.55	3860	1004

**Tabella 3.1:** proprietà termiche dei componenti dell'uovo ( $K$ :conducibilità termica,  $C_p$ :calore specifico,  $\rho$ : densità).

### Processing

Le grandezze fisiche considerate al fine di individuare differenti trattamenti sono state la velocità del flusso d'aria calda ( $w_{air}$ ), la temperatura del flusso d'aria ( $T_{air}$ ), la durata del trattamento ( $t$ ) e la velocità di rotazione dell'uovo ( $n$ ). Bisogna ricordare che il modello non è statico, l'uovo infatti ruota (con velocità angolare  $n$ ) ed è soggetto all'azione di due flussi d'aria contrapposti, rispettivamente caratterizzati da valori di velocità e temperature. In tabella 3.2 sono riportati gli intervalli di variazione dei valori dei parametri fisici considerati.

E' stato anche sviluppato un modello comprendente l'effetto di controllo in retroazione della temperatura. Si simula infatti il comportamento di un generatore di aria calda, regolato sulla base della temperatura osservata all'interfaccia tra guscio ed albume. Si tratta evidentemente di una misura non semplice da realizzare sul piano fisico, tuttavia capace di fornire a livello di modellistica, un ciclo ottimale da applicare sulla superficie esterna del guscio. Tale ciclo garantisce automaticamente le più alte temperature all'esterno del guscio senza raggiungere temperature di coagulazione all'interno.

<b>Grandezze fisiche</b>	<b>Range</b>
$w_{air}$ ( $\text{ms}^{-1}$ )	10-30
$t$ (s)	5-15
$T_{air}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	300-500
$n$ ( $\text{giris}^{-1}$ )	0.5-2

**Tabella 3.2:** range dei valori dei parametri fisici presi in considerazione durante le prove di simulazione numerica.

### *Validazione sperimentale del modello CFD*

E' stato costruito un prototipo da laboratorio per trattare un singolo uovo in condizioni di trasferimento convettivo di calore (figura 3.4). Il sistema è composto da un generatore di aria calda (*hot air gun*) (Bosh, model GHG 660 LCD-professional) dotato di regolazione variabile della temperatura (da 50°C a 600°C in uscita), una fonte di aria fredda (utilizzando l'aria ambiente) e un supporto rotante per l'uovo.

La velocità dell'aria calda ( $w_{hot}$ ) è stata modulata modificando la distanza del generatore di aria calda dal supporto dell'uovo ed è stata misurata, nei pressi del guscio d'uovo, tramite una sonda ad azione rapida Hot Wire (Testo AG 445, Ø 10 mm).

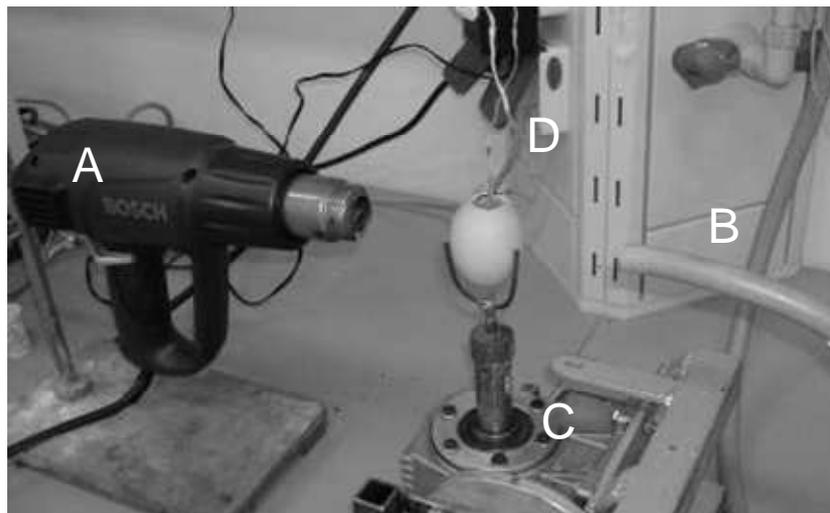
La velocità dell'aria fredda è stata mantenuta tra 8 e 12 m s<sup>-1</sup> (misurata vicino al guscio), mentre la velocità di rotazione del supporto è stata impostata a 0,5 Hz ± 5%. Durante le prove, i cambiamenti di temperatura sono stati misurati sulla superficie interna ed esterna del guscio (zona equatoriale), tramite termocoppie K (Chromel/Alumel; Tersid Came, Italia). Per estrarre il tuorlo e l'albume ed inserire e fissare le termocoppie, è stato effettuato un foro nel guscio di 10 mm. Successivamente l'uovo è stato riempito con il solo albume.

Le uova utilizzate sono di tipo A, con un peso medio di 65g. La posizione delle termocoppie è stata scelta valutando quanto riportato in letteratura. In particolare, studi riguardanti trattamenti termici compiuti sulle uova, indicano il posizionamento dei rilevatori di temperatura a 4 mm sotto la superficie del guscio e vicino al tuorlo (Erdogdu et al, 2007). Poiché uno degli obiettivi del presente studio è stato misurare la temperatura massima raggiunta dall'albume dopo il riscaldamento, si è deciso di posizionare le termocoppie in linea con il getto di aria calda, una all'esterno, e due all'interno, nei punti in cui si ipotizza un maggior riscaldamento (figura 3.5).

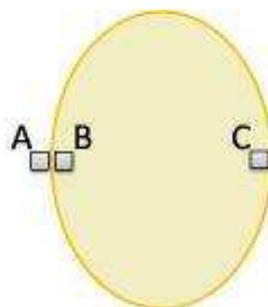
I profili termici sono stati campionati ad una frequenza di 250Hz, utilizzando un sistema di acquisizione dati PCI-6036E e uno strumento virtuale creato con LabView 8.2 (National Instrument, Corporate, Texas, USA).

Per valutare i trattamenti sono state considerate diverse combinazioni di velocità del flusso di aria calda, durata del trattamento e durata del raffreddamento (*overcooling*). La temperatura dell'aria calda è stata mantenuta costante per tutti i trattamenti: 350° C vicino alla parte esterna del guscio.

Sono stati testati molteplici trattamenti e le stesse combinazioni sono state utilizzate per le simulazioni numeriche.



**Figura 3.4:** prototipo utilizzato per la validazione del modello (A: generatore d'aria calda; B: generatore d'aria fredda; C: porta-uovo collegato a motore elettrico; D: termocoppie)



**Figura 3.5:** rappresentazione schematica della posizione delle termocoppie nell'uovo.

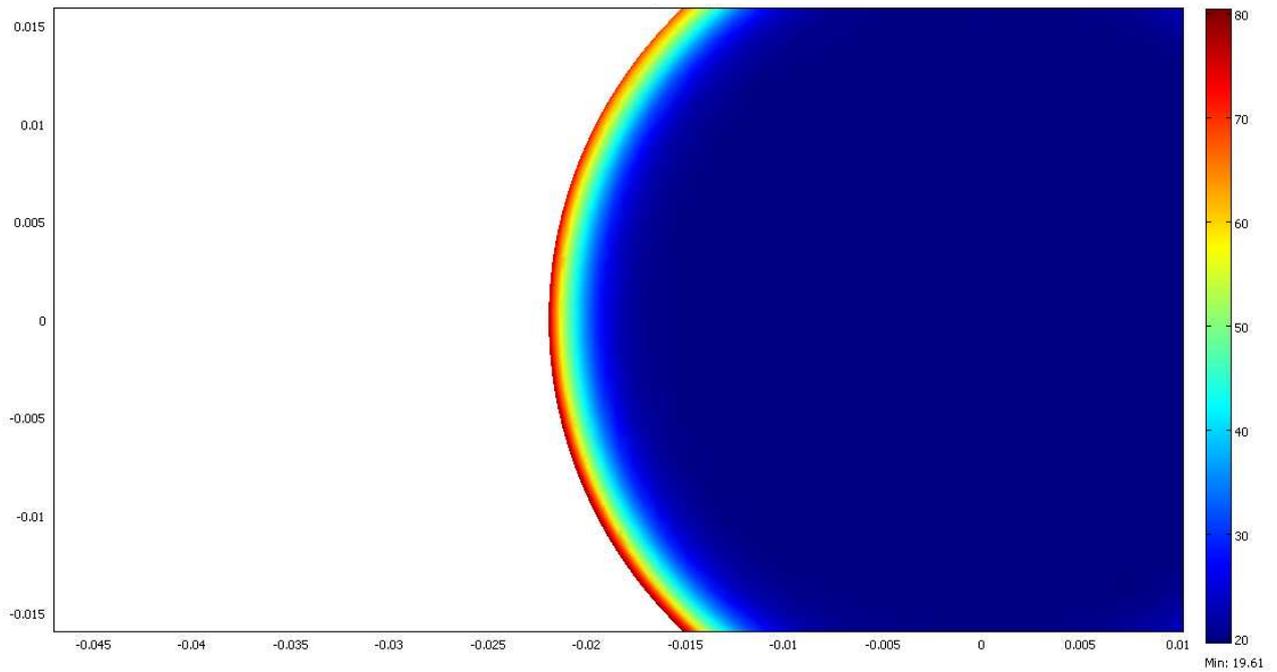
## Risultati e discussione

Per quanto riguarda i risultati relativi all'elaborazione del modello, in figura 3.6 viene riportato un esempio di configurazione dell'andamento della temperatura all'interno dell'uovo. L'aumento di temperatura è rappresentato dalla gradazione di colori (min 20°C, max 80°C).

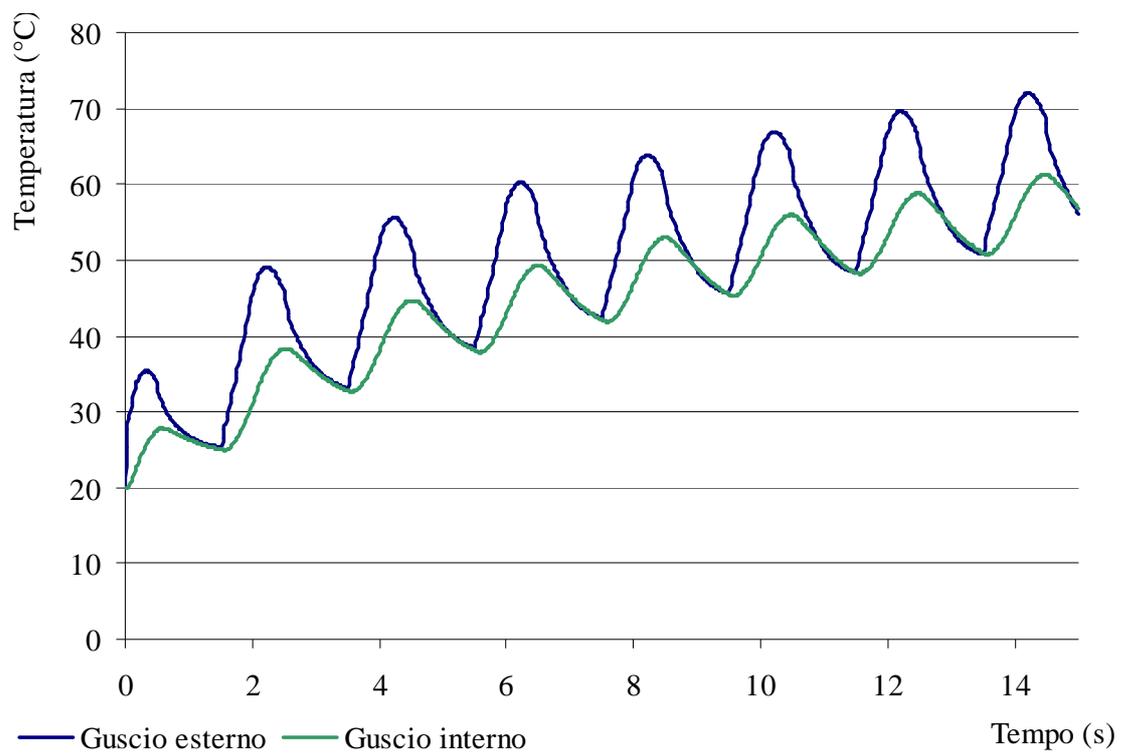
La condizione di perfetto contatto termico tra guscio e albume, ipotizzata nella costruzione del modello, fa sì che le temperature calcolate per l'albume risultino verosimilmente superiori a quelle effettive. Temperature superiori a 60°C causerebbero, probabilmente l'inizio della denaturazione delle proteine dell'albume (Ipsen et al., 2001; Hammersho. et al., 2001).

In figura 3.7 sono riportati gli andamenti della temperatura in due punti appartenenti rispettivamente alla superficie esterna ed interna del guscio. In particolare sono riportati gli andamenti relativi ad un ciclo termico caratterizzato da una temperatura dell'aria calda di 350 °C, velocità dell'aria calda di 20 ms<sup>-1</sup>, dell'aria fredda di 10 ms<sup>-1</sup> e velocità di rotazione dell'uovo di 0.5 giris<sup>-1</sup>. E' possibile notare che tra i due punti sussiste un differenza di temperatura costante pari a circa 10°C.

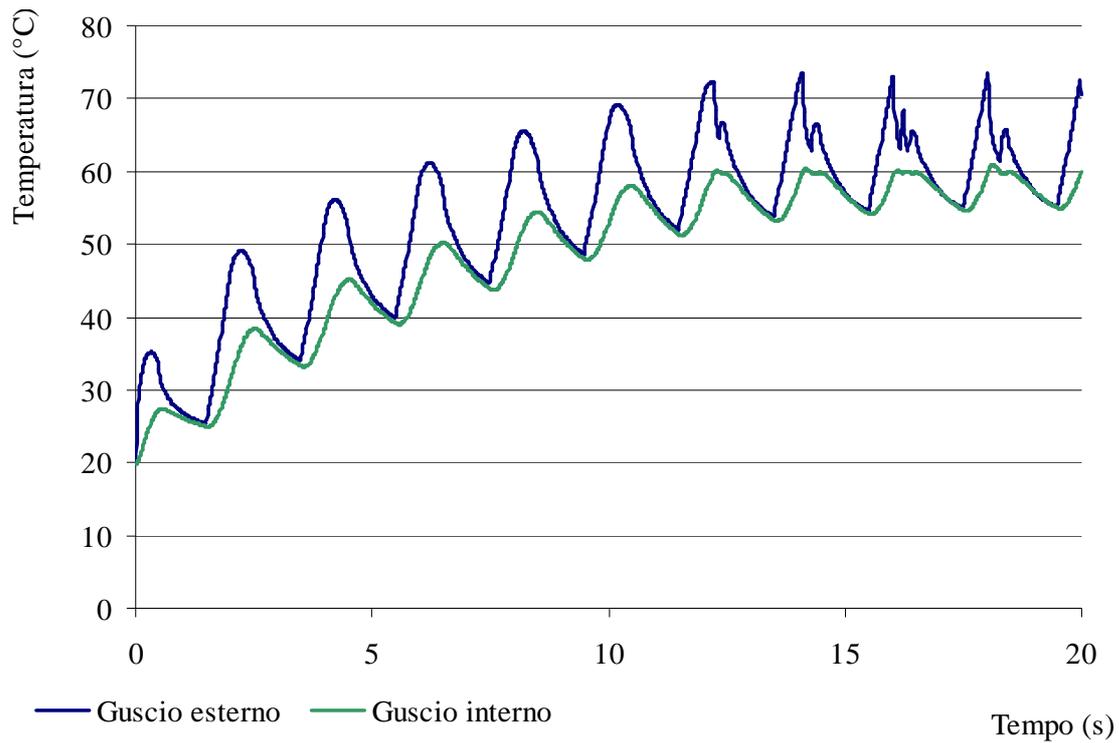
Per quanto riguarda le simulazioni per le quali è stato attivato il sistema di controllo della temperatura dell'aria, basato sulla misura della temperatura dell'albume, si osserva come il meccanismo della retroazione abbia funzionato in modo efficiente, portando tuttavia a cicli termici caratterizzati da una maggiore difficoltà nella loro implementazione impiantistica (figura 3.8).



**Figura 3.6:** rappresentazione del riscaldamento dell'uovo dall'esterno verso l'interno.



**Figura 3.7:** andamento della temperatura all'esterno (linea blu) e all'interno (linea verde) del guscio per un trattamento termico a 350 °C, con velocità dell'aria calda di 20 ms<sup>-1</sup>, velocità dell'aria fredda di 10 ms<sup>-1</sup> e velocità di rotazione dell'uovo di 0.5 giris<sup>-1</sup>.



**Figura 3.8:** andamento della temperatura all'esterno (linea blu) e all'interno (linea verde) del guscio per un trattamento termico a 350 °C con limitazione della temperatura interna (max 65 °C), con velocità dell'aria calda di 20 ms<sup>-1</sup>, velocità dell'aria fredda di 10 ms<sup>-1</sup> e velocità di rotazione dell'uovo di 0.5 giris<sup>-1</sup>.

I dati provenienti dalla simulazione sono stati validati sperimentalmente tramite dati provenienti da termocoppie.

Sono stati comparati otto differenti cicli termici riportati in tabella 3.3. La bontà dell'adattamento tra temperature misurate e provenienti dal modello è espresso tramite l'indice di Pearson- $r$ , calcolato in riferimento alla temperatura rilevata nell'interfaccia tra albume e guscio.

I profili termici misurati sulla superficie esterna del guscio non sono riportati perché sperimentalmente molto difficile da determinare. Infatti, le termocoppie fissate sul guscio sono risultate essere molto più sensibili alla temperatura dell'aria calda piuttosto che alla temperatura del guscio. Di conseguenza, le temperature misurate sono risultate molto più elevate rispetto a quelle simulate.

Invece, considerando la faccia interna del guscio, è stato possibile osservare che i dati sperimentali e simulati sono in buon accordo: in figura 3.9 è riportato un profilo termico rappresentativo.

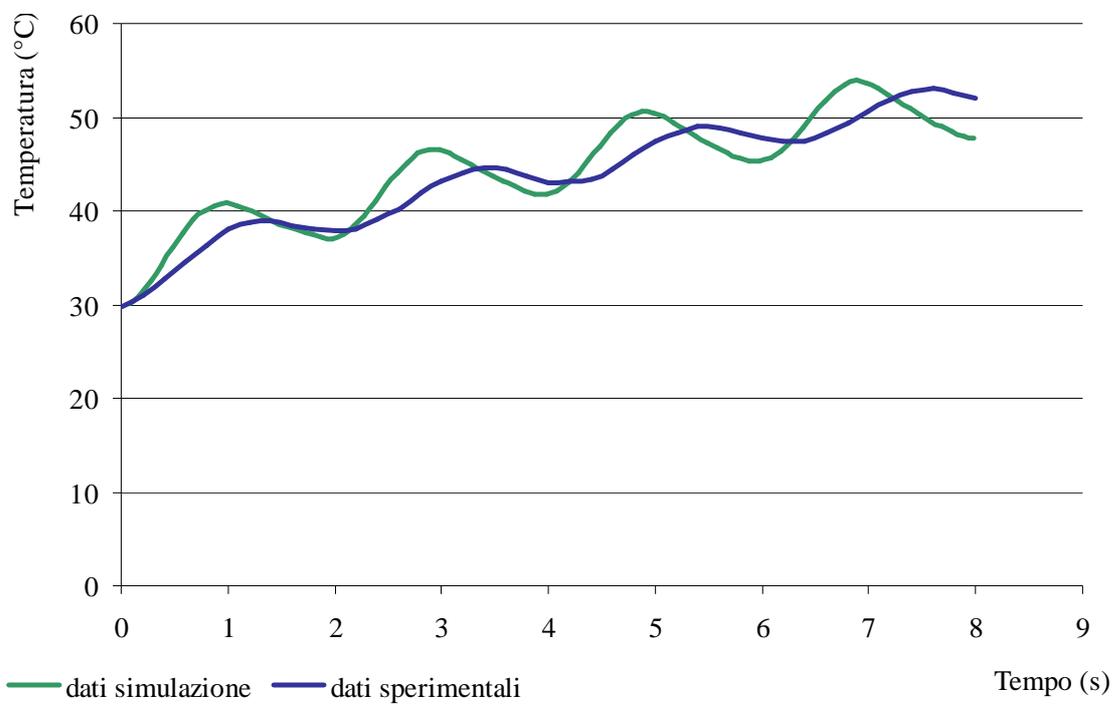
Le differenze tra curve sperimentali e simulate, in termini di riduzione dell'ampiezza e sfasamento, sono probabilmente dovute all'inerzia termica delle termocoppie anche se difficili da quantificare.

La presenza della camera d'aria è stata considerata in un semplice modello. In figura 3.10 sono riportati i profili termici simulati in differenti punti dell'uovo vicini alla camera d'aria per un trattamento di 8s e velocità dell'aria calda ( $350^{\circ}\text{C}$ ) pari a  $15\text{ ms}^{-1}$ .

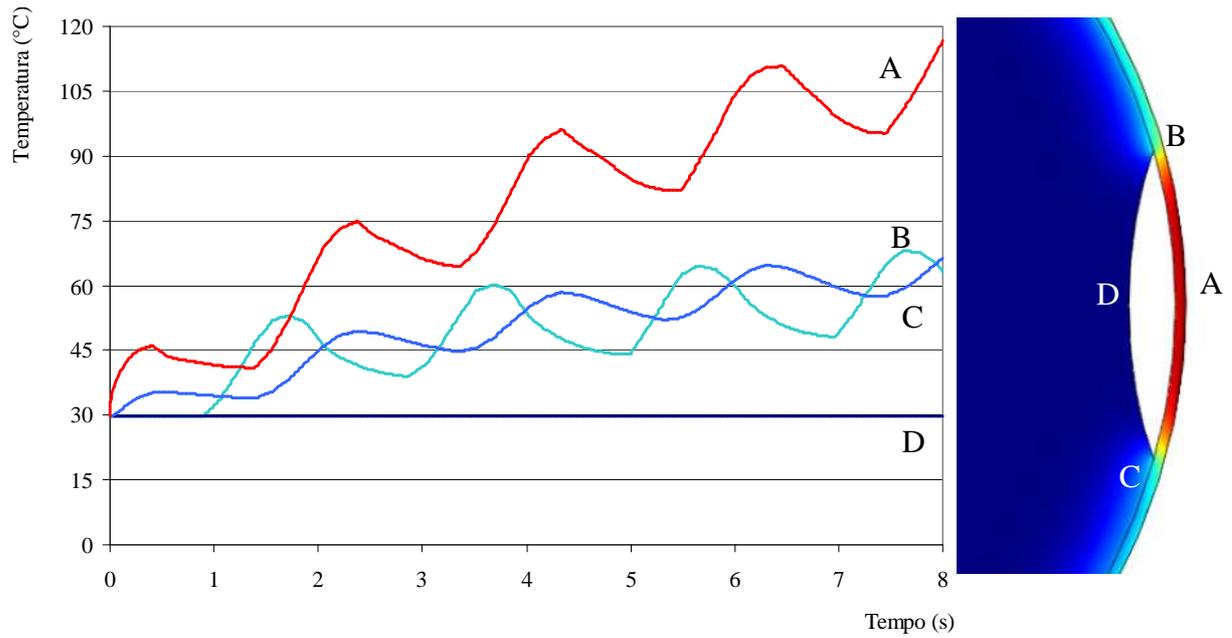
E' possibile notare che sulla superficie esterna del guscio si raggiungono temperature di circa  $70^{\circ}\text{C}$ , eccetto che per la zona sovrastante la camera d'aria. In questa zona la temperatura è molto più alta e raggiunge i  $120^{\circ}\text{C}$  perché la camera d'aria funge da isolatore termico. L'alta temperatura di questa zona del guscio influenza la temperatura dell'albume a suo contatto.

Trattamento	Durata (s)	Velocità aria calda ( $\text{ms}^{-1}$ )	Raffreddamento (s)	<i>r</i>	<i>p</i>
A1	6	18	20	0.897	<0.1
A2	6	18	0	0.895	<0.1
A3	8	10	0	0.917	<0.1
A4	8	15	10	0.906	<0.1
A5	10	10	0	0.916	<0.1
A6	10	15	10	0.925	<0.1
A7	12	10	10	0.915	<0.1
A8	12	10	0	0.908	<0.1

**Tabella 3.3:** Parametri caratteristici dei cicli termici considerati e parametri statistici utilizzati per confrontare i dati sperimentali. *r*: indice di Pearson; *p*: significatività statistica.



**Figure 3.9:** temperatura rilevata nella parte interna del guscio per un trattamento di 8 secondi con velocità dell'aria calda pari a  $10 \text{ ms}^{-1}$ . Sono riportati i dati sperimentali (linea blu) e i dati numerici (linea verde).



**Figure 3.10:** Temperatura calcolata in quattro differenti punti del guscio, vicino alla camera d'aria per un trattamento di 8 s e velocità dell'aria calda  $15\text{ms}^{-1}$ . A: parte esterna del guscio sopra la camera d'aria; B: parte esterna del guscio nell'interfaccia tra albume e camera d'aria; C: parte interna del guscio nell'area di contatto tra albume, camera d'aria e guscio D: interfaccia tra albume e camera d'aria.

## Bibliografia

Bin, X., & Da-Wen, S. (2002). Applications of computational fluid dynamics (CFD) in the food industry: a review. *Computers and Electronics in Agriculture*, 34, 5-24.

Denys, S., Pieters, J.G., & Dewettinck, K. (2003). Combined CFD and experimental approach for determination of the surface heat transfer coefficient during thermal processing of eggs. *Journal of Food Science*, 68, 943-951.

Denys, S., Pieters, J.G., & Dewettinck, K. (2004). Computational fluid dynamics analysis of combined conductive and convective heat transfer in model eggs. *Journal of Food Engineering* 63, 281–290.

Denys, S., Pieters, J.G., & Dewettinck, K. (2005). Computational fluid dynamics analysis for process impact assessment during thermal pasteurization of intact eggs. *Journal of Food Protection*. 68, 366-374.

\* Fabbri A., Cevoli C., Giunchi A. (2010) Validation of a simplified Numerical Model for Hot Air Treatment of Egg Shell Surface. Inviato per pubblicazione al *Journal of Food Process Engineering*.

Fabbri, A., Cevoli, C., & Sirri, F. (2007). Measurement of thermal properties of table egg's components. In *European Symposium on the quality Eggs and egg products*, Prague, CZ.

Fabbri, A. (2005) Applicazioni dei metodi di simulazione numerica nell'ingegneria agroalimentare. *Proceedings of AIIA meeting 2005*, Catania 27-30 June 2005

Erdogdu, F., Ferrua, M., Singh, S.K., & Singh, R.P., (2007). Air-impingement cooling of boiled eggs: Analysis of flow visualization and heat transfer. *Journal of Food Engineering*. 79, 920–928

Hammershoj, M., Larsen, L. B., Andersen, A. B., & Qvist K. B., (2001). Storage of shell eggs influences the albumen gelling properties. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 53, 62-69

Khan, W.A., Culham, J.R., and Yovanovich, M.M. (2005) Fluid flow around and heat transfer from an infinite circular cylinder. *Journal of Heat Transfer*. 127,785-790.

Olsson, E.E.M., Ahrn, L.M., & Tragardh, A.C. (2004) Heat transfer from a slot air jet impinging on a circular cylinder. *Journal of Food Engineering*, 63, 393–401.

Pasquali, F., Fabbri, A., Cevoli, C., Manfreda, G., & Franchini A. (2010) Hot Air Treatment for Surface Decontamination of Table Eggs. *Food Control*. 21, 431-435.

Pop, Y., & Yan, B. (1998) Forced convection flow past a circular cylinder and a sphere in a darcian fluid at large Peclet numbers. *Heat Mass Transfer*. 25, 261-267

Hammershoj M., & Larsen, L.B, (2001). Effect of hen egg production and protein composition on textural properties of egg albumen gels. *Journal of texture studies* 32, 105-129.

Romanoff, A.L., & Romanoff, A. J. (1949). The avian egg. John Wiley and Sons, Inc, NewYork.

Scott, G., & Richardson, P. (1997). The application of computational fluid dynamics in the food industry. *Trends Food Science Technology*,8 ,119-24.

Takayuki, T., & Tamotsu, I. (2006) Heat Transfer Enhancement of a Circular Cylinder. *Journal of Heat Transfer*, 128, 226-232.

\* *L'articolo è diretta espressione dell'attività di ricerca illustrata nel precedente capitolo.*



# CAPITOLO 4

## PROTOTIPO PER IL TRATTAMENTO AD ARIA CALDA IN REGIME DI CONVEZIONE FORZATA DELLA SUPERFICIE DELLE UOVA IN GUSCIO

### **Introduzione**

Il prototipo è stato ideato con riferimento a quanto riportato da James et al. (2002) in *Surface pasteurisation of shell eggs*. Gli autori, per generare aria calda, hanno utilizzato un “hot air gun” (Power Devil PDW 5001, 1500 W) con due regolazioni di temperatura: 300 e 500 °C. Durante il funzionamento, il generatore di aria calda veniva acceso un minuto prima di esporre l’uovo in modo da raggiungere la massima temperatura di utilizzo. Tramite prove preliminari hanno dimostrato che, per evitare un riscaldamento eccessivo, le uova dovevano essere posizionate ad almeno 150 mm dall’ugello del termosoffiatore e non dovevano essere esposte per più di 8 secondi a 500°C. Tempi di trattamento più lungo, a distanza di 150 mm, potevano danneggiare il guscio o cuocere parzialmente il contenuto delle uova. Distanze più elevate tra il generatore di aria calda e la superficie delle uova richiedevano tempi di trattamento sostanzialmente troppo elevati per raggiungere temperature utili alla decontaminazione.

L’obiettivo primario del presente lavoro è stato quello di ideare e mettere a punto un prototipo da laboratorio in grado di effettuare diverse tipologie di trattamento in termini di temperatura e velocità dell’aria calda, velocità dell’aria fredda, velocità di rotazione dell’uovo e durata del trattamento.

In seguito è stato selezionato un unico trattamento termico in base ai risultati ottenuti da prove microbiologiche e test di torbidità effettuati sull’albume. Il trattamento scelto è stato caratterizzato termicamente con l’ausilio di termocoppie.

## **Materiali e metodi**

### *Struttura del prototipo*

Il prototipo (figura 4.1) è stato costruito, dietro specifiche indicazioni, in collaborazione con una piccola azienda che produce impianti per la selezione della frutta. In via schematica è costituito da due generatori di aria calda, un generatore di aria fredda e un sostegno rotante per il supporto dell'uovo campione.

I contenuti della scheda tecnica redatta dal costruttore sono riportati di seguito, mentre i disegni tecnici sono riportati in figura 4.2 e 4.3.

Il sostegno rotante è costituito da una coppia di rulli cilindrici in acciaio, del diametro di 22 mm, accostati in modo tale da lasciare una luce pari a 30 mm (con interasse pari a 52 mm). Tali rulli sono azionati da una cinghia che agisce lateralmente. Poiché le uova hanno diametri differenti, per fini di sperimentazione, è necessario poter variare la velocità di rotazione dei rulli almeno in un range +/- 20%. Il motore è un asincrono monofase, alimentato a 220V, servito da un variatore di velocità elettronico.

E' presente un diaframma per impedire lo scorrimento longitudinale dell'uovo.

Un sostegno a portale permette l'alloggiamento di due generatori che possono essere spostati verticalmente e longitudinalmente, mediante un carrello, in modo tale che l'uovo non risulti investito dalla corrente d'aria durante trattamenti caratterizzati dall'alternanza di periodi di riscaldamento e di raffreddamento in aria libera.

Il posizionamento dei due generatori permette l'inclinazione dell'asse, su due direttrici convergenti a circa 45° sull'orizzontale, in modo che il flusso d'aria sia distribuito su tutta la superficie esterna dell'uovo.

Dalla parte opposta rispetto al generatore d'aria calda si trova un distributore (a feritoia), servito da una valvola a leva, predisposto per il collegamento con un circuito d'aria compressa. Il corpo dell'impianto è realizzato con tecniche di

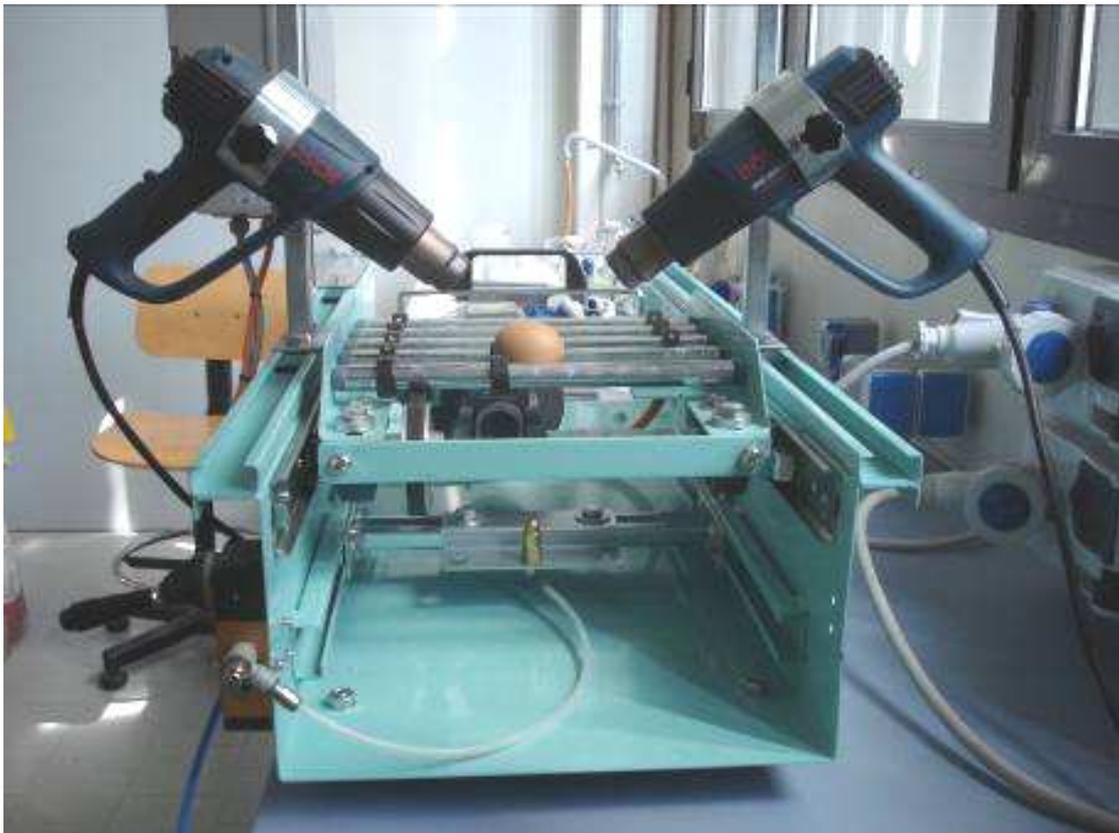
carpenteria ed è dotato di piedini regolabili per permette l'appoggio orizzontale su un banchetto da laboratorio.

I generatori di aria calda sono due termosoffiatori Bosh, model GHG 660 LCD-professional, caratterizzati dai dati tecnici riportati in tabella 4.1.

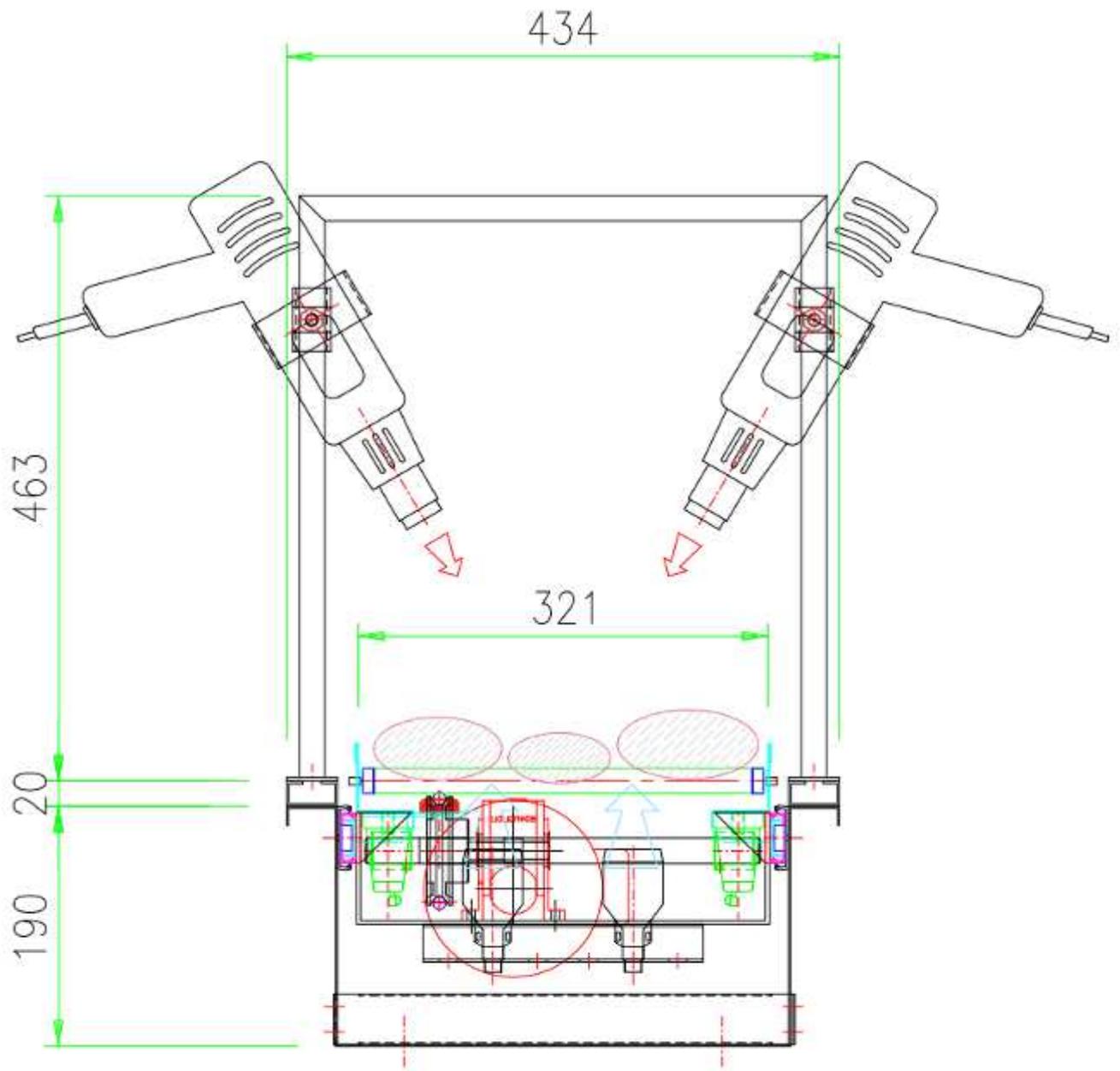
L'aria fredda è generata dal compressore generale del laboratorio, la sua temperatura coincide sostanzialmente con quella ambientale, mentre la sua velocità è regolabile tramite una piccola valvola (velocità minima:  $10 \text{ ms}^{-1}$ , velocità massima:  $60 \text{ m ms}^{-1}$ ).

I rulli ruotano con velocità angolare variabile nel range 0.4 - 1.4 Hz.

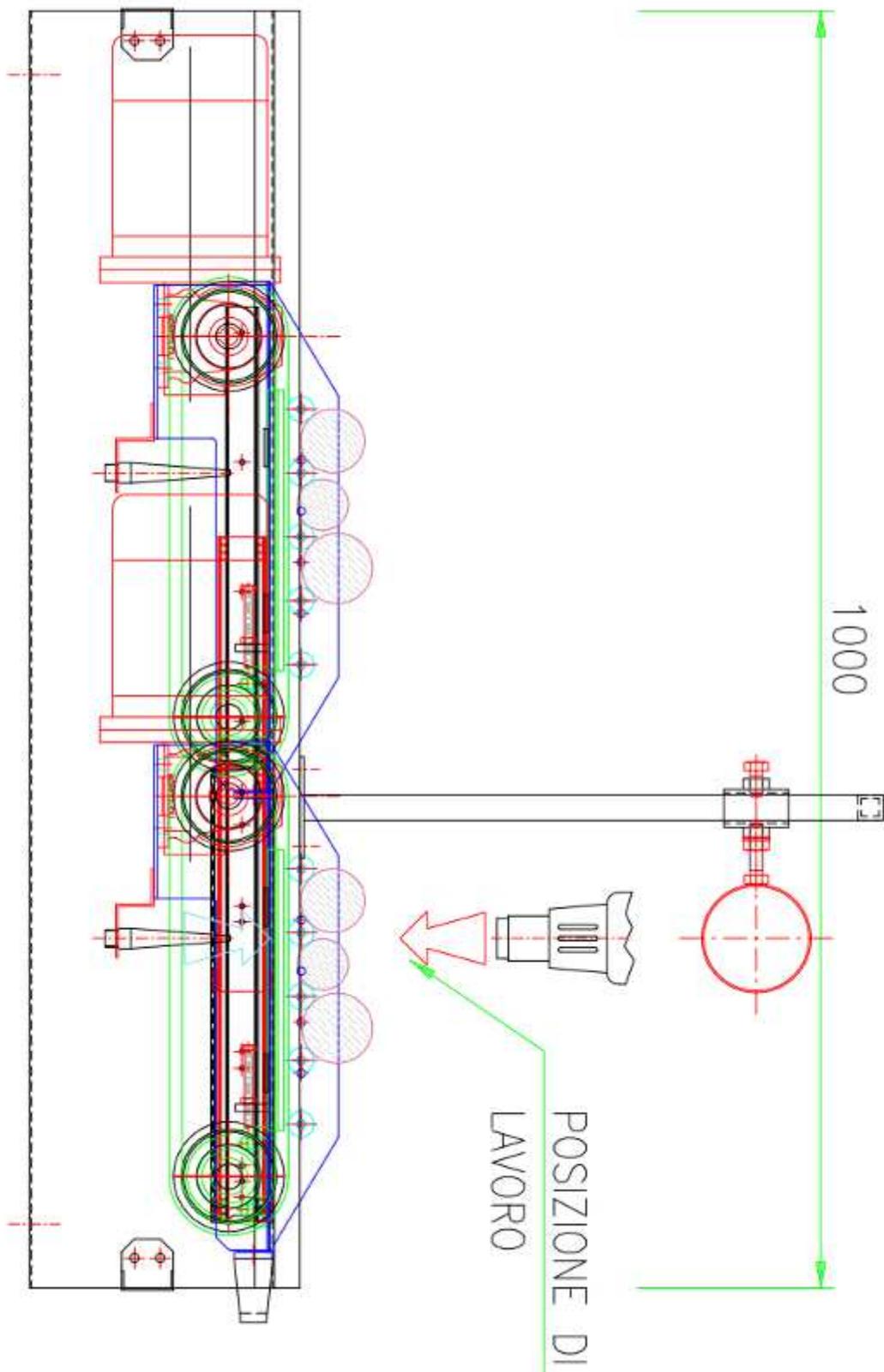
In tabella 4.2 sono riportate le variabili su cui è possibile agire per determinare differenti trattamenti.



**Figura 4.1:** prototipo utilizzato durante la sperimentazione.



**Figura 4.2:**disegno tecnico del prototipo visto frontalmente



**Figura 4.3:**disegno tecnico del prototipo visto lateralmente.

Potenza nominale assorbita	2.300 W
Tensione	220-240 V
Temperatura uscita bocchetta	50 – 660 °C
Precisione di misura della temperatura	± 5%
Flusso d'aria	250 – 500 l/min
Temperatura esercizio display	-20...+70°C
Peso	1.0 kg
Lunghezza	255 mm
Altezza	255 mm

**Tabella 4.1:** dati tecnici relativi al termo soffiatore Bosch GHG 660 LCD Professional.

Velocità dell'aria fredda	10-60 (ms <sup>-1</sup> )
Velocità dell'aria calda	5-10 (ms <sup>-1</sup> )
Temperatura aria calda uscita bocchetta	50-660 (°C)
Velocità di rotazione dei rulli	0.4-1.4 (Hz)
Durata del trattamento	0...∞ (s)

**Tabella 4.2:** variabili e relativi range caratterizzanti i vari trattamenti.

### *Selezione dei trattamenti*

Dopo diversi tentativi di messa a punto del prototipo, soprattutto in termini di inclinazione dei due generatori di aria calda e di stabilità dei flussi d'aria calda e fredda, sono state effettuate le prove per la selezione dei trattamenti.

Per tutti i trattamenti testati la temperatura dell'aria calda è stata impostata al valore massimo (660°C all'uscita della bocchetta dei termosoffiatori, circa 350°C in prossimità dell'uovo) così come la velocità dell'aria calda (10 ms<sup>-1</sup>). Tale scelta è giustificata dal fatto che uno degli obiettivi dell'intero lavoro qui proposto, è stato la ricerca di un trattamento di decontaminazione di breve durata, per evitare il più possibile la propagazione di calore all'interno dell'uovo. E' risultato quindi indispensabile imporre la massima temperatura raggiungibile sulla superficie dell'uovo e di conseguenza variare la durata del trattamento, la velocità di rotazione e la velocità dell'aria fredda.

Con l'ausilio del modello numerico, precedentemente costruito, si è deciso di verificare una decina di trattamenti (tabella 4.3) che, secondo il modello di simulazione, nello strato interno del guscio sono in grado di indurre temperature inferiori ai 60°C (temperatura di coagulazione dell'albume) mentre, nello strato esterno, temperature il più elevate possibili.

### *Valutazione dello stato di coagulazione dell'albume*

Per ogni trattamento selezionato sono state trattate 30 uova ed è stato valutato l'effettivo stato di coagulazione dell'albume tramite prove di torbidità. La valutazione è stata effettuata anche su 30 uova fresche (controllo).

In particolare, per ogni uovo, sono state riempite due cuvette da 4ml con l'albume ed è stata misurata l'assorbanza (Ass) a 600nm tramite spettrofotometro (Spectrophotometer UV-1601, Shimadzu Corporation, Japan). Per ogni cuvetta sono state acquisite tre misure.

Partendo dai valori di assorbanza, la torbidità di ogni campione è stata ottenuta mediando i valori (6 per ogni campione) ottenuti tramite la seguente formula:

$$\tau_{alb}(\lambda) = -\frac{1}{l} \ln\left(\frac{T(\lambda)}{100}\right) \quad (1)$$

Dove  $T$  è il valore della trasmittanza ( $Ass = -\log T$ ),  $l$  è la lunghezza della provetta e  $\tau_{alb}$  la torbidità dell'albume.

#### *Valutazione del potere decontaminante*

Il potere decontaminante dei trattamenti è stato valutato tramite delle prove microbiologiche effettuate in collaborazione con il CRIPS (Centro di Ricerca Interdipartimentale sulle Tecnologie e l'Igiene degli Allevamenti Intensivi delle Piccole Specie – DISA/UniBO) ed in particolare con il dott. Gerardo Manfredra e la dott.sa Frederique Pasquali.

Il microrganismo testato è la *Salmonella* Enteritidis (MB2509), in particolare il ceppo resistente alla streptomina.

Ricordiamo infatti che, da tempo, la salmonellosi associata al consumo di uova è un importante problema di salute pubblica per tutto il mondo (Robert & Sockett 1994, EFSA 2009). La *Salmonella* Enteritidis è il sierotipo più frequentemente associato con la salmonellosi umana causata dal consumo di uova, carne di pollame poco cotta e da contaminazione incrociata nella ristorazione.

In particolare in Europa nel 2007 (EFSA, 2009), questo sierotipo ha causato il 64,5% delle infezioni umane da *Salmonella*.

Grazie alla sua capacità unica di persistere durante i successivi cambiamenti che avvengono nell'ambiente e nella popolazione dei roditori, la *Salmonella* Enteritidis rappresenta, in Europa, il sierotipo più frequentemente isolato negli allevamenti di galline ovaiole con il 18,3% di prevalenza nel periodo 2004-2005 (EFSA, 2007).

Le procedure di preparazione dell'inoculo e di inoculo delle uova sono descritte in dettaglio nel capitolo 6.

Il potere decontaminante dell'aria calda è stato valutato su uova inoculate sperimentalmente con *Salmonella* Enteritidis e su uova non inoculate, contenenti

solamente la microflora indigena. La stima della contaminazione sul guscio è stata effettuata subito dopo il trattamento e dopo 6 giorni su 10 uova trattate per giorno per la microflora patogena/indigena e su 5 uova non trattate per giorno per la microflora patogena/indigena (controllo positivo). Le uova sono state conservate a 20-25°C. La stima della contaminazione del guscio è stata effettuata a temperatura ambiente aggiungendo 10 ml di soluzione fisiologica salina al guscio all'interno di una busta di plastica. Il guscio è stato sfregato per circa un minuto all'interno della busta in modo da staccare i batteri. La conta è stata effettuata piastrando 100 µl di diluente utilizzato per trattenere i batteri del guscio in Brilliant Green Agar (Oxoid, code CM0263) per la conta della *Salmonella*.

Nel caso di 0-4 colonie, è stato assegnato il valore di 0 CFU. Questo valore corrisponde a concentrazioni di celle batteriche, presenti sul guscio, più basse del limite di rilevamento di 10<sup>2</sup> CFU/guscio.

Trattamento	Velocità aria fredda (ms <sup>-1</sup> )	Durata trattamento (s)	Numero di shots
T1	5	4	1
T2	10	6	1
T3	15	8	1
T4	20	10	1
T5	30	15	1
T6	45	22	1
T7	10	8+60+8	2
T8	15	8+30+8	2
T9	20	10+30+10	2
T10	45	15+30+15	2

**Tabella 4.3:** trattamenti testati caratterizzati da differenti combinazioni di velocità dell'aria fredda, durata del trattamento e numero di shots (alternanza di aria calda e fredda).

### *Definizione dei profili termici*

Tramite la determinazione dei profili di temperatura in diversi punti dell'uovo e dello strumento è stato caratterizzato termicamente il ciclo termico scelto precedentemente tramite la valutazione dei test di coagulazione e microbiologici.

Sono state utilizzate termocoppie di tipo K (Chromel/Alumel) collegate ad una scheda di acquisizione del tipo DAQ. L'elaborazione del segnale è stata condotta mediante l'utilizzo di Labview-SignalExpress.

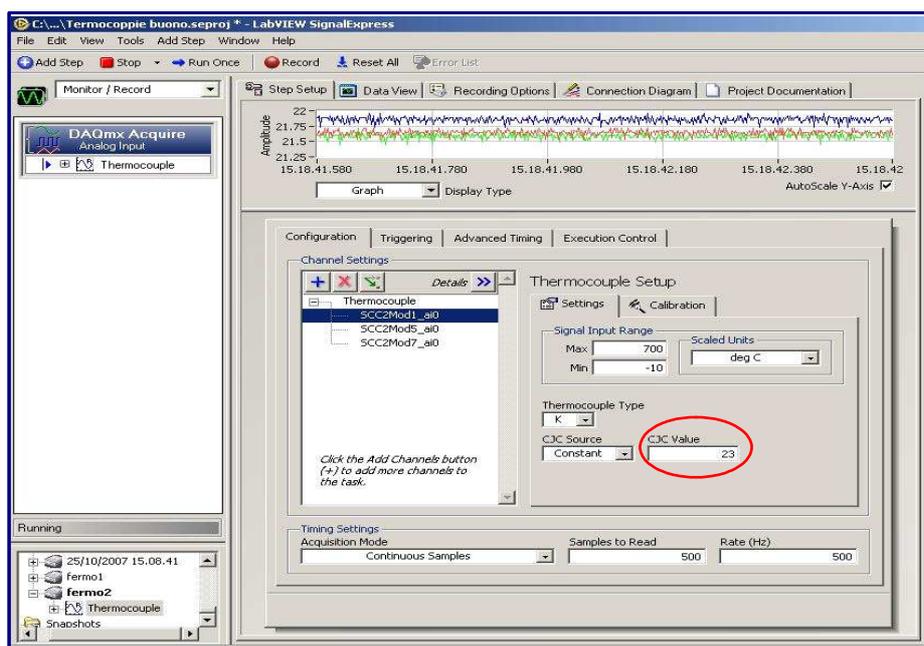
Prima di poter effettuare le misurazioni è stato necessario tarare le termocoppie. Il programma utilizzato permette di tarare la temperatura tramite un comando inserito nella schermata di configurazione dei sensori (figura 4.4).

Il valore inserito come CJC Value (calibrazione del giunto freddo) è relativo alla temperatura alla quale si trova il giunto freddo che, nel nostro caso, coincideva con la temperatura ambiente. La differenza di potenziale che c'è tra giunto caldo e giunto freddo è, in genere, riferita ad una temperatura standard di 0°C del giunto freddo e, tramite taratura, si imposta il campionamento in modo tale da considerare la temperatura del giunto freddo pari a 0°C. La taratura può essere effettuata immergendo il giunto caldo delle termocoppie in acqua in ebollizione (100°C) ed effettuando la controprova immergendole successivamente in una miscela di acqua e ghiaccio, correggendo poi eventuali errori commessi con la prima taratura (in genere nell'ordine dei decimi di °C).

La scheda d'acquisizione è stata impostata alla sua massima frequenza di acquisizione, pari a 12 Hz.

Le prove sono state effettuate inizialmente con una sola termocoppia posizionata prima nella zona equatoriale dell'uovo e successivamente nella zona del polo acuto o del polo ottuso. In un secondo momento sono state utilizzate contemporaneamente due termocoppie, una situata nella bocca di uscita di uno dei due generatori di aria calda e l'altra in una delle tre zone dell'uovo sopra citate.

Per ogni tipologia di misurazione sono state effettuate 10 ripetizioni utilizzando uova di tipo A con un peso medio di 65 g.



**Figura 4.4:** interfaccia di Labview per la taratura delle termocoppie; il cerchio rosso indica il campo per la taratura del giunto freddo (CJC).

## Risultati e discussione

Per quanto riguarda la *valutazione dello stato di coagulazione* dell'albume, il 98% delle uova testate non ha riportato incrementi significativi, in termini di torbidità, rispetto ad albumi provenienti da uova fresche.

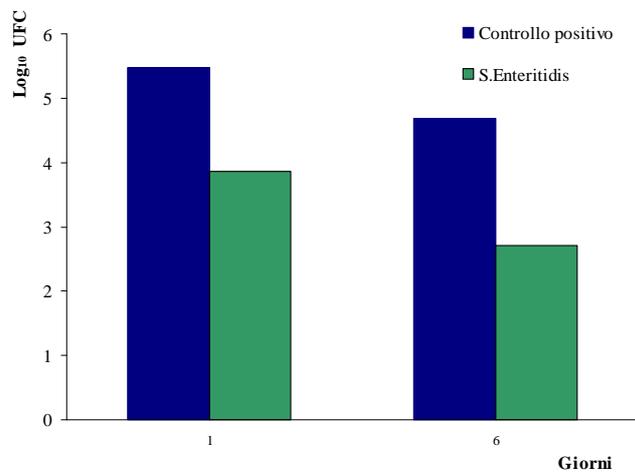
Le uova che hanno riportato segni di coagulazione (2% del totale) appartenevano al trattamento T9 e T10. Tale risultato poteva essere dedotto anche osservando i grafici relativi alle simulazioni numeriche dei medesimi trattamenti, infatti, al termine del trattamento, all'interno del guscio si raggiungevano temperature prossime ai 65°C.

I *test microbiologici*, anche se preliminari, hanno riportato risultati interessanti.

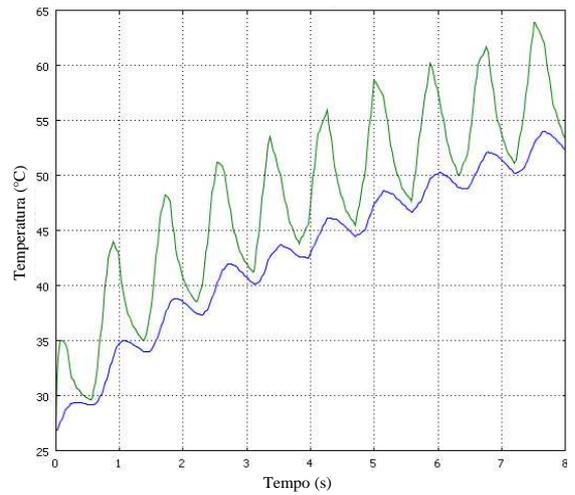
Per tutte le prove effettuate si osserva un decremento della carica microbica (*Salmonella* Enteritidis) tra campioni valutati immediatamente dopo il trattamento e dopo 6 giorni di conservazione. Tale andamento è riscontrabile anche nei campioni di controllo.

Di seguito vengono riportati i risultati microbiologici relativi a 4 trattamenti: T3, T6, T9 e T10 (figura 4.5.a, figura 4.6.a, figura 4.7.a, figura 4.8.a). Per ogni trattamento preso in considerazione viene mostrato anche l'andamento della temperatura sulla superficie interna (linea blu) e esterna (linea verde) del guscio ottenuto tramite simulazione numerica (figura 4.5.b, figura 4.6.b, figura 4.7.b, figura 4.8.b.).

Il migliori risultati, in termini di riduzione della carica microbica di *Salmonella* Enteritidis sulla superficie del guscio, sono stati ottenuti per il trattamento T3 (durata di 8 secondi e velocità dell'aria fredda pari a 15 m s<sup>-1</sup>) e il trattamento T6 (durata 22 secondi e velocità dell'aria fredda pari a 45 m s<sup>-1</sup>). La riduzione rispetto al controllo positivo è in media di circa 2 log<sub>10</sub> UFC, sia per i campioni analizzati immediatamente dopo il trattamento che per i campioni analizzati dopo 6 giorni di conservazione.

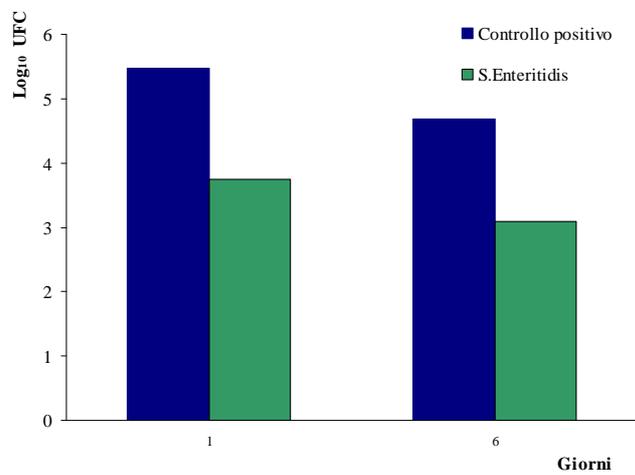


a)

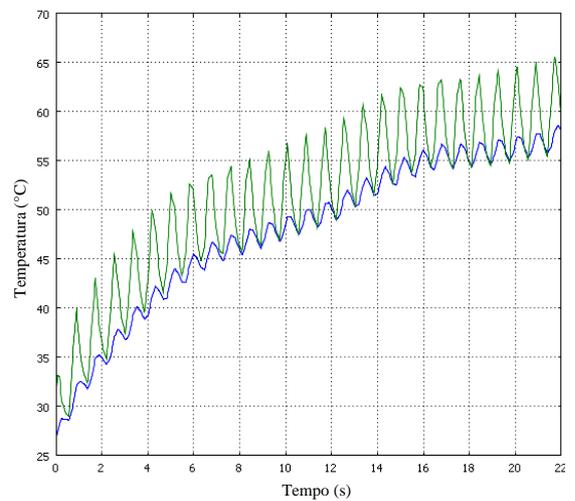


b)

**Figura 4.5:** risultati microbiologici (a) e profili termici (b), dell'interno (linea blu) e dell'esterno (linea verde) del guscio, ottenuti tramite simulazione numerica, corrispondenti al trattamento T3.

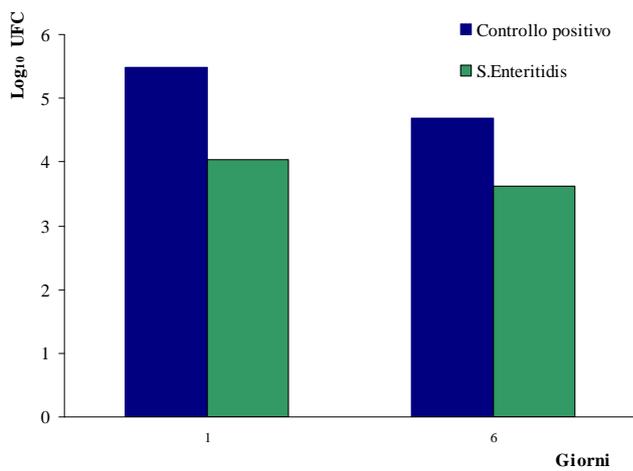


a)

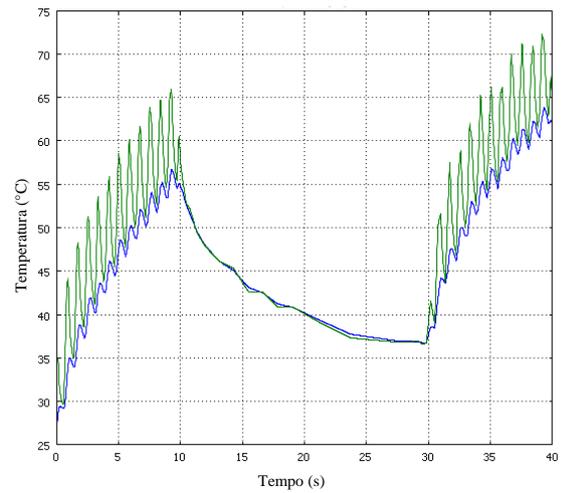


b)

**Figura 4.6:** risultati microbiologici (a) e profili termici (b), dell'interno (linea blu) e dell'esterno (linea verde) del guscio, ottenuti tramite simulazione numerica, corrispondenti al trattamento T6.

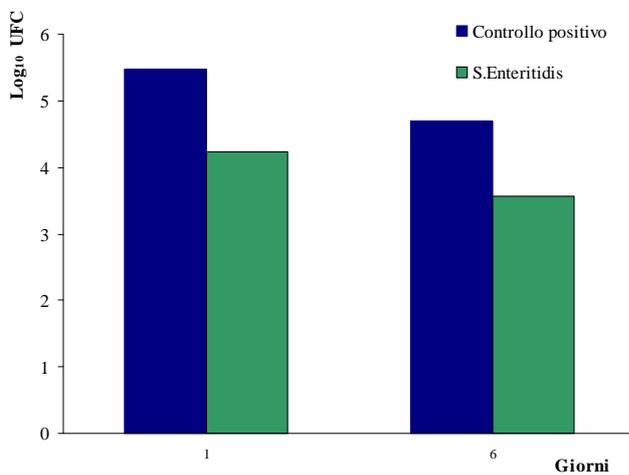


a)

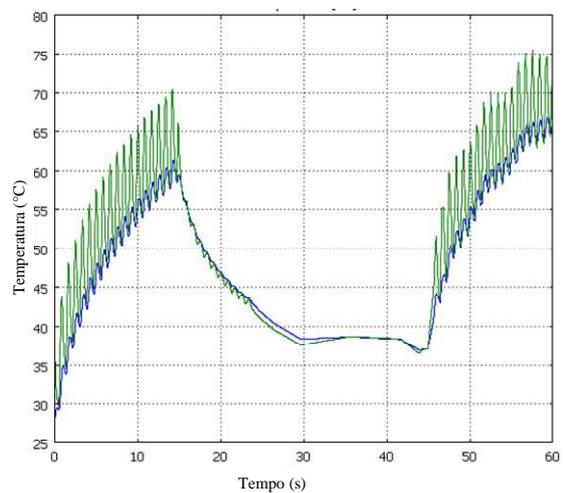


b)

**Figura 4.7:** risultati microbiologici (a) e profili termici (b), dell'interno (linea blu) e dell'esterno (linea verde) del guscio, ottenuti tramite simulazione numerica, corrispondenti al trattamento T9.



a)



b)

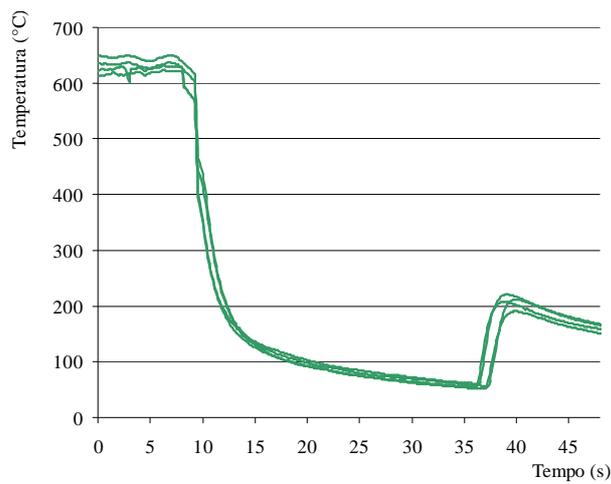
**Figura 4.8:** risultati microbiologici (a) e profili termici (b), dell'interno (linea blu) e dell'esterno (linea verde) del guscio, ottenuti tramite simulazione numerica, corrispondenti al trattamento T10.

Nell'ottica di una possibile implementazione industriale, dopo la valutazione delle diverse prove microbiologiche e dello stato di coagulazione dell'albume, è stato selezionato un unico trattamento (T8). Tale trattamento è caratterizzato da due brevi shots (8 secondi) di aria calda e fredda separati da 30 secondi di sola aria fredda alla velocità di  $15\text{ms}^{-1}$ .

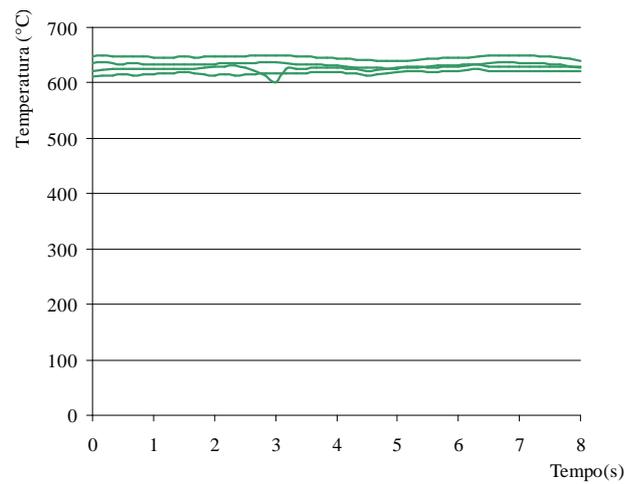
Per quanto riguarda la *definizione dei profili termici* relativi al trattamento T8, in figura 4.9 è riportato l'andamento (4 repliche) della temperatura acquisita nella bocca di uscita di uno dei due generatori di aria calda. In generale, le curve risultano essere riproducibili e si assestano attorno ai  $650^{\circ}\text{C}$  durante i primi 8 secondi di trattamento (figura 4.9.b), mentre durante gli ultimi 8 secondi di trattamento la temperatura massima raggiunta è di circa  $200^{\circ}\text{C}$ . Le notevoli differenze tra le temperature raggiunte nel primo e nel secondo shot sono dovute al fatto che, mentre il primo shot iniziava solo quando i due generatori avevano raggiunto la temperatura massima (circa 30 secondi di riscaldamento), il secondo iniziava con l'accensione dei due generatori (non c'era una fase di riscaldamento). In figura 4.10 sono riportati gli andamenti della temperatura acquisita nella zona equatoriale dell'uovo esposta ai flussi di aria calda durante l'intero trattamento (46 secondi). Ricordiamo che, durante il trattamento, l'uovo girava su dei rulli con una velocità di 1.2 Hz mentre la termocoppia rimaneva fissa, quindi la temperatura acquisita non è relativa ad un punto, ma alla circonferenza equatoriale dell'uovo che era in movimento. Durante i primi 8 secondi, nella zona equatoriale, si raggiungono temperature di circa  $330\text{-}350^{\circ}\text{C}$ . E' ipotizzabile che le oscillazioni siano state causate dai leggeri spostamenti della termocoppia provocati dalla presenza diretta dei flussi di aria calda (primi 8 secondi). Durante gli ultimi 8 secondi di trattamento si riscontra un repentino aumento della temperatura acquisita che tocca i  $120^{\circ}\text{C}$ .

In figura 4.11 sono riportati gli andamenti (4 repliche) della temperatura durante i 46 secondi del trattamento acquisita all'altezza del polo acuto dell'uovo. Le curve risultano essere riproducibili anche se i valori massimi raggiunti toccano mediamente valori più bassi, circa 150°C, rispetto ai valori che si raggiungono nella zona equatoriale e del polo ottuso. Tale differenza può essere giustificata dalla possibile deviazione del flusso di aria calda, proveniente dai generatori, causata dai due "anelli" utilizzati per bloccare l'uovo, posizionati proprio a livello del polo acuto. Anche in questo caso, le notevoli differenze tra le temperature raggiunte nel primo e nel secondo shot, sono dovute al fatto che, mentre il primo shot iniziava solo quando i due generatori raggiungevano la temperatura massima (circa 20 secondi di riscaldamento), il secondo iniziava con l'accensione dei due generatori (non c'è una fase di riscaldamento).

In figura 4.12 sono riportati gli andamenti (4 repliche) della temperatura acquisita all'altezza del polo ottuso dell'uovo durante tutto il trattamento (46 secondi). E' possibile osservare che, nella zona del polo ottuso, si raggiungono temperature di circa 230-250 °C. Tali temperature risultano essere molto elevate rispetto a quelle acquisite nella zona del polo ottuso e più simili a quelle acquisite nella zona equatoriale anche se inferiori.

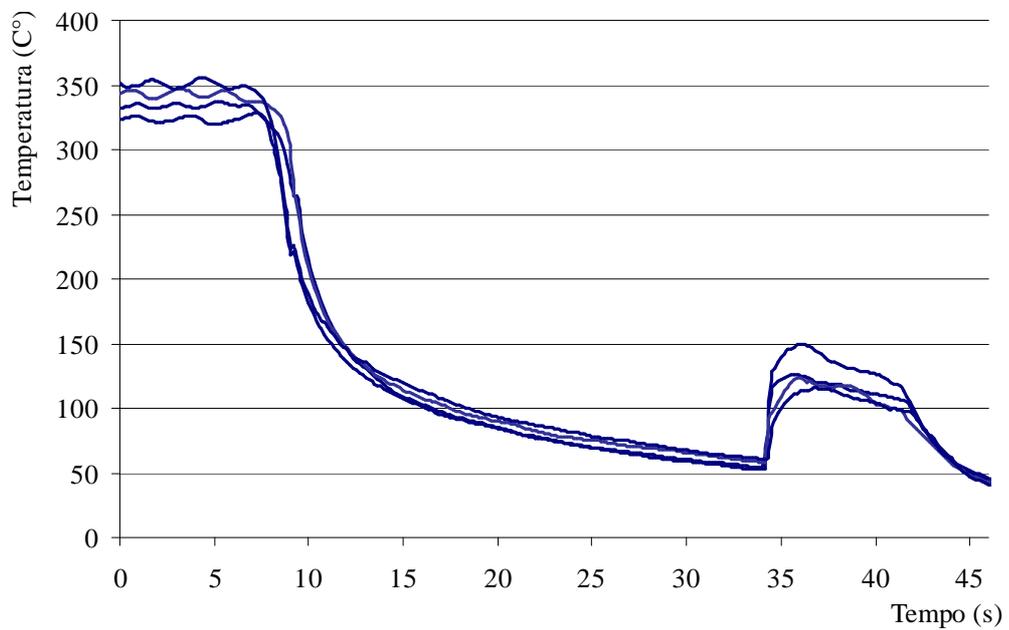


a)

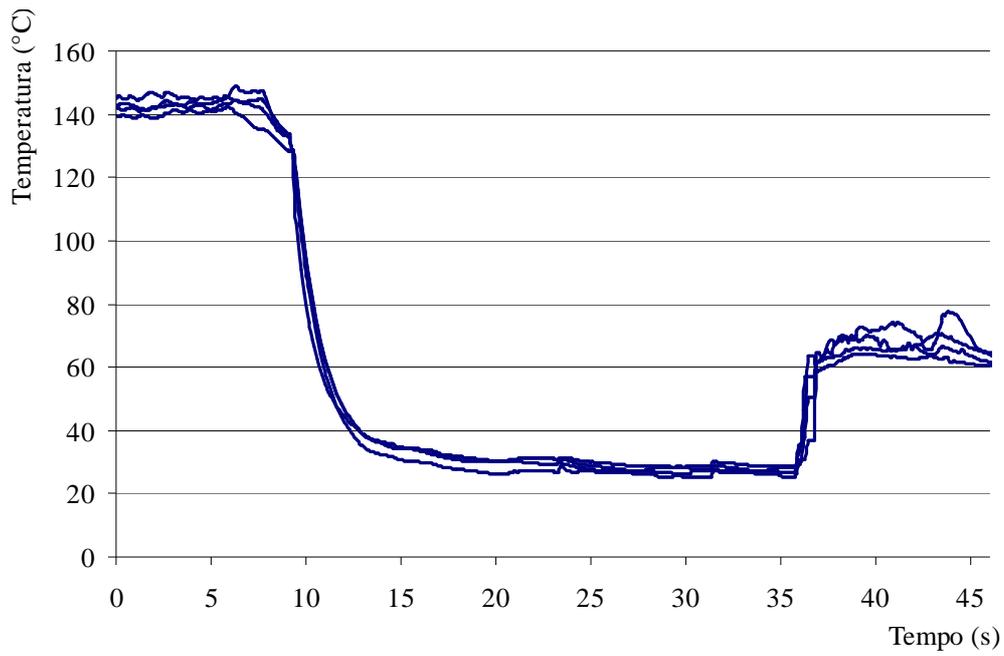


b)

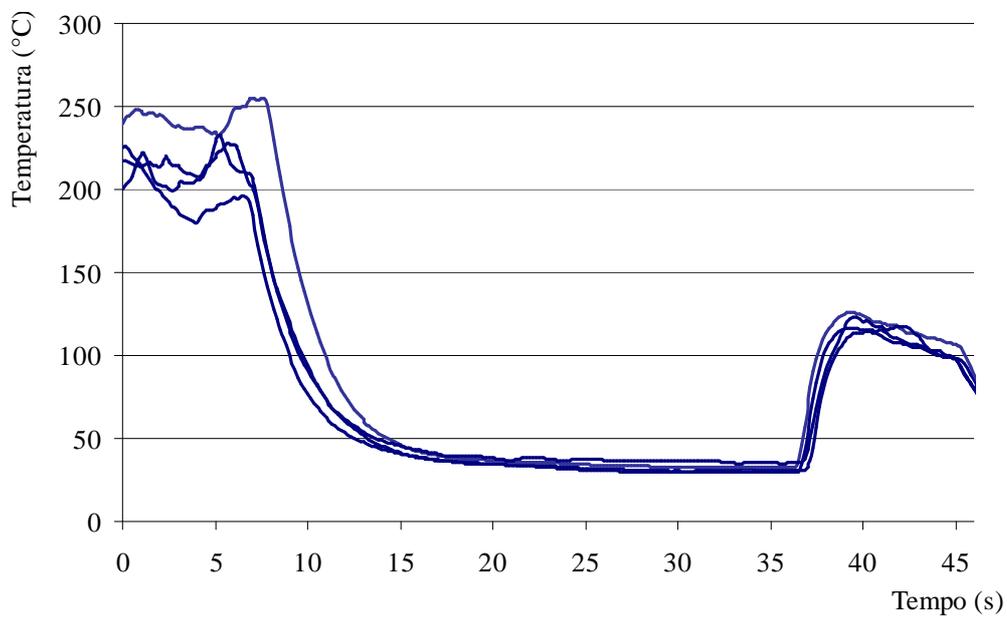
**Figura 4.9:** temperatura acquisita all'uscita di uno dei due generatori di aria calda: a) intero trattamento (46 secondi); b) primo shot (8 secondi).



**Figura 4.10:** temperatura acquisita nella zona equatoriale dell'uovo durante i 46 secondi di trattamento.



**Figura 4.11:** temperatura acquisita nella zona del polo acuto dell'uovo durante i 46 secondi di trattamento.



**Figura 4.12:** temperatura acquisita nella zona del polo ottuso dell'uovo durante i 46 secondi di trattamento.

## **Bibliografia**

European Food Safety Authority. (2007). Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of Salmonella in holdings of laying hen flocks of Gallus gallus. *The EFSA Journal*, 97

European Food Safety Authority, (2009), The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2007, *The EFSA Journal* . 223.

James, C., Lechevalier, V., & Ketteringham, L. (2002). Surface pasteurisation of shell eggs. *Journal of Food Engineering*. 53, 193–197.

Roberts J. A., Sockett P. N. (1994). The socio-economic impact of human *Salmonella* enteritidis infection. *International Journal of Food Microbiology* 21, 117-129.



## CAPITOLO 5

# EFFETTI DEL TRATTAMENTO AD ARIA CALDA IN REGIME DI CONVEZIONE FORZATA SULLA QUALITÀ DELL'UOVO

### **Introduzione**

Procedendo dall'interno verso l'esterno, l'uovo è formato da tuorlo, albume e guscio. Due membrane costituite da fibre proteiche intrecciate, dette membrane testacee, separano l'albume dal guscio: una è aderente all'albume l'altra al guscio, ma al polo ottuso esse si separano per dar spazio alla camera d'aria. La camera d'aria aumenta di volume man mano che l'uovo invecchia e per questo motivo la sua altezza viene utilizzata commercialmente per valutare la freschezza dell'uovo.

L'aumento della camera d'aria è dovuto alla perdita di acqua, con conseguente perdita anche del peso dell'uovo e dipende, oltre che dalla durata dello stoccaggio, dalla temperatura ed umidità relativa dei locali di conservazione e dallo spessore e porosità del guscio. Le dimensioni medie di un uovo di 60 g sono le seguenti: asse maggiore di cm 5,8, asse minore di cm 4,2, circonferenza maggiore di cm 16, circonferenza minore di cm 13, volume di 55 cm<sup>3</sup> e superficie di cm<sup>2</sup> 70. (Cabras & Martelli, 2004).

Il guscio rappresenta la parte non edibile dell'uovo, è sottile, fragile e poroso, di colore da rosa a bruno o bianco e pesa da 5 a 7 g. E' costituito oltre che da una piccola parte di acqua (1%), da proteine che formano una trama su cui si sviluppa la parte minerale composta prevalentemente da cristalli di carbonato di calcio (93,6%), carbonato di magnesio e fosfato tricalcico.

In esso si distinguono, dall'interno all'esterno, uno strato mamillare ed uno strato a palizzata o strato spugnoso.

Il guscio è attraversato da numerosi pori che permettono lo scambio dei gas ed ha mediamente uno spessore che varia da 280 a 300  $\mu\text{m}$  (Cabras & Martelli, 2004).

La cuticola è un sottile strato glicoproteico non calcificato che si trova sulla superficie esterna del guscio e serve ad occludere i pori limitando l'evaporazione di liquidi e l'ingresso dei microrganismi all'interno dell'uovo. Tale protezione può essere danneggiata dal lavaggio o da conservazioni troppo prolungate.

All'interno il guscio è ricoperto da due membrane testacee leggermente elastiche e biancastre accollate fra loro, salvo che in corrispondenza del polo ottuso dell'uovo dove formano la camera d'aria. Quest'ultima si genera per il rapido raffreddamento dell'uovo dopo la deposizione, che porta alla penetrazione di aria e allo scollamento delle due lamine. Ciascuna membrana è composta da più strati.

La membrana interna è organizzata in almeno tre piani di fibre orientate in modo differente, per uno spessore totale di circa 22  $\mu\text{m}$ .

La membrana esterna è più complessa. Ha uno spessore di circa 50  $\mu\text{m}$  e possiede fibre brevi e spesse, poste in almeno 6 piani e orientate ad angolo retto tra piano e piano.

Metodi di misura della qualità del guscio:

- integrità della cuticola: tramite specifici coloranti che fanno presa sulla fase proteica della struttura; in assenza di cuticola dopo trattamento, l'uovo appare del suo colore naturale;
- misure dirette di resistenza a una forza di rottura (compressione, impatto, puntura);
- misure indirette di resistenza: valutazione di alcuni parametri legati principalmente alla quantità di guscio deposta (peso specifico, deformazione non distruttiva, analisi di vibrazione);
- determinazione di micro-crack tramite test acustico;
- misura dello spessore (al polo acuto, polo ottuso e equatore) e del peso del guscio (asciugato, a 20 °C). Lo spessore deve toccare almeno i 330  $\mu\text{m}$  perché

l'uovo abbia più del 50% possibilità di rimanere intatto durante la manipolazione;

- valutazione del colore mediante colorimetro;
- valutazione della forma allungata o rotondeggiante calcolata come rapporto tra diametro all'equatore e lunghezza dell'uovo, moltiplicato per 100 (contribuisce alla resistenza del guscio, preferibilmente rotondeggiante);
- misura dell'altezza della camera d'aria (aumenta con l'invecchiamento dell'uovo) tramite speratura o tramite metodo distruttivo con micrometro;
- valutazione delle membrane testacee tramite determinazione del calo peso percentuale dell'uovo durante la conservazione.

L'albume è caratterizzato da quattro distinti strati: albume fluido esterno, albume denso, albume denso più interno e strato calazifero (Romanoff & Romanoff 1949). Chimicamente il maggiore costituente di tutti gli strati è l'acqua (dall' 84 all' 89% passando dallo strato più esterno a quello più interno); il contenuto in solidi totali varia tra l'11 e il 13%, le proteine rappresentano la componente principale (dal 9,7 al 10,6% del peso dell'albume) mentre i carboidrati e gli elementi inorganici variano rispettivamente dallo 0,4 allo 0,9% e dallo 0,5 allo 0,6%.

Con l'invecchiamento dell'uovo, l'albume subisce cambiamenti nelle sue caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche legati ad un incremento del valore del pH conseguente la perdita di CO<sub>2</sub> attraverso i pori del guscio (Burley et al. 1989). Ciò comporta una graduale liquefazione della struttura gelatinosa della sua porzione densa e un incremento del contenuto d'acqua nel tuorlo (Li-Chan et al., 1989).

Metodi di misura della qualità dell'albume:

- valutazione della freschezza tramite metodo di Haugh con un micrometro a tripode a circuito elettrico si misura l'altezza del gel di albume denso subito intorno al tuorlo, e in funzione del peso dell'uovo si calcola un valore che va da 20 a 110 UH; 60 UH è considerato il minimo accettabile. La riduzione

dell'altezza dell'albume è attribuita alla proteolisi dell'ovomucina, alla rottura di ponti disolfuro, a interazioni con il lisozima e a cambiamenti nell'interazione tra ovomucine. Le esatte modificazioni chimiche che avvengono nell'uovo durante lo stoccaggio non sono ancora state identificate;

- misura del pH: di circa 7.8 per l'uovo appena depresso, sale con il tempo fino a valori superiori a 9.8 (come conseguenza dell'evaporazione della CO<sub>2</sub>);
- misura della torbidità dell'albume tramite turbidimetro o spettrofotometro. La coagulazione causata principalmente dalla denaturazione delle proteine a temperature di circa 60-65°C è la causa principale dell'aumento della torbidità dell'albume.

Il tuorlo è un'emulsione in acqua e di lipidi legati a proteine, è racchiuso in una membrana (membrana vitellina) costituita da due strati separati: quello interno viene depositato a livello dell'ovario, mentre quello esterno è prodotto dall'ovidotto. Il tuorlo appare formato da strati concentrici di vitello bianco e vitello giallo: il vitello giallo è ricco di lipidi, pigmenti e proteine, mentre nel bianco predomina la componente proteica. Il vitello bianco occupa la parte centrale del tuorlo formando una specie di imbuto (latebra) che si protende verso la periferia del tuorlo e su cui poggia il disco germinativo (Cabras & Martelli, 2004).

Il tuorlo è formato per il 48% di acqua e il 52% di solidi costituiti quasi esclusivamente da lipidi associati a proteine (lipoproteine). Considerando solo la sua sostanza secca, i granuli sono costituiti per il 34% da lipidi, 60% da proteine e 6% da ceneri.

I lipidi del tuorlo sono legati a proteine per formare le lipoproteine nel rapporto 2/1 e rappresentano il 33-35% del peso del tuorlo. I trigliceridi sono i principali lipidi del tuorlo (65%), seguiti dalla frazione fosfolipidica (31%), costituita essenzialmente da fosfatidilcolina e da fosfatidiletanolamina e dal colesterolo (4%) (Cabras & Martelli, 2004).

Dal momento della deposizione la concentrazione in solidi totali diminuisce come conseguenza di una migrazione di acqua dall'albume al tuorlo attraverso la membrana (Bellairs et al., 1963).

Metodi di misura della qualità del tuorlo:

- valutazione della freschezza mediante determinazione dell'indice del tuorlo (rapporto tra altezza e diametro del tuorlo);
- valutazione del colore tramite colorimetro;
- valutazione della pigmentazione mediante confronto visivo con la “scala Roche”;
- misura della resistenza della membrana vitellina durante la conservazione tramite test a puntura.

Obiettivo di questo lavoro è stato valutare l'impatto di un trattamento termico ad aria calda sulla qualità dell'uovo, considerando differenti parametri qualitativi appartenenti ai diversi componenti dell'uovo. In relazione al parametro qualitativo misurato, le valutazioni sono state condotte prima, immediatamente dopo il trattamento e dopo una conservazione di 28 giorni alla temperatura di 25°C.

Il ciclo termico utilizzato per il trattamento delle uova è il T8, caratterizzato da 2 shots di aria calda (350° C in prossimità delle'uovo) e fredda della durata di 8 secondi separati da 30 secondi di sola aria fredda alla velocità di 15 ms<sup>-1</sup>.

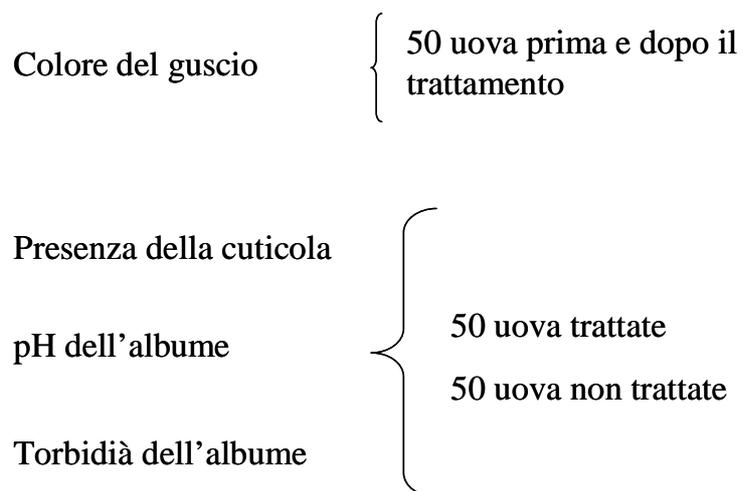
Ricordiamo che il medesimo trattamento è stato utilizzato per i test microbiologici effettuati su uova inoculate con differenti microrganismi e utili a valutare il potere decontaminante della tecnica (capitolo 6).

## Materiali e metodi

Per la sperimentazione sono state utilizzate 800 uova fresche provenienti da galline Hy-Line Brown.

Tutte le uova sono state pesate e misurate (diametro equatoriale e longitudinale) tramite un calibro digitale (CDJB15; Borletti, Italy).

*Immediatamente dopo il trattamento* sono stati valutati i seguenti parametri qualitativi: colore del guscio, presenza della cuticola, pH dell'albume e torbidità dell'albume seguendo lo schema mostrato in figura 5.1.



**Figura 5.1:** parametri qualitativi misurati prima e immediatamente dopo il trattamento con aria calda.

### *Colore del guscio*

Il colore del guscio è stato valutato prima e dopo il trattamento termico mediante colorimetro elettronico a riflessione Hunterlab (Konica Minolta Meter CR-400) mediando tre misure condotte sullo stesso punto del guscio. Le differenze complessive di colore ( $\Delta E^*$ ) tra le misure condotte prima e dopo il trattamento sono state inoltre calcolate come vettore somma:

$$\Delta E^* = \left( \Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2} \right)^{1/2} \quad (1)$$

dove  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  e  $\Delta b^*$  sono le differenze dei valori misurati  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , prima e dopo il trattamento.

### *Cuticola*

La presenza della cuticola, formata da una particolare proteina analoga al collagene, è stata determinata immergendo le uova in una soluzione colorante di tartrazina e green S (MTS Cuticole Blue). I campioni trattati e non, dopo un minuto di immersione e lavaggio con acqua distillata, sono stati stoccati per circa 15 minuti e successivamente analizzati sia visivamente che con colorimetro elettronico a riflessione (Konica Minolta Meter CR-400).

In presenza di cuticola la superficie delle uova si tinge di un colore verde intenso mentre in caso di assenza o danneggiamento della cuticola tale colorazione perde di intensità.

Le differenze di colore tra i campioni sono state valutate calcolando il  $\Delta E^*$  partendo dai valori colorimetrici  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  acquisiti in tre differenti punti della superficie del guscio e successivamente mediati.

### *pH dell'albume*

Il pH dell'albume è stato determinato mediando tre misure condotte su tre aliquote prelevate da ciascun uovo di ogni campione, trattato e non, dopo aver mischiato la sua porzione densa e liquida (CyberScan 510 pH -Eutech Instruments).

### *Torbidità dell'albumine*

Per ogni uovo, sono state riempite due cuvette (figura 5.2) da 4ml con l'albumine ed è stata misurata l'assorbanza (Ass) a 600nm tramite spettrofotometro (Spectrophotometer UV-1601, Shimadzu Corporazione, Japan). Per ogni cuvetta sono state acquisite tre misure.

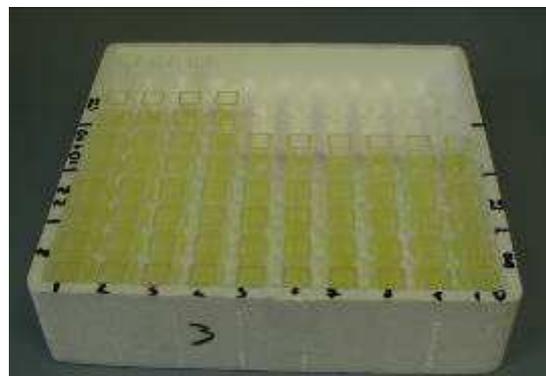
La torbidità di ogni campione è stata ottenuta, partendo dai valori di assorbanza, mediando i valori (6 per ogni campione) ottenuti tramite la seguente formula:

$$\tau_{alb}(\lambda) = -\frac{1}{l} \ln\left(\frac{T(\lambda)}{100}\right) \quad (2)$$

dove  $T$  è il valore della trasmittanza ( $Ass = -\log T$ ),  $l$  è la lunghezza della provetta e

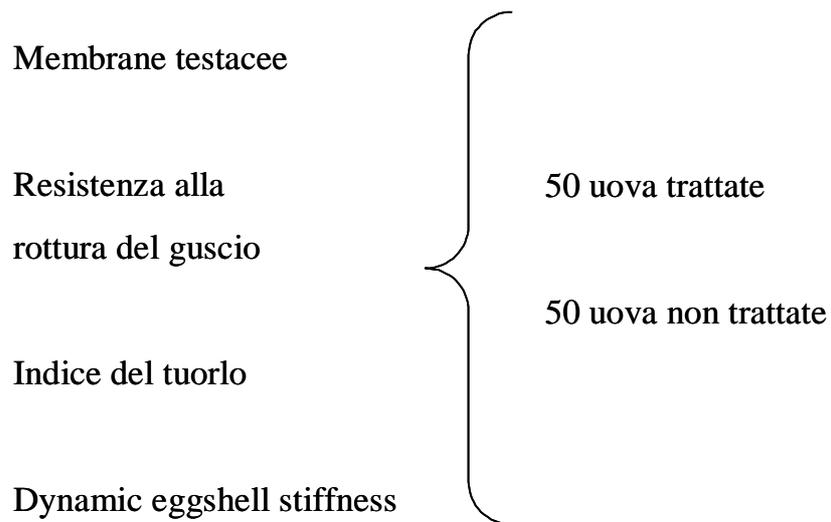
$\tau_{alb}$  la torbidità dell'albumine.

L'aumento della torbidità dell'albumine è direttamente correlato con l'incremento dell'assorbanza e il decremento dell'opalescenza dell'albumine



**Figura 5.2:** cuvette da 4 ml riempite di albumine utilizzate per la determinazione della torbidità tramite spettrofotometro a 600nm.

*Durante o dopo 28 giorni di conservazione a 25°C seguendo lo schema mostrato in figura 5.3, sono stati valutati i seguenti indici qualitativi: danneggiamento alle membrane testacee, resistenza alla rottura del guscio, indice del tuorlo e presenza di microfratture nel guscio tramite la determinazione della *dynamic eggshell stiffness*.*



**Figura 5.3:** parametri qualitativi misurati durante e dopo una conservazione di 28 giorni.

### *Membrane testacee (calo peso)*

Tramite la misura del calo peso percentuale delle uova a 7, 14, 21 e 28 giorni di conservazione a 25°C è stato valutato il possibile danneggiamento delle membrane testacee derivante dal trattamento con aria calda. Queste ultime sono strutture fibrose, del tipo collagene, collocate all'interno del guscio.

### *Resistenza del guscio alla rottura*

La valutazione della resistenza alla rottura del guscio è stata condotta misurando la forza necessaria (N) per rompere il guscio mediante una pressa specifica provvista di cella di carico da 50N e display digitale (Egg Shell Force Gauge Model-II, Robotmation Co.Ltd., Tokyo, Japan; figura 5.4)



**Figura 5.4:** pressa per la misura della resistenza del guscio (Egg shell Force Gauge Model II, Robomation C., Ltd).

### *Indice del tuorlo*

L'indice del tuorlo è stato valutato senza separarlo dall'albume in accordo con Funk (1948) determinando il rapporto tra altezza e diametro del tuorlo. Tale parametro cresce con il diminuire della qualità dell'uovo e riflette la forma sferica del tuorlo.

### *Presenza di micro-cracks (Dynamic eggshell stiffness)*

De Ketelaere et al. (2000) hanno proposto un metodo per individuare eventuali fratture nel guscio tramite l'analisi della frequenza di risonanza delle uova a determinate frequenze. Uova con guscio integro rispondono in modo uguale, in termini di frequenza di risonanza, in un determinato pattern di lunghezze d'onda. Con tali criteri gli autori hanno messo a punto uno strumento (Acoustic egg tester) in grado di determinare l'integrità di un uovo con una precisione del 90% .

Nel presente lavoro per misurare la frequenza di risonanza e successivamente calcolare la Dynamic eggshell stiffness ( $k_{dyn}$ ), è stato utilizzato un Acoustic Egg Tester RFS<sub>20</sub> (figura 5.5).

Il dispositivo è costituito da due rulli in gomma che permettono all'uovo di girare lungo il proprio asse longitudinale, da un piccolo martello che induce vibrazioni a determinate lunghezze d'onda, in punti equidistanti attorno alla zona equatoriale dell'uovo e da un piccolo microfono (MONACOR, Type 2005) che capta il segnale di risposta dell'uovo alla sollecitazione meccanica. Tramite una scheda di acquisizione NI-DAQ PCI 6023-E (National Instrument) da 50khz il segnale viene digitalizzato e successivamente elaborato grazie ad un programma generato con Labview 5.1 (National Instrument); in particolare il programma determina la frequenza di risonanza principale (RF) del campione.

Tramite la seguente formula è stato calcolato il valore della Dynamic eggshell stiffness ( $\text{Hz}^2\text{g}$ ) correlabile alla presenza di micro-cracks.

$$k_{dyn} = RF^2m \quad (3)$$

dove  $m$  è la massa dell'uovo in grammi e  $RF$  la frequenza di risonanza (Hz)



**Figura 5.5:** acoustic egg tester RFS<sub>20</sub>.

### *Analisi dei dati*

Tramite analisi della varianza (ANOVA) con confronto LSD (Least Significant Difference), per ogni indice qualitativo, sono state determinate le possibili differenze significative esistenti tra i valori medi misurati sul campione trattato e non trattato. Per il colore del guscio, le differenze significative sono state individuate tra i valori misurati prima e immediatamente dopo il trattamento.

## Risultati e discussione

In tabella 5.1 sono riportate le medie e le deviazioni standard dei parametri dimensionali (massa, diametro longitudinale e diametro equatoriale) del campione trattato con aria calda (trattamento T8) e del campione controllo. Dall'analisi della varianza, per tali parametri, non sono emerse differenze significative tra i due campioni.

In tabella 5.2 sono riportate le medie e le deviazioni standard dei parametri qualitativi valutati subito dopo il trattamento sul campione trattato e sul campione non trattato. Dall'analisi della varianza, per tali parametri, non sono emerse differenze significative tra i due campioni.

Ricordiamo che, per la valutazioni del colore del guscio e dell'integrità della cuticola è stato preso in considerazione l'indice  $\Delta E^*$  calcolato sulle medie dei parametri  $a^*$ ,  $b^*$  e  $L^*$  misurati sul campione trattato e sul campione di controllo. Il risultato relativo al colore del guscio ( $\Delta E^*= 0.65$ ) indica che i cambiamenti di colore sono impercettibili, mentre il risultato relativo alla cuticola ( $\Delta E^*=1.77$ ) indica che le differenze di colore tra campione trattato e campione controllo sono impercettibili/minime. Quindi è possibile affermare che il trattamento non provoca alterazioni nel colore del guscio e nell'integrità della cuticola.

In tabella 5.3 è riportata la classificazione visiva delle uova trattate con cuticle-blu (esempio in figura 5.6). Le uova sono state divise in tre classi in base all'intensità del colore verde presente sull'uovo: colore intenso, colore random e non colorate.

Anche tramite la valutazione visiva, per quanto riguarda la presenza della cuticola, è possibile affermare che non ci sono differenze significative tra uova trattate e uova non trattate.

	Massa (g)	Diametro equatoriale (mm)	Diametro longitudinale (mm)
Campione trattato	61.68 <sup>a</sup> 5.10	43.88 <sup>a</sup> 1.41	56.89 <sup>a</sup> 1.91
Campione controllo	62.58 <sup>a</sup> 4.03	44.32 <sup>a</sup> 1.26	56.85 <sup>a</sup> 1.68

Nota. La stessa lettera in minuscolo lungo la colonna, indica che non vi sono differenze significative tra le medie dei due campioni ( $p$ -level<0.05; LSD test).

**Tabella 5.1:** Medie e deviazioni standard dei parametri dimensionali misurati sul campione trattato con aria calda e sul campione di controllo.

	Campione trattato	Campione controllo
pH	8.96 <sup>a</sup> 0.20	8.98 <sup>a</sup> 0.30
Torbidità [/m]	41.61 <sup>a</sup> 7.30	43.45 <sup>a</sup> 7.40
Colore del guscio		
<i>L</i> *	62.85 <sup>a</sup> 2.79	63.01 <sup>a</sup> 2.80
<i>a</i> *	16.45 <sup>a</sup> 1.66	15.84 <sup>a</sup> 1.55
<i>b</i> *	30.02 <sup>a</sup> 2.19	29.87 <sup>a</sup> 2.13
$\Delta E^*_{ab}$	0.65	
Cuticola		
<i>L</i> *	52.70 <sup>a</sup> 4.69	51.81 <sup>a</sup> 3.99
<i>a</i> *	-11.46 <sup>a</sup> 7.73	-10.00 <sup>a</sup> 10.21
<i>b</i> *	29.67 <sup>a</sup> 2.01	29.24 <sup>a</sup> 1.82
$\Delta E^*_{ab}$	1.77	

Nota. La stessa lettera in minuscolo lungo la riga, indica che non vi sono differenze significative tra le medie dei due campioni ( $p$ -level<0.05; LSD test).

**Tabella 5.2:** Medie e deviazioni standard dei parametri qualitativi misurati subito dopo il trattamento sul campione trattato e sul campione controllo.

	Campione trattato	Campione controllo
Colore inteso	82	88
Colore random	14	8
Non colorate	4	4

**Tabella 5.3:** classificazione delle uova in base alla valutazione visiva dopo analisi con cuticle-blu.



**Figura 5.6:** esempio di uova trattate con Cuticle-blu per l'analisi sull'integrità della cuticola.

In tabella 5.4 sono riportate le medie e le deviazioni standard dei parametri forza massima di rottura del guscio (N), indice del tuorlo, frequenza di risonanza RS ( $\text{Hz}^2$ ) e dynamic eggshell stiffness ( $\text{Hz}^2 \text{ g}$ ) per il campione trattato e per il campione controllo, conservati per 28 giorni a  $25^\circ\text{C}$ . Dall'analisi di tali dati non risultano esserci differenze significative tra campione trattato e controllo, ciò afferma che durante il trattamento non si sono formate micro rotture nel guscio.

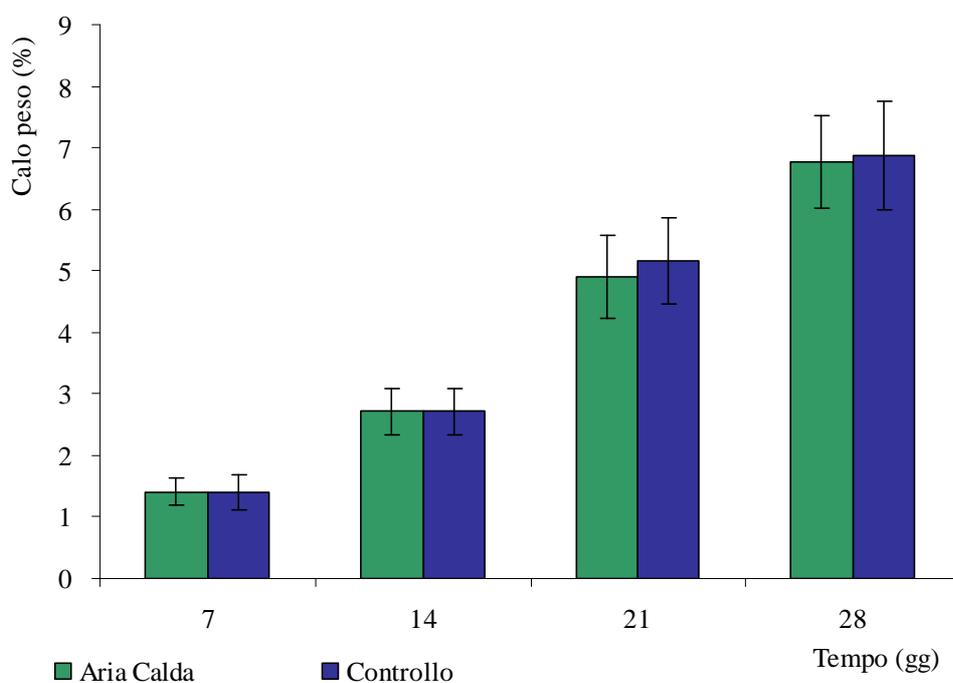
In figura 5.7 viene riportato il calo peso percentuale e relative deviazioni standard, determinato a 7, 14, 21 e 28 giorni di conservazione a  $25^\circ\text{C}$  sulle uova appartenenti al campione trattato e al campione controllo.

E' possibile evidenziare che non ci sono differenze significative tra campione trattato e campione controllo a dimostrazione del fatto che il trattamento termico non ha apportato modifiche alle membrane testacee.

	<b>Campione trattato</b>	<b>Campione controllo</b>
Forza di rottura (N)	39.56 <sup>a</sup> 5.79	38.71 <sup>a</sup> 5.82
Indice del tuorlo	0.17 <sup>a</sup> 0.03	0.16 <sup>a</sup> 0.03
RS (Hz <sup>2</sup> )	5139.53 <sup>a</sup> 329.85	5166.44 <sup>a</sup> 312.65
K <sub>dyn</sub> (Hz <sup>2</sup> g)	1.70E+9 <sup>a</sup> 2.12E+08	1.73E+9 <sup>a</sup> 2.11E+08

Nota. La stessa lettera in minuscolo lungo la riga, indica che non vi sono differenze significative tra le medie dei due campioni ( $p\text{-level}<0.05$ ; LSD test).

**Tabella 5.4:** medie e deviazioni standard dei parametri qualitativi misurati dopo 28 giorni di conservazione a 25°C sul campione trattato e sul campione controllo.



**Figura 5.7:** calo peso percentuale in relazione ai giorni di conservazione per il campione trattato con aria calda e per il campione controllo.

## Bibliografia

Bellairs, R., Harkness, M. & Harkness, R. D. (1963) The vitelline membrane of the hen's egg: achemical and electron microscopical study. *Journal of Ultrastructure Research*. 8, 339.

Burley, R. W., & Vadehra, D. V. (1989) *The Albumen: chemistry, The Avian Egg. Chemistry and Biology*, Wiley, New York.

Caras, P., & Martelli, A. (2004) *Chimica degli alimenti*, Piccin-Nuova Libreria, Padova, Italy.

De Ketelaere B.; Coucke P.; De Baerdemaeker J. (2000) Eggshell Crack Detection based on Acoustic Resonance Frequency Analysis. *Journal of Agricultural an Engineering research*. 76, 157-163

\* Fabbri A., Cevoli C., Pasquali F., Manfreda G. (2009) Hot Air Technique for the Decontamination of Table Eggs Surface. CIOSTA XXXIII :“*Technology and management to ensure sustainable agriculture, agro-systems, forestry and safety*”. Reggio Calabria giugno 2009.

Haugh, R. R. (1937) A new method for determining the quality of an egg, *U.S. Egg Poultry*. 39, 27-49.

Li-Chan, E., & Nakai, S. (1989) Biochemical basis for the properties of egg white, *Poultry Biology*, 2, 21-50.

\* Pasquali F., Fabbri A., Cevoli C., Manfreda G., Franchini A. (2010) Hot Air Treatment for Surface Decontamination of Table Eggs. *Food Control* , 21, 431-435.

Romanoff, A. L., & Romanoff, A. J. (1949). *The avian egg*. New York: John Wiley and Sons, Inc.

Rossi, M., Pompei, C., & Dal Corno, P. (1999) Use of new freshness indices to study the quality of eggs from the Italian market. *Proc. 8th European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products* 431-437. Milan, Italy: Associazione Italiana di Avicoltura Scientifica.

Solomon, S.E. (1991) *Egg and Eggshell Quality*. Ames, The Veterinary Press Iowa State University Press.

\* *L'articolo è diretta espressione dell'attività di ricerca illustrata nel precedente capitolo.*

## CAPITOLO 6

# VALUTAZIONE DEL POTERE DECONTAMINANTE DEL TRATTAMENTO AD ARIA CALDA IN REGIME DI CONVEZIONE FORZATA: PROVE MICROBIOLOGICHE

### Introduzione

In letteratura è presente un modesto numero di studi sul potere decontaminante della pastorizzazione ad aria calda sulle uova. Hou et al. (1996) hanno osservato una riduzione di 5 log<sub>10</sub> della carica microbica di *Salmonella* Enteritidis nel tuorlo di uova trattate in forno con aria calda a 55°C per 180 min. James et al. (2002) hanno verificato l'applicabilità di un trattamento a flusso di aria calda sulla superficie dell' uovo. Gli autori hanno determinato la temperatura interna ed esterna del guscio, hanno identificato un ciclo termico ideale in termini di massima temperatura raggiungibile sulla superficie dell'uovo correlata all'assenza di fenomeni di coagulazione dell'albume, ma non hanno valutato l'effetto decontaminante tramite test microbiologici.

Per quanto concerne i trattamenti termici ad acqua calda per la pastorizzazione delle uova in guscio, a livello microbiologico, sono stati pubblicati numerosi studi, anche se, questa tecnica, può provocare microfratture sul guscio ed aumentare così il rischio di penetrazione dei patogeni (Himathongkham et al.1999). Trattamenti a 55-60°C richiedono tempi lunghi, per ottenere una riduzione di 3 log<sub>10</sub> di *Salmonella* Enteritidis su uova inoculate sperimentalmente sono necessari 25 minuti (Hou et al. 1996). Per ottenere una riduzione totale della carica microbica di *Salmonella* Enteritidis sono necessari 50-57 minuti a 58°C (Schuman et al. 1997). Questa tipologia di trattamento, per una possibile applicazione industriale in linea, richiede tempi di trattamento troppo lunghi e, talvolta, associati ad una riduzione del livello qualitativo dell'albume (Schuman et al., 1997).

Nel presente studio è stato valutato il potere decontaminante di un trattamento termico ad aria calda su uova in guscio sperimentalmente infettati con *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Le valutazioni sono state condotte a 0, 1, 2, 3, 8, 10, 15, 21, 24, 28 giorni di conservazione alla temperatura di 25°C.

Il ciclo termico utilizzato per il trattamento delle uova è il T8, caratterizzato da 2 shots di aria calda (350° C in prossimità delle'uovo) e fredda della durata di 8 secondi separati da 30 secondi di sola aria fredda alla velocità di 15 ms<sup>-1</sup>.

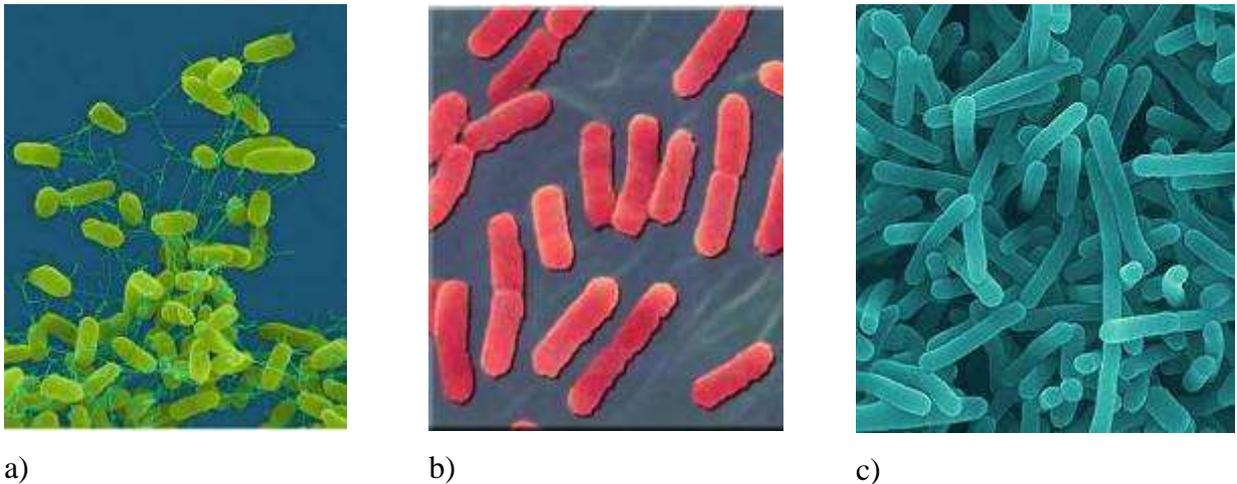
Le prove microbiologiche sono state effettuate in collaborazione con il CRIPS (Centro di Ricerca Interdipartimentale sulle Tecnologie e l'Igiene degli Allevamenti Intensivi delle Piccole Specie – DISA/UniBO) ed in particolare con il dott. Gerardo Manfreda e la dott.sa Frederique Pasquali.

Ricordiamo che il medesimo trattamento è stato utilizzato anche per i test qualitativi (capitolo 5).

## Materiali e metodi

### *Culture batteriche*

Per l'inoculo sperimentale sono state selezionate le seguenti colture batteriche: *Salmonella* Enteritidis (MB2509) ceppo resistente alla streptomucina, *Escherichia coli* ATCC 25922 indotto a resistenza all'acido nalidixico (E. coli mut 10) e *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 (figura 6.1).



**Figura 6.1:** Immagini al microscopio elettronico della *Salmonella* Enteritidis (a) , dell'*Escherichia coli* (b) e della *Listeria monocytogenes* (c) (Copyright Dennis Kunkel Microscopy, Inc).

### *Preparazione dell'inoculo*

Le cellule di *Salmonella* Enteritidis o *Escherichia coli*, conservate in Protect Beads a  $-80^{\circ}\text{C}$ , sono state riattivate attraverso inoculo a  $37^{\circ}\text{C}$  in Brain Heart Infusion (BHI; Oxoid, Milan, Italy) contenente 25 ppm di streptomicina o 20 ppm di acido nalidixico. Queste colture sono state piastrate in Brain Heart Infusion Agar contenente 25 ppm di streptomicina o 20 ppm di acido nalidixico e incubate per una notte a  $37^{\circ}\text{C}$ . Successivamente, per una notte, è stata coltivata una colonia in 9 ml di BHI integrato con 25 ppm di streptomicina o 20 ppm di acido nalidixico a  $37^{\circ}\text{C}$ . Aliquote delle colture coltivate (inoculo 0.1%) sono state trasferite in 150 ml di BHI contenente 25 ppm di streptomicina o 20 ppm di acido nalidixico ed

inoculate a 37°C per 24 in lieve agitazione. Due aliquote (50 ml), per ogni coltura risultante, sono state centrifugate a 3000 giri per 10 minuti. Gli agglomerati di cellule sono stati risospesi in soluzione salina sterile fisiologica a 22-25°C e agitati tramite un vortex per circa 10 secondi.

La sospensione di *Salmonella* aveva una densità ottica di 0.4 a 600nm (OD600) mentre la sospensione di E.coli di 0.5. Le cellule vitali presenti nelle sospensioni sono state contate attraverso diluizioni seriali in soluzione salina fisiologica, piastrando 100 µl di ogni diluizione in Tryptone Soya Agar (TSA; Oxoid) e incubando per una notte a 37°C. La densità delle cellule era circa di 10<sup>8</sup> CFU/ml.

La stessa procedura è stata utilizzata per la *Listeria monocytogenes*, fatta eccezione per il brodo di arricchimento. Per arricchire la *Listeria*, invece del BHI, è stato utilizzato il Listeria Enrichment Broth Base (Oxoid) con l'aggiunta di Listeria Selective Enrichment Supplement (Oxoid). La sospensione di *Listeria monocytogenes* aveva una densità ottica pari a 0.9 misurata a 600 nm (OD600).

La selezione di ceppi ottimali per la contaminazione delle uova è stata effettuata confrontando il carico di due o tre ceppi, per specie batteriche, presente sulla superficie delle uova dopo la contaminazione con un inoculo contenente comparabili concentrazioni batteriche. E' stato scelto il ceppo con la carica più elevata e quindi con maggiore adesività. In particolare sono stati confrontati tre ceppi di *Escherichia coli* (E. coli 0157: H7, E. coli Mut 12 e E. coli Mut 10) e due ceppi di *Listeria monocytogenes* (ATCC ATCC 19111 e 13932).

#### *Inoculo delle uova in guscio*

Le uova utilizzate erano fresche e provenienti da galline Hy-Line Brown. In un primo periodo è stato studiato l'effetto decontaminante dell'aria calda su 350 uova sperimentalmente contaminate con *Salmonella* Enteritidis e su uova contenenti solamente la microflora indigena. Successivamente è stato studiato l'effetto decontaminante dell'aria calda su 350 uova contaminate sperimentalmente con *Escherichia coli* e *Listeria monoytogenes*.

Tutte le uova sono state lavate con acqua sterile deionizzata (22-25°C), successivamente spazzolate per rimuovere la cuticola e immerse in etanolo (70%, vol/vol) per 30 minuti per sanitizzarle, come descritto da Hammack et al. (1993). Prima di essere inoculate, le uova sanitizzate sono state disposte su griglie metalliche e asciugate in maniera asettica per circa 40 minuti a temperatura ambiente. Le uova asciutte e sanitizzate sono state immerse per circa 10 secondi nelle sospensioni batteriche descritte nel paragrafo precedente. Per farle asciugare completamente le uova contaminate sono state disposte su griglie metalliche per circa un'ora. La carica batterica sulle uova contaminate esternamente oscillava tra  $10^4$  e  $10^5$  CFU/g. Le uova sanitizzate, ma non contaminate sono state immerse in acqua sterile deionizzata a 22-25°C e utilizzate come controllo negativo.

#### *Stima della contaminazione nell'albume e nel guscio*

Il potere decontaminante dell'aria calda è stato valutato su uova inoculate sperimentalmente con differenti patogeni (*Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*) e su uova non inoculate, contenenti solamente la microflora indigena. La stima della carica batterica (guscio e albume) è stata effettuata a 0, 1, 2, 3, 8, 10, 15, 21, 24, 28 giorni dopo il trattamento (per la *Salmonella* Enteritidis l'accertamento a 24 e 28 giorni non è stato effettuato) su 10 uova trattate per giorno per la microflora patogena/indigena, su 5 uova non trattate per giorno per la microflora patogena/indigena (controllo positivo) e su 5 uova per giorno sanitizzate, non inoculate e non trattate (controllo negativo). Le uova sono state conservate a 20-25°C. La stima della contaminazione del guscio è stata effettuata a temperatura ambiente aggiungendo 10 ml di soluzione fisiologica salina al guscio all'interno di una busta di plastica. Il guscio è stato sfregato per circa un minuto all'interno della busta.

La contaminazione dell'albume è stata quantificata dopo aver omogeneizzato l'albume per 30 secondi a velocità normale con un *stomacher device* (Laboratory

Blender Stomacher 400, Seward, Milan, Italy). La conta dei batteri è stata effettuata piastrando 100 µl di diluente utilizzato per trattenere i batteri del guscio o 100 µl of albume omogeneizzato in Brilliant Green Agar (Oxoid, code CM0263) per la conta della *Salmonella*, McConkey agar (Oxoid) per la conta dell' *Escherichia.*, Listeria selective agar Base (Oxoid) con aggiunto Listeria selective supplement (Oxoid) per la conta della *Listeria* e Standard Plate Count Agar (Oxoid) per la conta della microflora indigena. Nel caso di 0–4 colonie , è stato assegnato il valore di 0 CFU. Questo valore corrisponde a una carica batterica inferiore al limite di rilevamento di  $10^2$  CFU/guscio e 10CFU/ml di albume.

## Risultati e discussione

### *Salmonella* Enteritidis

Per tutto il periodo di conservazione, i valori della carica microbica complessiva di *Salmonella* Enteritidis presente sulle uova trattate sono risultati essere più bassi rispetto ai valori relativi alle uova non trattate (figura 6.2). In termini di  $\log_{10}$  UFC di *Salmonella* Enteritidis, i valori medi riscontrati sui gusci, durante i diversi giorni di conservazione, variano da 0.1 a 1.9.

I valori relativi alla carica di *Salmonella* Enteritidis presente sulle uova trattate sono risultati essere più bassi rispetto ai valori del controllo positivo. In particolare la riduzione logaritmica oscilla tra 0.6 del giorno 0 e 1.9 del giorno 10. La riduzione di un ciclo logaritmico è un risultato importante e corrisponde ad una riduzione della popolazione batterica del 90%. Questo risultato è ancora più importante se si considera che, al massimo, su uova in guscio, sono stati rilevati valori di carica di *Salmonella* dell'ordine di  $10^2$  -  $10^3$  UFC; solo in rari casi le uova contaminate provenivano da allevamenti tradizionali in gabbia (Humphery et al., 1991; Humphery et al., 1994). Quindi la riduzione di un ciclo logaritmico potrebbe essere sufficiente per diminuire significativamente il rischio di tossinfezioni alimentari da *Salmonella*. E' stata osservata una riduzione della carica di *Salmonella* Enteritidis dall'ottavo al ventiquattresimo giorno sulle uova non trattate, ma non sulle uova trattate. L'incremento di *Salmonella* Enteritidis sulle uova trattate negli ultimi giorni di conservazione, potrebbe essere dovuto al rinvenire di cellule termoresistenti, non provenienti dall'inoculo, che hanno trovato le condizioni ottimali di crescita a temperatura ambiente.

Il metodo ad aria calda ha riportato un basso tempo di riduzione decimale a 350°C (6.7 secondi) rispetto ad altre tecniche (D50°C=16.5 min, D57.5°C= 0.7 min, Muriana et al., 1996; D55°C=7.04 min, D57°C= 3.39 min, D60°C= 0.63 min Alvarez et al., 2006) a dimostrazione della promettente applicabilità della tecnica nel settore del packaging che necessita di tempi brevi di trattamento.

### *Escherichia coli*

Complessivamente l'andamento della carica batterica di *Escherichia coli* sulle uova trattate e non trattate è eterogeneo (figura 6.3). In particolare, con una riduzione media di 0.3 log, solamente al giorno 0, 1, 8, e 21, i valori della carica batterica delle uova trattate sono risultati essere più bassi rispetto a quelli delle uova non trattate. Tuttavia è presente, su entrambi i campioni di uova, un andamento caratteristico della riduzione della carica di *Escherichia coli* confermato anche da elevati valori di  $R^2$  (0.86: trattate, 0.8: non trattate). I bassi livelli di contaminazione di *Escherichia coli* rilevati al giorno 10, 15 e 21 ci suggeriscono che il batterio possa essere penetrato all'interno dell'uovo attraverso il guscio e la membrana vitellina oppure che il brodo di inoculo possa essere sgocciolato dalla superficie dell'uovo. Per verificare questa ipotesi, il ventiquattresimo giorno è stata determinata la contaminazione dell'albume. Tutti gli albumi di entrambi i campioni hanno riportato dei valori di carica batterica di *Escherichia coli* sotto i limiti di rilevamento, rafforzando l'ipotesi che parte del brodo di inoculo possa essere sgocciolato dalla superficie dell'uovo. Tale considerazione è in accordo con i risultati di alcuni studi sulle tecniche di isolamento dell'*Escherichia coli* in uova in guscio (EFSA, 2007).

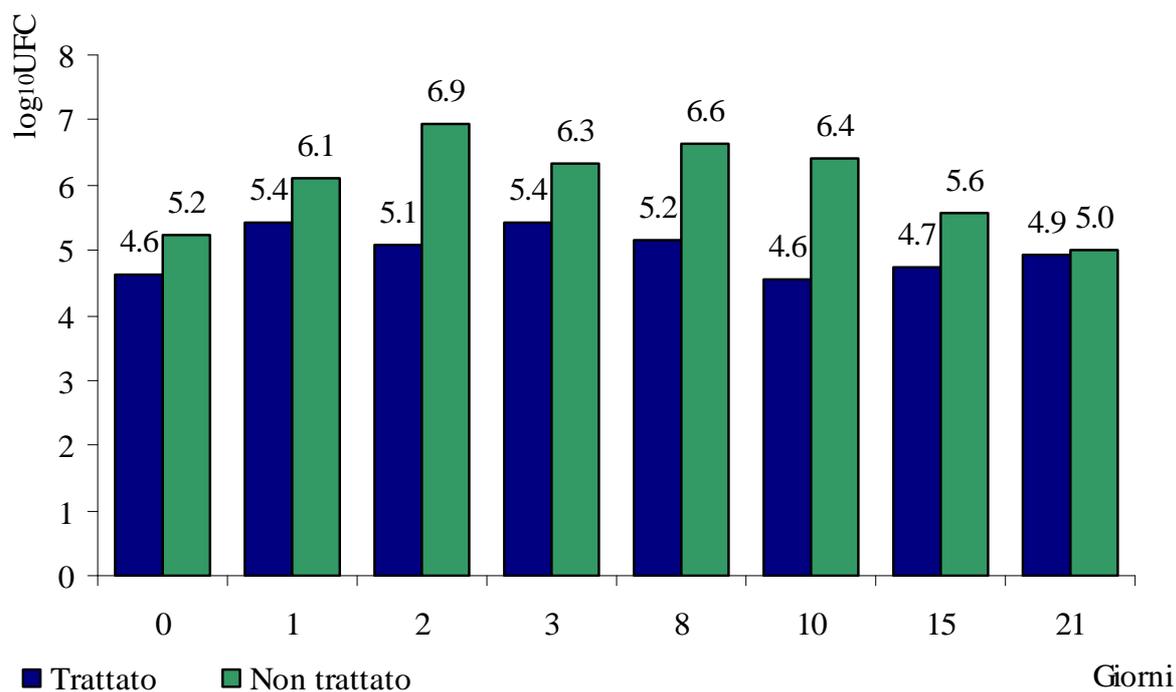
### *Listeria monocytogenes*

Il potere decontaminante dell'aria calda sulle uova inoculate con *Listeria monocytogenes* immediatamente dopo il trattamento è risultato essere molto alto (riduzione media logaritmica di 1.2 al giorno 0) (figura 6.4). L'andamento della riduzione batterica durante i 28 giorni di conservazione è lineare ed è confermato dagli elevati valori di  $R^2$  (0.93:trattate; 0.89: non trattate). In particolare, come per l'*Escherichia coli*, si è manifestata una riduzione naturale di *Listeria monocytogenes* durante gli ultimi giorni di conservazione in entrambi i campioni di uova. I bassi livelli di contaminazione di *Listeria monocytogenes* rilevati il giorno 21 ci suggeriscono che il batterio possa essere penetrato all'interno dell'uovo attraverso il guscio e la membrana vitellina oppure, una parte del brodo di inoculo possa essere sgocciolato dalla superficie dell'uovo. Per verificare questa ipotesi, è stata determinata la contaminazione dell'albume il ventiquattresimo giorno. Tutti gli albumi di entrambi i campioni hanno riportato dei valori di carica batterica di *Listeria monocytogenes* sotto i limiti di rilevamento rafforzando l'ipotesi che parte del brodo di inoculo possa essere sgocciolato dalla superficie dell'uovo. Tale considerazione è in accordo con i risultati di alcuni studi sulle tecniche di isolamento della *Listeria monocytogenes* nell'uovo (EFSA, 2007). I nostri dati suggeriscono che, in caso di naturale contaminazione delle uova da *Listeria monocytogenes*, il trattamento ad aria calda potrebbe ridurre di circa il 90% la popolazione batterica immediatamente dopo l'infezione.

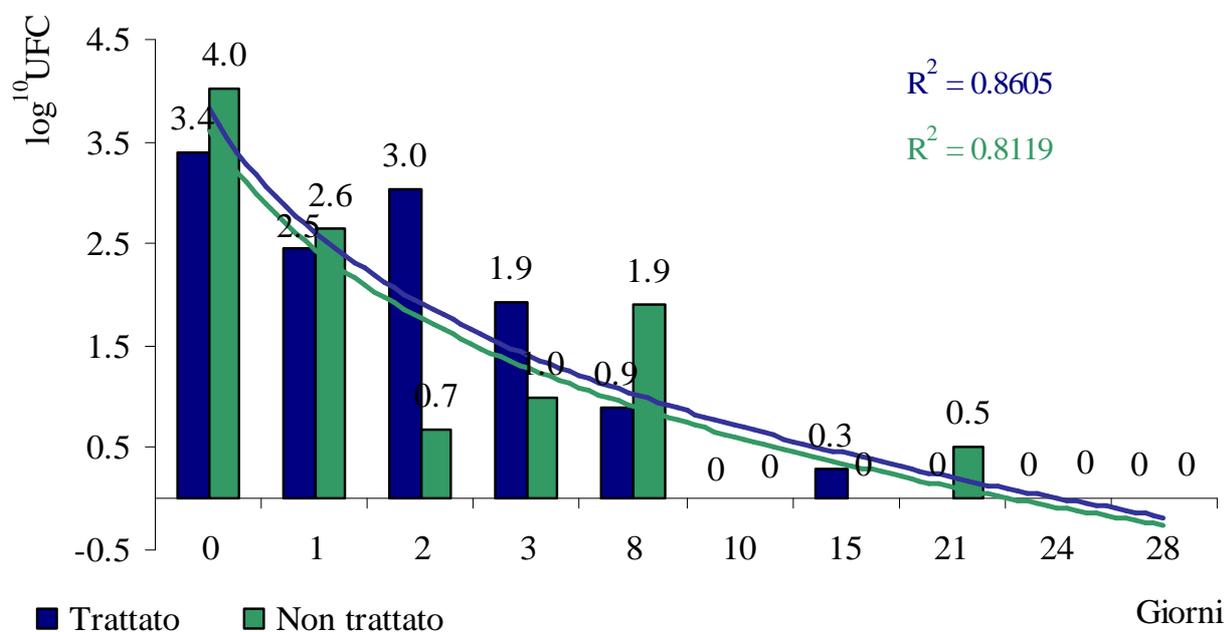
### *Microflora indigena*

I valori relativi alla microflora indigena presente sulle uova trattate e non trattate risultano essere minori rispetto al limite di rilevamento di  $10^2$ , ad eccezione dei valori relativi al secondo giorno di conservazione (figura 6.5).

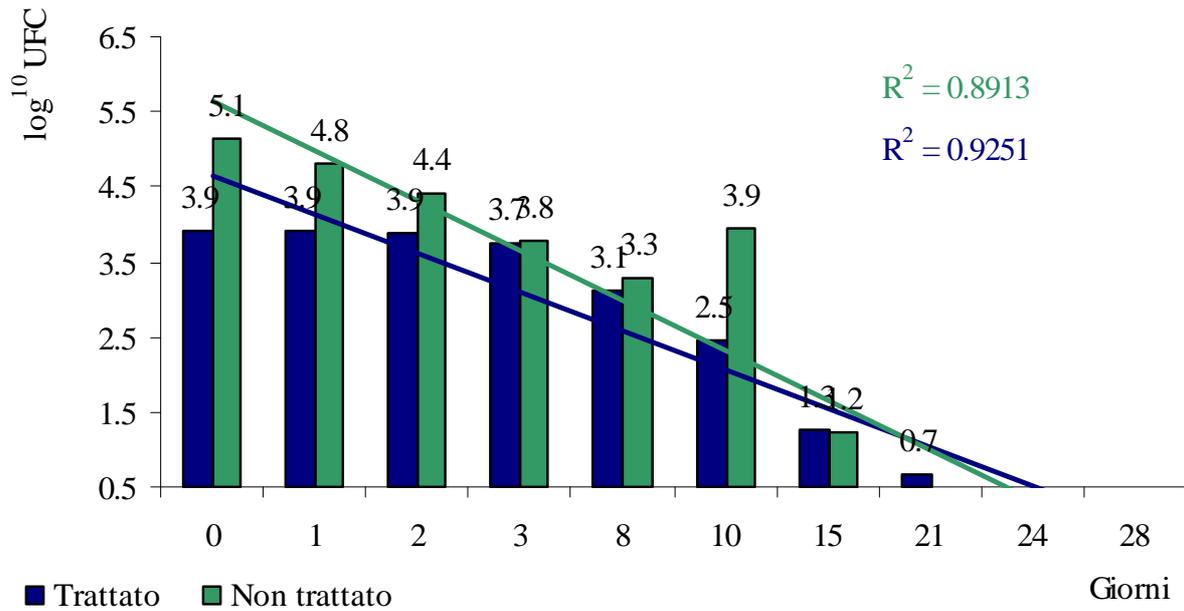
Fatta eccezione per il giorno 2, il basso valore della microflora indigena presente sulle uova non trattate, non consente alcuna valutazione sulla potere di decontaminazione del trattamento di aria calda.



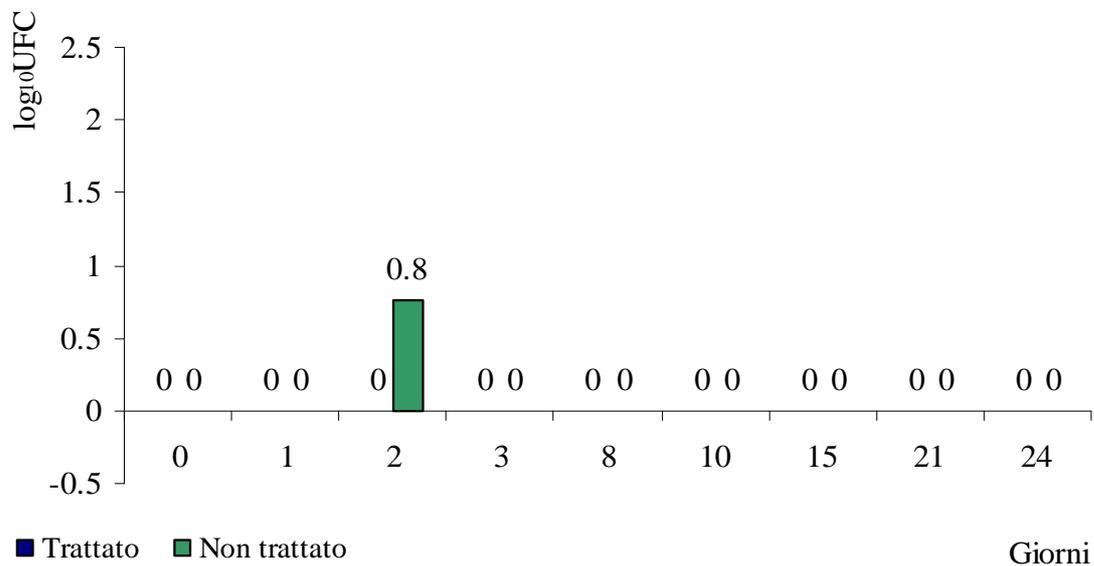
**Figura 6.2:** confronto tra carica microbica di *Salmonella* Enteritidis (log<sub>10</sub> UFC) presente su uova trattate e non trattate, durante 21 giorni di conservazione post-trattamento.



**Figure 6.3:** confronto tra carica microbica di *Escherichia coli* (log<sub>10</sub> UFC) presente su uova trattate con aria calda e uova non trattate, durante 21 giorni di conservazione post-trattamento.



**Figure 6.4:** confronto tra carica microbica di *Listeria monocytogenes* (log<sub>10</sub> UFC) presente su uova trattate con aria calda e uova non trattate, durante 21 giorni di conservazione post-trattamento.



**Figure 6.5:** confronto tra carica microbica indigena (log<sub>10</sub> UFC) presente su uova trattate con aria calda e uova non trattate, durante 21 giorni di conservazione post-trattamento.

## Bibliografia

European Food Safety Authority. (2007). Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of Salmonella in holdings of laying hen flocks of Gallus gallus. *The EFSA Journal*, 97

\* Fabbri A., Cevoli C., Pasquali F., Manfreda G. (2009) Hot Air Technique for the Decontamination of Table Eggs Surface. CIOSTA XXXIII :“*Technology and management to ensure sustainable agriculture, agro-systems, forestry and safety*”. Reggio Calabria giugno 2009

Hammack, T.S., Sherrod, P.S., Bruce, V.R., June, G.A. Satchel, F.B., & Andrews, W.H. (1993). Growth of Salmonella Enteritidis in grade A eggs during prolonged storage. *Poultry Science*. 72, 373-377

Hou, H., Singh R.K., Muriana, P.M. & Stadelman W.J. (1996). Pasteurization of intact shell eggs. *Food Microbiology*. 13, 93–101.

Humphrey, T.J. (1994) Contamination of eggs with potential human pathogens, In R.G. Board and R. Fuller (ed.), *Microbiology of the avian egg*. Chapman and Hall, New York. 93-116.

Humphrey, T.J. (1999) Contamination of eggs and poultry meat with Salmonella enterica serovar Enteritidis. In A.M. Saeed, R.K.Gast, M.E. Potter, and P.G. Wall (ed.), *Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals: epidemiology, pathogenesis, and control*, Iowa State University Press, Ames.183-192

James, C., Lechevalier, V., & Ketteringham, L. (2002). Surface pasteurisation of shell eggs. *Journal of Food Engineering*. 53, 193–197.

\* Pasquali F., Fabbri A., Cevoli C., Manfreda G., Franchini A. (2010) Hot Air Treatment for Surface Decontamination of Table Eggs. *Food Control* , 21, 431-435.

Schuman, J.D., Sheldon, B.W., Vandepopuliere, J.M., & Ball, H.R. (1997) Immersion heat treatments for inactivation of *Salmonella enteritidis* with intact eggs. *Journal of Applied Microbiology*.83, 438–44

\* L'articolo è diretta espressione dell'attività di ricerca illustrata nel precedente capitolo.

# CAPITOLO 7

## TRATTAMENTO AD ARIA CALDA IN REGIME DI CONVEZIONE NATURALE PER LA DECONTAMINAZIONE SUPERFICIALE DELLE UOVA IN GUSCIO

### **Introduzione**

In letteratura è presente un modesto numero di studi sulle tecniche ad aria calda per la decontaminazione delle uova in guscio. In particolare sono due i metodi considerati: a convezione forzata e temperature di circa 350°C (Hou et al. 1996; Stadelman et al.1996) e convezione naturale e temperature di circa 55°C (James et al. 2002).

Gli studi riguardanti l'utilizzo di forni a convezione naturale per la pastorizzazione delle uova in guscio hanno messo in luce il potere decontaminante della tecnica sulla carica microbica presente nel tuorlo e nell'albume (Hou et al. 1996; Stadelman et al.1996), ma non su quella presente sul guscio. Gli autori hanno trattato le uova in forno a 55°C per 1, 2 e 3 ore riportando una riduzione della carica microbica presente nel tuorlo di circa 5 log<sub>10</sub> per il trattamento di 3 ore. Inoltre hanno valutato l'impatto del trattamento sulle proprietà qualitative dell'uovo, con particolare riferimento all'indice di Haugh, all'indice del tuorlo, al pH, alla viscosità, alla torbidità e al colore dell'albume e del tuorlo. Gli autori hanno concluso che solamente i valori di viscosità e torbidità dell'albume del campione trattato e del campione fresco erano significativamente differenti.

Stadelman et al. (1996) hanno inoltre valutato l'andamento della temperatura dell'interno dell'uovo concludendo che, solamente dopo un'ora di trattamento, il contenuto dell'uovo arrivava all'equilibrio termico con l'ambiente (55°C).

Il primo obiettivo del presente lavoro è stato quello di sviluppare e validare un modello numerico utile a studiare il trattamento ad aria calda a convezione naturale della superficie delle uova in guscio.

Il secondo obiettivo è stato quello di valutare l'impatto che il trattamento ad aria calda a convezione naturale (temperatura aria calda 55°C) ha sulla qualità dell'uovo e sulla inattivazione di *Salmonella Enteritidis* presente sul guscio.

## **Materiali e metodi**

I trattamenti considerati sono caratterizzati da una temperatura dell'aria calda di 55°C e da durata di 50, 100, 150 e 200 minuti. La scelta dei trattamenti è stata fatta in relazione a quanto riportato da Hou et al. (1996) sulle massime temperature di pastorizzazione che possono essere utilizzate senza incorrere in fenomeni di coagulazione dell'albume.

### *Modello numerico*

Le equazioni riguardanti il trasferimento del calore dentro l'uovo durante il trattamento ad aria calda in forno sono state risolte utilizzando Comsol Multiphysics 3.5 (COMSOL Inc., Burlington, MA, USA), un solutore commerciale di equazioni differenziali alle derivate parziali basato sulla tecnica degli elementi finiti. È stato scelto il risolutore UMFPACK, che è attualmente uno dei più collaudati per la risoluzione di sistemi asimmetrici lineari sparsi.

Inizialmente è stato costruito un modello 2D e, successivamente, con una semplice operazione, è stato costruito un modello 3D. La geometria dell'uovo è assialsimmetrica quindi, il modello 3D può essere facilmente generato tramite rivoluzione di 360 gradi della geometria 2D assialsimmetrica.

Il profilo geometrico dell'uovo è stato definito tramite la seguente equazione (Narushin, 1997):

$$y = \pm 1.5396 \frac{B}{L} \sqrt{L^{0.5} x^{1.5} - x^2} \quad (1)$$

dove  $L$  (m) è la lunghezza dell'uovo e  $B$  il diametro equatoriale (m).

All'interno del profilo dell'uovo sono stati inseriti anche il profilo circolare del tuorlo, caratterizzato da un raggio  $r$  (m) e il profilo interno del guscio ad una distanza di 0.003 m dal profilo esterno. I parametri  $L$  (0.058 m),  $B$  (0.044) ed  $r$  (0.015 m) sono stati determinati attraverso misure dirette effettuate su 30 uova provenienti da galline Hy-Line Brown utilizzando un calibro digitale (CDJB15; Borletti, Italy).

In figura 7.1 è riportata la geometria del modello 2D dove è possibile distinguere i diversi componenti dell'uovo: tuorlo, albume e guscio.

Per ottenere un accurato modello CFD bisogna descrivere nel modo più realistico possibile i materiali coinvolti, in questo lavoro è stato quindi necessario descrivere l'uovo tramite le sue reali proprietà termiche (conducibilità termica, calore specifico e diffusività termica). In tabella 7.1 sono riportati i valori delle proprietà termiche del guscio e dell'albume e del tuorlo inserite nel modello. I valori termici sono stati determinati sperimentalmente attraverso l'utilizzo della sonda KD2 (Decagon Device Inc.; Pullman, USA) documentato nel capitolo 2 con riferimento al lavoro di Fabbri et al. (2007).

#### *Equazioni di governo e condizioni al contorno*

Durante il trattamento in forno, l'uovo è investito da aria calda a circa 55°C e velocità pressoché nulla (convezione naturale)

Il trasferimento del calore è governato dall'equazione di conservazione dell'energia:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} \right) \quad (2)$$

dove  $D$  (diffusività termica;  $m^2 s^{-1}$ ) è differente per ogni costituente dell'uovo.

Le condizioni al contorno in questo caso interessano la superficie esterna ed interna del guscio e la superficie del tuorlo.

La temperatura iniziale è stata considerata uniforme in ogni punto della geometria ( $T=293\text{ K}$ ). Tra guscio e albume e tra tuorlo ed albume, è stata impostata una condizione di continuità (*continuity*), in questa zona non esiste resistenza termica nella diffusione del calore. Questa scelta permette di rimanere dalla parte del sicuro, in quanto l'albume raggiungerà probabilmente temperature inferiori a quelle calcolate.

La condizione al contorno impostata nell'interfaccia tra la superficie esterna del guscio e l'aria, invece, fa riferimento al fenomeno della convezione (*heat flux*):

$$\dot{q} = h(T_{\infty} - T) \quad (3)$$

essendo  $\dot{q}$  il flusso di calore totale ( $\text{W m}^{-2}$ ),  $h$  il coefficiente di convezione ( $\text{W m}^{-2}\text{K}^{-1}$ ) e  $T_{\infty}$  la temperatura esterna a grande distanza dall'uovo ( $55^{\circ}\text{C}$ ).

Il valore di  $h$  non è costante, ma dipende dalla geometria e dalle condizioni di flusso presenti nell'ambiente (convezione naturale o forzata, moto turbolento o laminare). In questo studio il coefficiente di convezione è relativo ad un fenomeno di convezione naturale, in quanto la velocità dell'aria calda che investe l'uovo è pressoché nulla.

Il valore di  $h$  è stato determinato tramite il numero di Nusselt:

$$\text{Nu} = \frac{hL}{K_{air}} \quad (4)$$

dove  $K_{air}$  è la conducibilità termica dell'aria ed  $L$  la lunghezza dell'uovo (m). In caso di convezione naturale  $Nu$  dipende solamente dal numero di Grashof ( $Gr$ ) dal numero di Prandtl ( $Pr$ ), dalla geometria e dalle condizioni al contorno. Detto ciò, se consideriamo la geometria dell'uovo molto simile ad una sfera, possiamo applicare la seguente espressione di  $Nu$  relativa ad flusso di aria con moto convettivo naturale che investe una sfera (Raithby & Terry 2000)

$$Nu = \left( (Nu_l)^6 + (Nu_t)^6 \right)^{1/6} \quad (5)$$

dove:

$$Nu_l = 2 + 0.878 \bar{C}_l Ra^{1/4} \quad (6)$$

$$Nu_t = \bar{C}_l Ra^{1/3} \quad (7)$$

$$\bar{C}_l = 0.671 / \left( 1 + (0.492 / Pr)^{9/16} \right)^{4/9} \quad (8)$$

$$Ra = Gr \cdot Pr \quad (9)$$

$$Gr = \frac{g \beta_{air} L^3 \rho_{air}^2 (\Delta T)}{\mu_{air}^2} \quad (10)$$

$$Pr = \frac{c_p \mu_{air}}{K_{air}} \quad (11)$$

$C_{p_{air}}$  calore specifico aria: 1005 (J K<sup>-1</sup>kg<sup>-1</sup>)

$\mu_{air}$  viscosità dinamica aria: 2E-5 (kg m<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)

$K_{air}$  conducibilità termica aria: 0.026 (W K<sup>-1</sup>m<sup>-1</sup>)

$\rho_{air}$  densità aria: 1.1 (kg m<sup>-3</sup>)

$g$  accelerazione di gravità: 9.8 (m s<sup>-2</sup>)

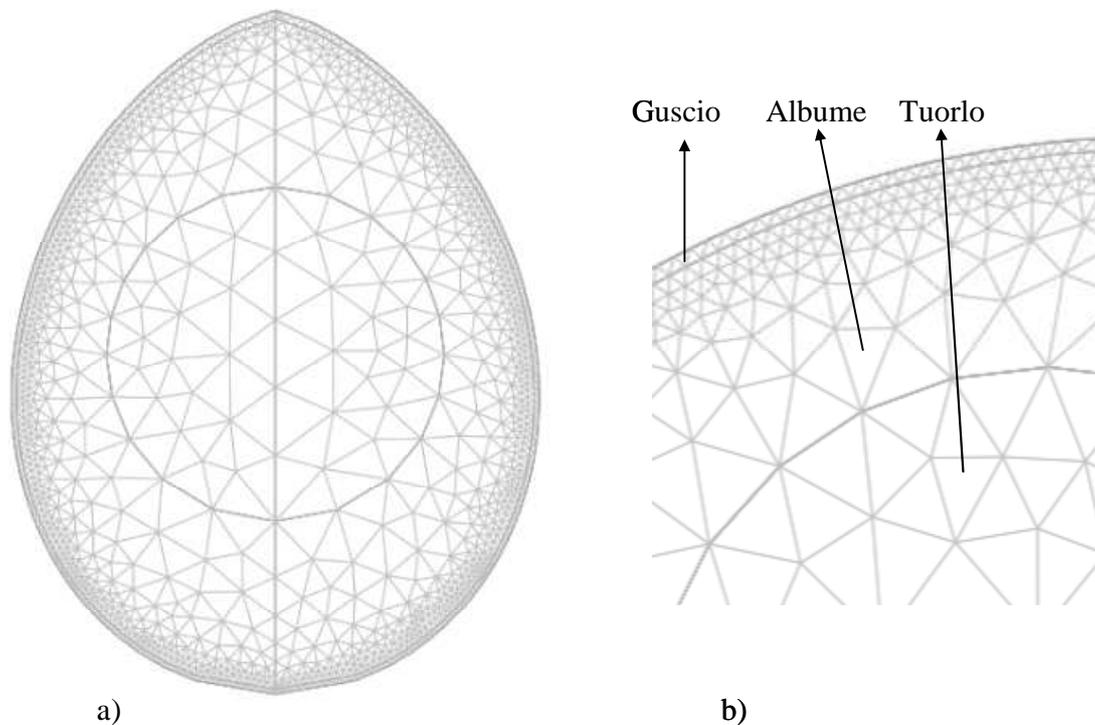
$\beta_{air}$  costante di comprimibilità: 1/T

$L$  diametro sfera (uovo): 0.058 (m)

$\bar{C}_l$  è una costante che dipende dal numero di Ra e in questo caso assume il valore di 0.11 (Raithby & Terry, 2000).

	$K$ ( $Wm^{-1}K^{-1}$ )	$C_p$ ( $Jkg^{-1}K^{-1}$ )	$\rho$ ( $kgm^{-3}$ )
Guscio	1.03	1234	2300
Albume	0.55	3860	1004
Tuorlo	0.36	2849	1053

**Tabella 7.1:** proprietà termiche dei diversi componenti dell'uovo inserite nel modello (K:conducibilità termica;  $C_p$ : calore specifico;  $\rho$ : densità).



**Figura 7.1:** a) geometria 2D caratterizzata da 2542 elementi triangolari e 1400 nodi; in b) è possibile distinguere i diversi costituenti dell'uovo.

### *Validazione del modello numerico*

Per validare il modello numerico, sono state trattate in forno a 55°C 10 uova e, tramite termocoppie K (Chromel/Alumel; Tersid Came, Italia), è stata misurata la temperatura della superficie interna del guscio e dell'albume per l'intera durata del trattamento (50, 100, 150 o 200 minuti). Per estrarre il tuorlo e l'albume ed inserire e fissare le termocoppie, è stato effettuato un foro di 10 mm sul guscio. Successivamente l'uovo è stato riempito con il solo albume.

Gli andamenti della temperatura determinati sperimentalmente sono stati confrontati con gli andamenti determinati numericamente, per la medesima tipologia di trattamento.

### *Impatto del trattamento sulla qualità dell'uovo*

Per ogni trattamento (50, 100, 150 o 200 minuti a 55°C) sono state trattate 20 uova, successivamente è stato valutato lo stato di coagulazione dell'albume tramite prove di torbidità, l'eventuale cambiamento del colore del guscio e il danneggiamento delle membrane testacee tramite calo peso (metodiche descritte nel capitolo 5).

### *Valutazione del potere decontaminante*

Il potere decontaminante dei trattamenti sulla carica microbica presente sul guscio, è stato valutato tramite delle prove microbiologiche effettuate in collaborazione con il CRIPS (Centro di Ricerca Interdipartimentale sulle Tecnologie e l'Igiene degli Allevamenti Intensivi delle Piccole Specie – DISA/UniBO) ed in particolare con il dott. Gerardo Manfreda e la dott.sa Frederique Pasquali.

I test sono stati effettuati su 10 uova inoculate sperimentalmente con *Salmonella* Enteritidis (MB2509), ceppo resistente alla streptomina e trattate rispettivamente per 50, 100, 150 e 200 minuti in forno (*High performance oven*, MOD 2100, F.lli Galli, Milan, Italy) a 55°C. (totale di 40 uova)

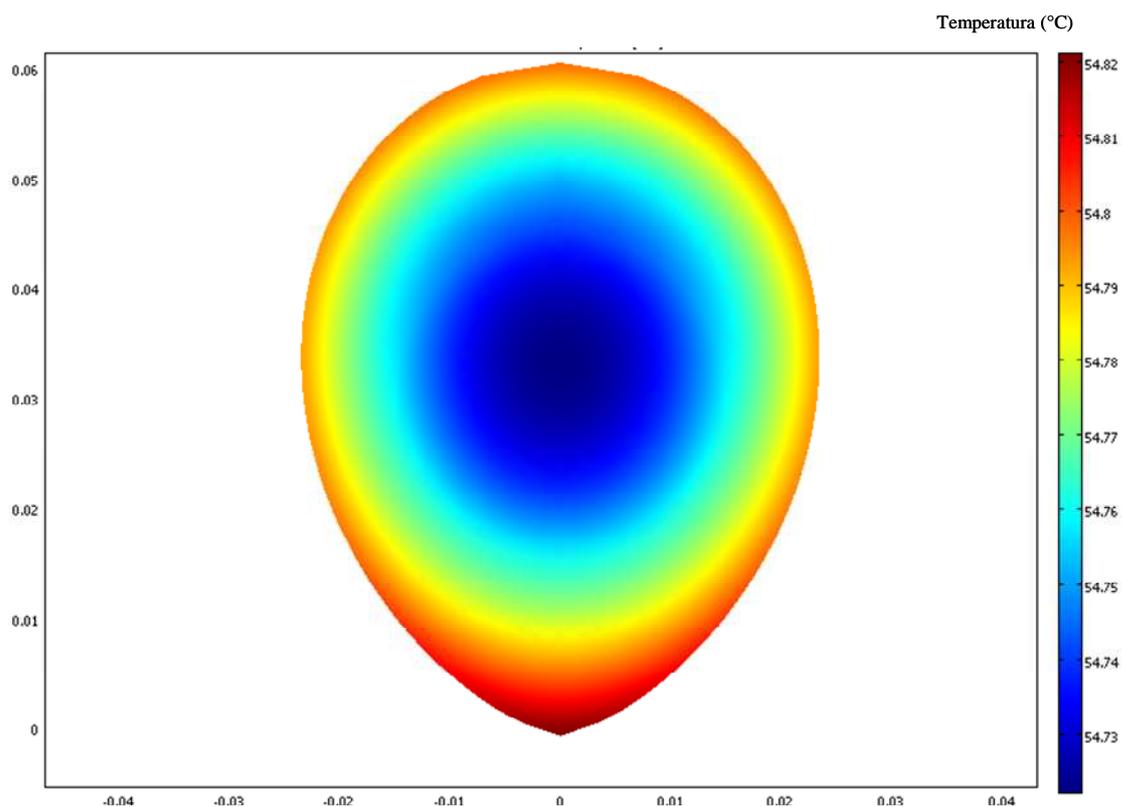
Le metodiche di inoculo e di stima della contaminazione sono descritte nel capitolo 6.

## Risultati e discussione

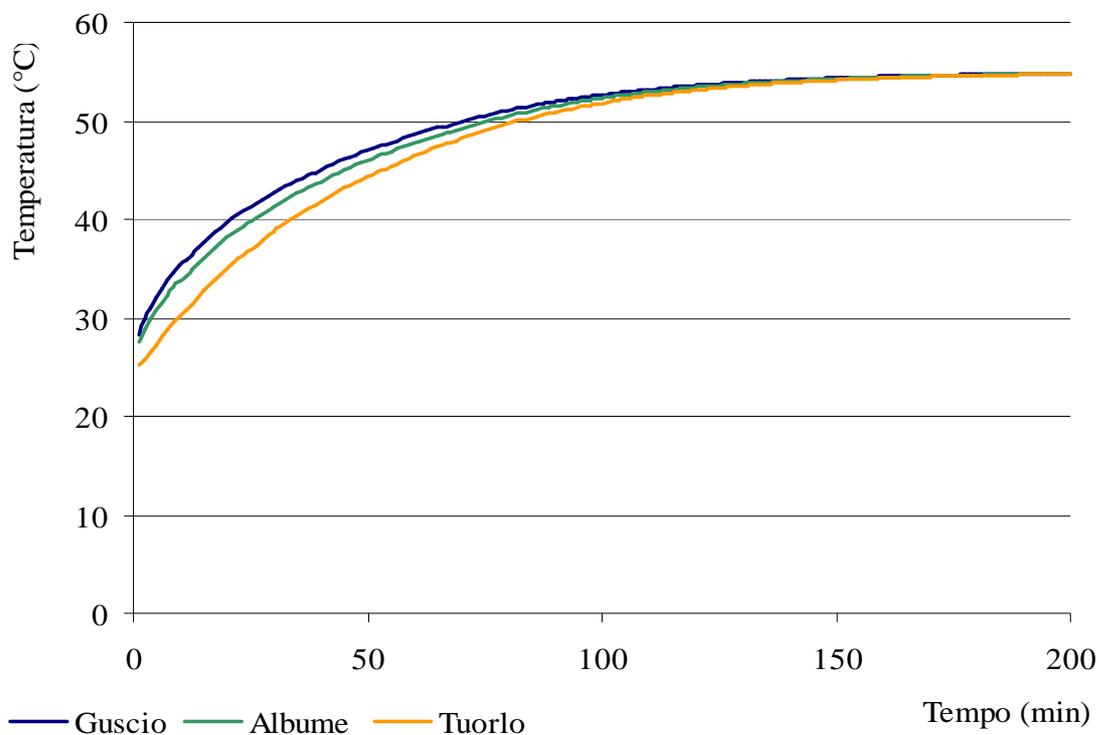
Per quanto riguarda i risultati relativi all'elaborazione del modello, in figura 7.2 viene riportato un esempio di configurazione dell'andamento della temperatura all'interno dell'uovo dopo 200 minuti di trattamento. L'aumento di temperatura è rappresentato dalla gradazione di colori. E' possibile osservare che la variazione della temperatura nei diversi punti dell'uovo è inferiore ad un grado, a dimostrazione del fatto che il calore diffonde in maniera uniforme e rapidamente all'interno dell'uovo. Nel modello, tale fenomeno viene esaltato a causa della condizione di perfetto contatto (*continuity*) impostata nell'interfaccia tra albume e tuorlo e albume e guscio.

In figura 7.3 sono riportati gli andamenti della temperatura in 3 punti appartenenti rispettivamente alla superficie interna del guscio (blu), all'albume (verde) e al tuorlo (arancione). E' possibile osservare che la differenza tra le curve è minima, in particolare dopo 100 minuti di trattamento quando i valori di temperatura si stabilizzano intorno ai 55°C (temperatura massima).

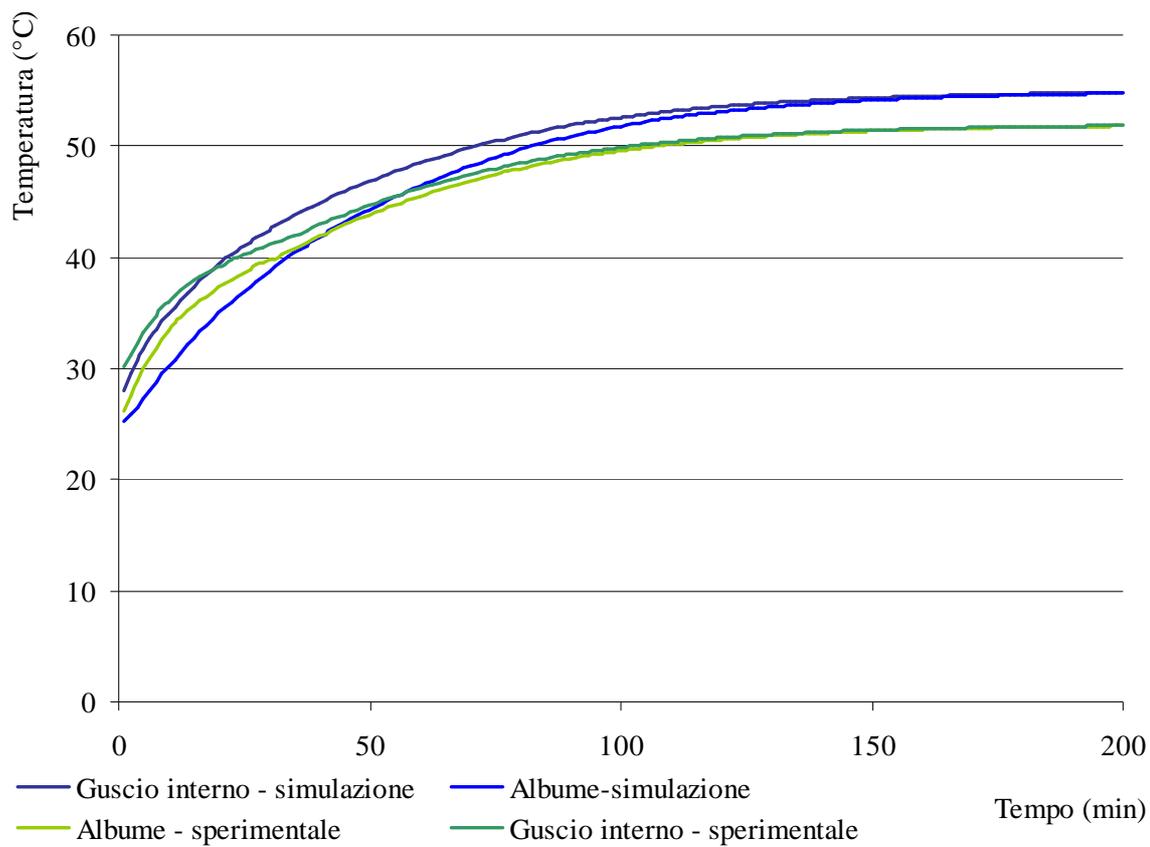
I dati provenienti dalla simulazione sono stati validati sperimentalmente tramite dati provenienti da termocoppie applicate in due punti dell'uovo: guscio interno ed albume. In figura 7.4 sono riportate le curve determinate sperimentalmente (verde) e le curve determinate numericamente (blu) relative al trattamento più lungo (200 minuti a 55°C). E' possibile osservare che le curve blu (simulazione), dopo circa 100 minuti di trattamento, si stabilizzano ad una temperatura più elevata. Tale differenza può essere associata sempre alla condizione di perfetto contatto termico tra i diversi componenti dell'uovo, ipotizzata durante la costruzione del modello, che consente di avere delle temperature calcolate superiori di quelle effettive. Tuttavia le curve simulate e quelle numeriche risultano essere in buon accordo.



**Figura 7.2** rappresentazione del riscaldamento dell'uovo dall'esterno verso l'interno a fine trattamento (200 minuti).



**Figura 7.3** andamento della temperatura, determinata numericamente, in tre punti dell'uovo (guscio interno, albume e tuorlo) durante 200 minuti di trattamento.



**Figura 7.4:** temperatura rilevata nella parte interna del guscio e nell'albumen, durante 200 minuti di trattamento. Sono riportati i dati sperimentali (verde) e i dati numerici (blu).

In figura 7.5 sono riportate le medie e le deviazioni standard dei valori di torbidità dell'albume determinati sui campioni trattati (verde) e sul campione controllo non trattato (blu). Non sono risultate esserci differenze significative tra i valori dei campioni trattati e i valori del campione non trattato. Tale affermazione suggerisce che il trattamento anche della durata di 200 minuti non attiva il fenomeno della coagulazione dell'albume.

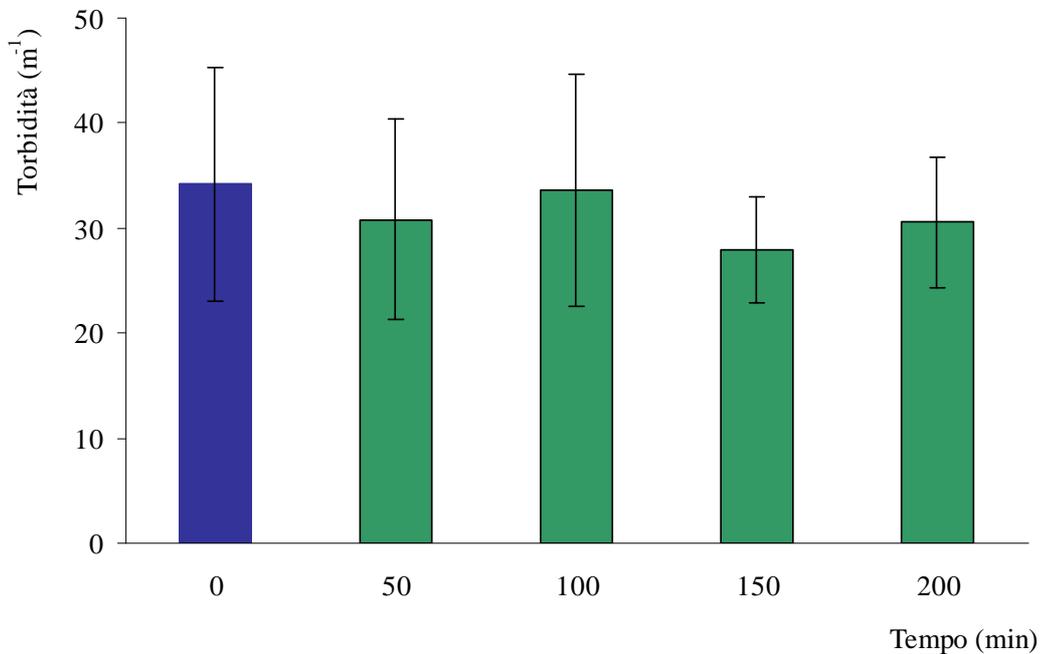
In figura 7.6 è riportato l'andamento del calo peso percentuale determinato a 50, 100, 150 e 200 minuti di trattamento. E' possibile notare che, tra la durata del trattamento e il calo peso percentuale, esiste una correlazione lineare ( $R^2 = 0.9943$ ). Tuttavia, il valore del calo peso percentuale che si raggiunge dopo 200 minuti di trattamento (0.285 %) è molto limitato e simile al valore di calo peso percentuale determinato su uova conservate per tre ore a temperatura ambiente (0.21%) e aventi la medesima età delle uova trattate. Ricordiamo infatti che il calo peso dell'uovo è un fenomeno naturale dovuto alla perdita di acqua tramite evaporazione. Il danneggiamento delle membrane testacee velocizza tale fenomeno.

In tabella 7.2 sono riportate le medie dei parametri colorimetrici ( $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ ) determinati sulle uova trattate e non. Dall'analisi della varianza, per tali parametri, non sono emerse differenze significative tra i diversi campioni.

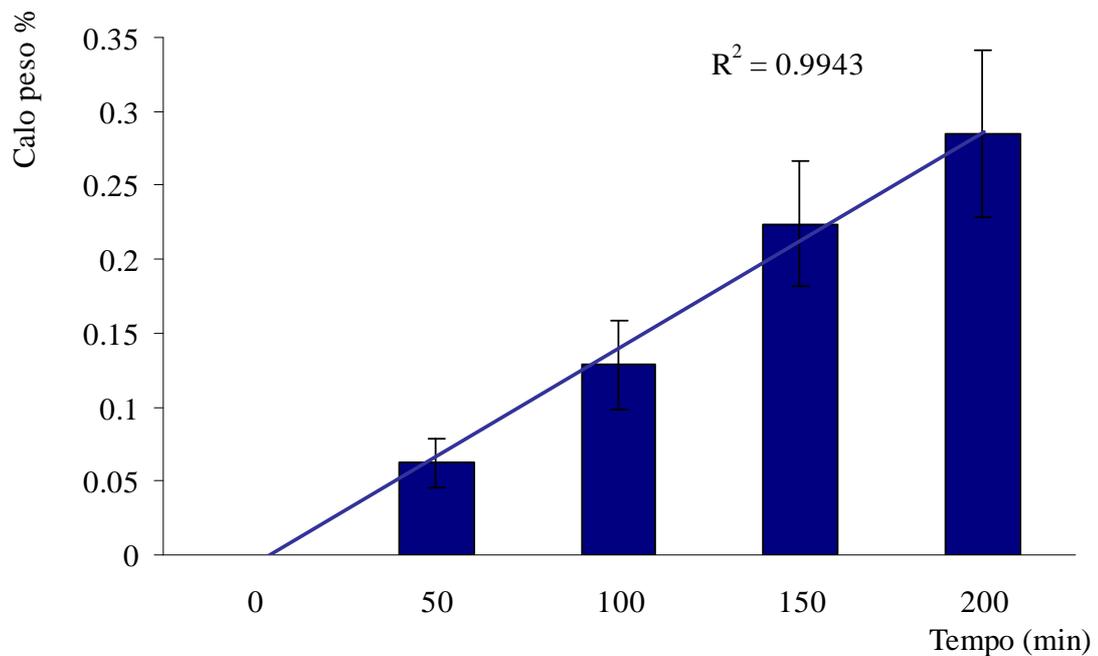
Ricordiamo che, per la valutazioni del colore del guscio è stato considerato l'indice  $\Delta E^*$  calcolato sulle medie dei parametri  $a^*$ ,  $b^*$  e  $L^*$  misurati sul campione trattato e sul campione di controllo. Il risultati ( $\Delta E^* = 0.651; 0.662; 0.632; 0.685$ ) indicano che i cambiamenti di colore sono impercettibili.

Per quanto riguarda il potere decontaminante della tecnica, in figura 7.7 sono riportati i risultati dei test microbiologici effettuati su uova inoculate con *Salmonella* Enteritidis e trattate a 55°C per 50, 100, 150 e 200 minuti (verde) e su uova non trattate (blu). Si osserva una riduzione massima della carica batterica (2.6

$\log_{10}$ ) dopo 200 minuti. E' possibile anche notare che tra riduzione della carica microbica e tempo di trattamento esiste una correlazione lineare confermata dall'elevato valore di  $R^2$  (0.92).



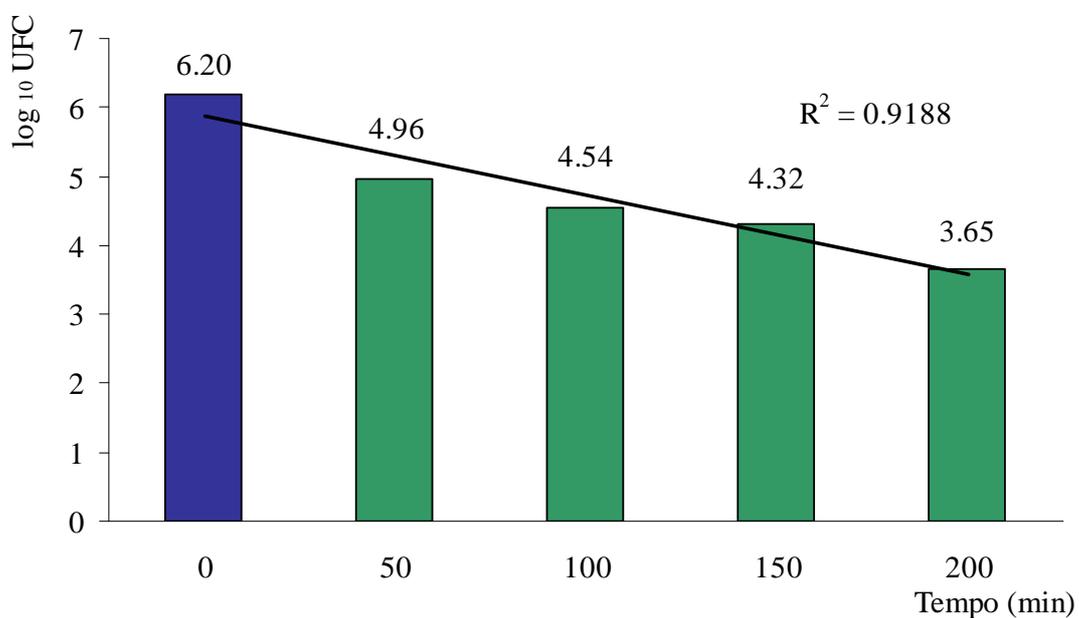
**Figura 7.5:** Valori di torbidità determinati sul campione trattato (verde) e sul campione non trattato (blu).



**Figura 7.6:** calo peso percentuale determinato sulle uova trattate.

	50 min	100 min	150 min	200 min	Non trattato
a*	16.5	16.6	16.3	15.8	16.5
b*	30.0	30.0	30.0	29.9	30.1
L*	62.9	62.6	63.0	63.0	62.8
$\Delta E^*$	0.651	0.662	0.632	0.685	

**Tabella 7.2:** medie dei valori dei parametri colorimetrici determinati sui differenti campioni, trattati e non.



**Figura 7.7:** carica microbica di *Salmonella* Enteritidis ( $\log_{10}$  UFC) presente su uova trattate (verde) e non trattate (blu).

## **Bibliografia**

Hou, H., Singh R.K., Muriana, P.M. & Stadelman W.J. (1996). Pasteurization of intact shell eggs. *Food Microbiology*. 13, 93–101.

Narushin, V.G. (1997) The avian egg: geometrical description and calculation of parameters, *Journal of Agricultural Engineering Research*. 68, 201-205.

Stadelman, W.J., Singh, R.K., Muriana, P.M., & Hou, H. (1996) Pasteurization of eggs in the shell. *Poultry Science*. 75, 1122-1125.

Raithby, G.D., & Terry, K.G. (2000) Convection Heat Transfer *CRC Handbook of Thermal Engineering*. Ed. Frank Kreith Boca Raton: CRC Press LLC



# CAPITOLO 8

## STUDIO NUMERICO DEL FENOMENO DIFFUSIVO DELLA CO<sub>2</sub> ALL'INTERNO DELL'UOVO

### Introduzione

Da un punto di vista tecnologico l'uovo può essere considerato un ingrediente multifunzionale in quanto può svolgere diverse funzioni per le sue proprietà coagulanti, schiumogene, emulsionanti, coloranti, aromatiche e nutrizionali (Yang et al. 1995). L'uovo viene utilizzato spesso nelle produzioni alimentari per le sue proprietà funzionali, in particolare è utilizzato per modificare la texture, come legante e per migliorare la viscosità (Chang Chen, et al. 1999). L' albume d'uovo viene utilizzato, in molte formulazioni alimentari, come ingrediente base (Liang et al. 2007).

Le proteine dell'albume sono responsabili delle diverse proprietà funzionali, come la capacità di formare la schiuma, di coagulare e di montare. Tali proprietà dipendono dal pH, che aumenta durante la conservazione da un minimo di 7,5 ad un massimo di 9,8 (Romanoff & Romanoff 1949). Le capacità di montare e di coagulare sono minime tra pH 7.5 e 8.5 (Keener et al 2000). Dopo la deposizione delle uova, la diffusione di CO<sub>2</sub> provoca un forte aumento del pH, in particolare nell'albume. Più in generale, la perdita di CO<sub>2</sub> tramite il guscio è collegata direttamente al deterioramento delle uova e ad un aumento dell' alcalinità del contenuto delle uova (Overfield et al. 1982). Healy & Peter (1925) hanno suggerito che l'albume e il tuorlo contengono sia CO<sub>2</sub> combinata (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) che CO<sub>2</sub> disciolta essendo lo ione bicarbonato funzione del pH (Brooks, 1938). Il trasferimento di CO<sub>2</sub> può essere anche facilitato dalla presenza di un meccanismo intrinseco, come l'attività enzimatica dell'anidrasi carbonica ( $H_2CO_3 \xrightleftharpoons{\text{CarbonicAnhydrase}} CO_2 + H_2O$ ) presente in molti alimenti (Simpson et al. 2009).

Diversi studi (Cottorill et al. 1956; Moran et al. 1937; Romanoff & Romanoff, 1949; Keener et al. 2000; Rocculi et al. 2009) suggeriscono di conservare le uova in atmosfera arricchita con CO<sub>2</sub> o raffreddare le uova in guscio con CO<sub>2</sub> criogenica per mantenere le proprietà qualitative e migliorare le proprietà funzionali. Per analizzare e migliorare, con metodi di modellazione e simulazione numerica queste nuove tecniche di conservazione e mantenimento delle proprietà funzionali dell'uovo è necessario conoscere il coefficiente di diffusione ( $D$ ) della CO<sub>2</sub> all'interno dell'uovo. La determinazione di questo coefficiente comporta una serie di lunghe e costose misurazioni sperimentali. Un'alternativa è l'uso di metodi inversi per valutare ad esempio lo stato iniziale del sistema, le condizioni al contorno, i coefficienti di scambio termico, la geometria del sistema, la temperatura e la variazione di umidità (Jarny et al. 1999). Negli ultimi anni i ricercatori in ingegneria dei processi alimentari hanno utilizzato i metodi inversi soprattutto per determinare le proprietà termiche degli alimenti (Monteau et al. 2008; Simpson et al. 2004; Zueco et al. 2004). Tuttavia, gli studi relativi alla determinazione, tramite metodi inversi, dei coefficienti di diffusione di liquidi e gas sono molto pochi (Da Silva, 2009; Colombo, 1997).

Un metodo inverso molto diffuso è la semplice stima di una variabile di stato tramite un metodo di calibrazione "*trial and error*" applicabile confrontando i valori simulati con quelli sperimentali. Questo metodo richiede molto tempo e, in caso di un problema con molti parametri coinvolti, è difficile determinare in quale direzione devono essere modificati i parametri. È una tecnica molto soggettiva, infatti è l'uomo che blocca il processo di calibrazione a sua discrezione. Infine, l'incertezza sui parametri ottenuti non può essere determinata in maniera rigorosa. Di conseguenza, il metodo di calibrazione "*trial and error*" non garantisce che siano determinati i migliori set di parametri (Ritter et al. 2003).

Un metodo inverso più efficace per la stima dei parametri è caratterizzato dalla combinazione di un modello numerico con un algoritmo. La ricerca del migliore set di parametri avviene in maniera iterativa, variando i parametri e confrontando

la risposta reale del sistema (prove sperimentali) con la soluzione numerica data dal modello. Infatti, la ricerca consiste nel trovare il minimo globale di una funzione obiettivo (OF) definita dalla differenza tra i valori misurati e quelli simulati. L'algoritmo minimizza la funzione obiettivo seguendo un particolare strategia, ad esempio basata sul gradiente della OF. In quest'ottica, sono stati sviluppati molti algoritmi di ottimizzazione, adatti dunque anche a risolvere numericamente i problemi inversi. Ad esempio, il metodo di Newton, il metodo di Gauss, il metodo di Levenberg-Marquardt, l'algoritmo di Nelder & Mead e diverse tecniche di ottimizzazione globale (Hopmans et al. 1999; Nelder & Mead, 1965). Ciascuno di questi metodi ha i suoi vantaggi e svantaggi, la possibilità di determinare il minimo globale dipende generalmente dalla presenza di eventuali minimi locali della funzione obiettivo.

L'efficienza di tali metodi è influenzata sostanzialmente dal numero di parametri e dalla forma della funzione obiettivo (Ritter et al. 2003).

Il successo nella determinazione di un parametro tramite metodo inverso dipende dall'impostazione del problema. Generalmente tre aspetti caratterizzano l'impostazione di un problema: identificabilità, stabilità e unicità. Infatti se più di un set di parametri porta alla stessa risposta del modello, i parametri non sono identificabili. Instabilità, in quanto i piccoli errori presenti nella misurazione della variabile possono portare a grandi cambiamenti dei parametri stimati. L'unicità si riferisce alla relazione inversa: se una data risposta porta a più di una serie di parametri, la soluzione inversa non è unica (Hopmans et al. 1999).

L'obiettivo di questo studio è stato quello di sviluppare un metodo inverso per stimare il coefficiente di diffusione della CO<sub>2</sub> ( $D$ ) nell' albume liquido, albume denso e tuorlo. Il problema inverso è stato risolto utilizzando Comsol Multiphysics PDE-solving combinato ad un codice di ottimizzazione (Comsol Script) simile a Matlab.

Successivamente è stato sviluppato un modello numerico in grado di descrivere il fenomeno della diffusione della CO<sub>2</sub> all'interno dell'uovo.

## Materiali e metodi

### *I sezione*

Determinazione sperimentale dei valori di concentrazione di CO<sub>2</sub> ( $\bar{C}_{exp}$ ) in funzione del tempo, in campioni di albume (denso e liquido) e tuorlo conservati in atmosfera satura di CO<sub>2</sub>.

### *II sezione*

Costruzione di un modello numerico relativo al fenomeno diffusivo della CO<sub>2</sub> nell'albume denso, nell'albume liquido e nel tuorlo. Determinazione numerica dei valori di concentrazione di CO<sub>2</sub> libera ( $\bar{C}_{num}$ ) in funzione del tempo

### *III sezione*

Utilizzo di un metodo inverso basato sulla tecnica degli elementi finiti per risolvere equazioni differenziali alle derivate prime parziali in ambiente COMSOL. Convergenza tra funzione numerica ( $\bar{C}_{num}$ ) e sperimentale ( $\bar{C}_{exp}$ ) e determinazione del coefficiente di diffusione ( $D_{CO_2}$ ), per i diversi componenti dell'uovo.

### *IV sezione*

Costruzione di un modello numerico in grado di descrivere il fenomeno diffusivo dell'anidride carbonica all'interno dell'uovo. Per fare ciò sono stati utilizzati i coefficienti di diffusione precedentemente determinati.

### *I sezione*

Le prove in oggetto sono state finalizzate alla raccolta sperimentale dei valori di concentrazione di CO<sub>2</sub> libera ( $\bar{C}_{\text{exp}}$ ) in funzione del tempo, in campioni di albume denso, albume liquido e tuorlo conservati in atmosfera satura di CO<sub>2</sub> (40.62 molim<sup>-3</sup>).

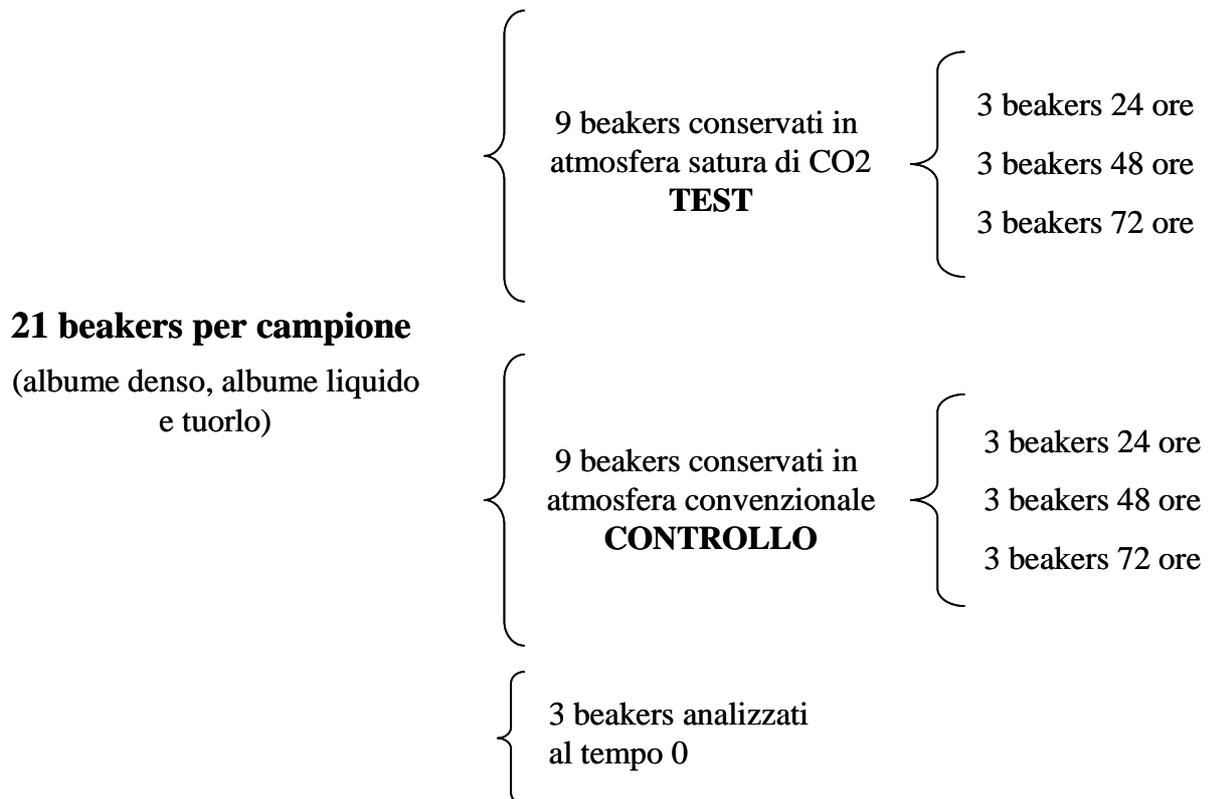
La CO<sub>2</sub> totale presente nell'albume e nel tuorlo si trova sia in forma combinata, per la maggior parte bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), che in forma libera come biossido di carbonio (Healy & Peter, 1925).

Secondo uno studio di J. Brooks (*The Distribution of Carbon Dioxide in the hen's Egg*, 1938) il rapporto tra CO<sub>2</sub> combinata e CO<sub>2</sub> libera dipende dalla tipologia di costituente; per l'albume denso la percentuale di CO<sub>2</sub> libera è circa il 40% mentre per l'albume liquido è circa il 39%. Ciò è dimostrato anche dal fatto che, come conseguenza di una maggiore concentrazione di HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> il pH dell'albume liquido è generalmente leggermente maggiore rispetto al pH dell'albume denso. Per quanto riguarda il tuorlo, il rapporto tra CO<sub>2</sub> libera e combinata è spostato verso la CO<sub>2</sub> libera (70%) in quanto, probabilmente, la componente lipidica del tuorlo favorisce la solubilità della CO<sub>2</sub> nel tuorlo rispetto all'albume.

Per la sperimentazione sono state utilizzate 100 uova fresche provenienti da galline Hy-Line Brown.

Le uova sono state sgusciate e sono stati separati il tuorlo, l'albume denso e l'albume liquido.

Successivamente, seguendo lo schema riportato in figura 8.1, sono stati riempiti, per ogni tipologia di campione (albume denso, albume liquido e tuorlo), 21 beakers, con le medesime caratteristiche geometriche, fino ad una altezza di 3cm (l).



**Figura 8.1:** organizzazione schematica del lavoro.

-Tre beakers, per un totale di nove beakers per campione, sono stati conservati a temperatura ambiente in buste impermeabili (PE-PA-PE 20 x 30 cm, 105 µm spessore) contenenti atmosfera satura di CO<sub>2</sub> rispettivamente per 24, 48 e 72 ore (TEST).

-Tre beakers, per un totale di nove beakers per campione, sono stati conservati a temperatura ambiente (20°C) in buste impermeabili contenenti atmosfera convenzionale rispettivamente per 24, 48 e 72 ore (controllo) (figura 8.2)

-Il contenuto dei rimanenti tre beakers è stato analizzato al tempo 0 cioè immediatamente dopo la sgusciatura delle uova.

Dopo 0, 24, 48 e 72 ore è stata determinata la concentrazione di CO<sub>2</sub> totale all'interno dei diversi campioni. Il metodo utilizzato (Keener et al. 2001) per ogni campione è il seguente:

- in un barattolo di vetro del volume di 250 ml sono stati inseriti circa sei grammi di campione e un vial da 30 ml contenente 12 ml di NaOH ( 1 M)
- il barattolo è stato chiuso ermeticamente e tramite una siringa sono stati iniettati 15 ml di acido fosfato in direzione del campione;
- il barattolo è stato conservato a 37° C per 24 ore, successivamente è stato estratto il vial al quale sono stati aggiunti 3ml di BaCl<sub>2</sub> (1 M) e qualche goccia di fenolftaleina;
- la soluzione del vial è stata titolata con HCl ( 1 M);
- la quantità di CO<sub>2</sub> totale nel campione è stata determinata tramite la seguente equazione:

$$\frac{\text{mg di CO}_2}{\text{g campione}} = \left( [\text{mEq di NaOH in soluzione} - \text{mEq HCl usato}] \left[ \frac{\text{mg di CO}_2}{\text{mEq}} \right] \left[ \frac{1}{\text{g di albume}} \right] \right)$$

In figura 8.3 è rappresentata la strumentazione utilizzata per determinare la concentrazione di CO<sub>2</sub> totale nei campioni di albume e tuorlo, mentre in figura 8.4 è riportata l'immagine dei barattoli contenenti i differenti campioni a fine sperimentazione. E' possibile notare che, sia l'albume che il tuorlo, dopo aver reagito con l'acido fosfato, risultano essere visivamente molto differenti rispetto a tuorli ed albumi non trattati.

I dati ottenuti tramite la metodica sopra illustrata fanno riferimento alla CO<sub>2</sub> totale presente nei diversi campioni, quindi, per determinare la frazione di CO<sub>2</sub> libera ( $\bar{C}_{\text{exp}}$ ) è stato necessario applicare le percentuali precedentemente riportate:

- albume liquido 39%;
- albume denso 40%;
- tuorlo 70%.

I valori ottenuti sono stati successivamente convertiti da mg g<sup>-1</sup> a moli m<sup>-3</sup>.

Al fine di ottenere delle funzioni di concentrazione di CO<sub>2</sub> libera osservata in funzione del tempo di conservazione, i valori di  $\bar{C}_{\text{exp}}$  (mol m<sup>-3</sup>) sono stati fittati con

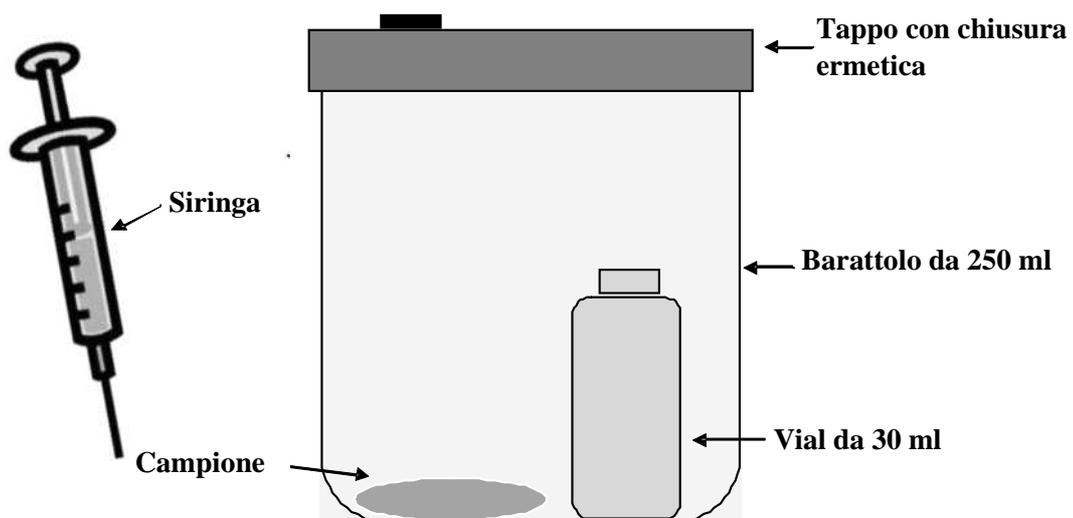
differenti modelli e l'equazione che, per tutti e tre i campioni, ha riportato il miglior coefficiente di correlazione ( $r$ ) è la seguente:

$$y = a(b - \exp^{-cx}) \quad (1)$$

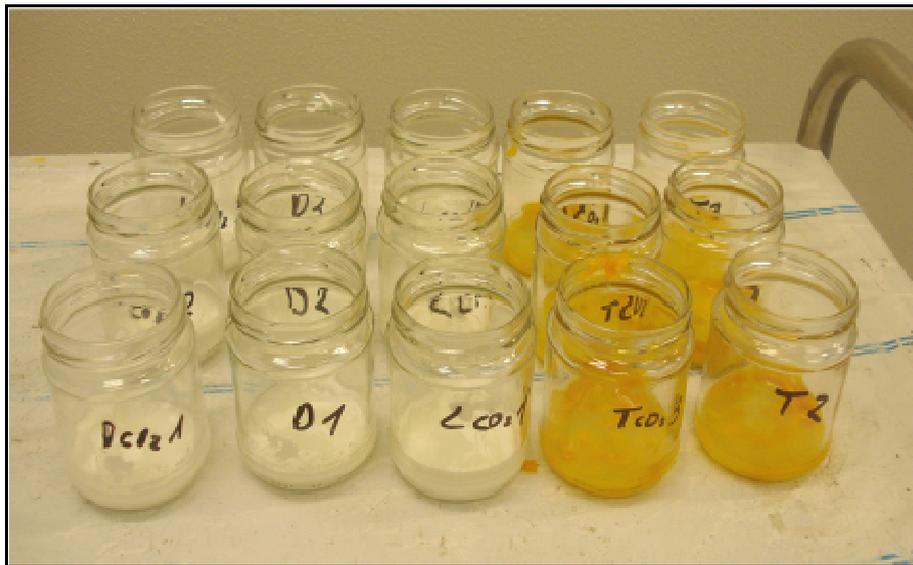
dove  $a$ ,  $b$ ,  $c$  sono coefficiente caratteristici della curva, relativi ad ogni tipologia di campione.



**Figura 8.2:** campioni conservati in buste impermeabili contenenti atmosfera convenzionale.



**Figura 8.3:** rappresentazione della strumentazione utilizzata per la determinazione di CO<sub>2</sub> secondo il metodo Keener, 2001).



**Figura 8.4:**campioni di albume e tuorlo a fine sperimentazione.

## II sezione

E' stato costruito un modello diffusivo in grado di riprodurre ciò che è avvenuto nei diversi beakers al fine di stimare un valore di CO<sub>2</sub> libera media ( $\bar{C}_{num}$ ) in funzione del tempo e di un determinato valore di  $D$ .

Il modello diffusivo è stato sviluppato utilizzando Comsol Multiphysics 3.5 (COMSOL Inc., Burlington, MA).

Il modello geometrico utilizzato è monodimensionale (la diffusione di CO<sub>2</sub> avviene principalmente in un'unica direzione) e rispecchia le dimensioni del campione sperimentale ( $l$ : 0.03 m;  $d$ : 0.045 m).

Il fenomeno della diffusione è governato dalle leggi di Fick, secondo cui il flusso di una massa è proporzionale al gradiente di concentrazione tramite il coefficiente di diffusione ( $D_{CO_2}$ ). Quindi il problema è stato descritto tramite la seconda legge di Fick (monodimensionale):

$$\frac{\partial C_{num}}{\partial t} = D_{CO_2} \left( \frac{\partial^2 C_{num}}{\partial x^2} \right) \quad (2)$$

dove  $C_{num}$  è la concentrazione di CO<sub>2</sub> disciolta calcolata ( $\text{mol m}^{-3}$ ) nella posizione  $x$  (m) e al tempo  $t$  (s).

Le condizioni iniziali e al contorno utilizzate sono le seguenti:

- concentrazioni iniziali di CO<sub>2</sub> disciolte ( $C_{0-num}$ ) uniformemente distribuite e relative alle determinazioni sperimentali (albume liquido:  $18.8 \text{ mol m}^{-3}$ ; albume denso:  $19.2 \text{ mol m}^{-3}$ ; tuorlo :  $5.14 \text{ mol m}^{-3}$ );
- coefficiente di diffusione ( $D_{CO_2}$ ) costante ed omogeneo durante tutto il fenomeno diffusivo;
- concentrazione di CO<sub>2</sub> al contorno è stata definita ipotizzando che uno strato esterno di albume o tuorlo (di spessore minimo) si saturi istantaneamente a contatto con l'atmosfera al 100% di CO<sub>2</sub>.

I valori di saturazione sono stati determinati dopo una attenta ricerca bibliografica. Brooks (1938) ha riportato che, in condizioni di equilibrio, a pressione atmosferica e a 25°C la massima solubilità (concentrazione di saturazione) della CO<sub>2</sub> nell'albumine e nel tuorlo è pari rispettivamente a 32 e 56 moli m<sup>-3</sup> (coefficiente di Bunsen:  $\alpha_{\text{albumine}}= 0.74$ ;  $\alpha_{\text{tuorlo}}=1.3$ ). Tale differenza è dovuta principalmente alla componente lipidica presente nel tuorlo che agisce in maniera positiva sulla solubilità della CO<sub>2</sub>.

La concentrazione media di CO<sub>2</sub> disciolta ( $\bar{C}_{num}$ ) al tempo  $t$  (s) è stata definita da:

$$\bar{C}_{num} = \frac{1}{L} \int_0^L C_{num} dx \quad (3)$$

Il modello è risultato essere costituito da 19 elementi (Lagrange-Quadratic) con rapporto di lunghezza pari a 0.177 e 78 gradi di libertà.

### III sezione

In questo studio, al fine di stimare il coefficiente di diffusione della CO<sub>2</sub> nei diversi costituenti dell'uovo ( $D_{CO_2}$ ) è stato utilizzato un metodo inverso complesso che combina il modello numerico con un algoritmo (processo iterativo).

L'errore tra il valore ottenuto tramite simulazione e il valore ottenuto sperimentalmente (equazione 1), è stato considerato come una *funzione obiettivo* (OF).

Il valore ottimale di  $D_{CO_2}$  è uno solo e corrisponde al minimo della funzione oggettiva. Per minimizzare la OF il modello è stato combinato con un algoritmo di ottimizzazione globale. In particolare è stato utilizzato l'algoritmo di Nelder-Mead (NMS) (Nelder and Mead, 1965).

Per la soluzione del problema, si è deciso di utilizzare il metodo dei minimi quadrati in quanto la stima dei parametri tramite metodo inverso può essere considerata come un problema di ottimizzazione non lineare descritto come soluzione alle derivate prime parziali (PDE).

La funzione obiettivo è risultata essere la seguente:

$$OF(D_{CO_2}) = \int [\bar{C}_{exp}(t) - \bar{C}_{num}(t, D_{CO_2})]^2 dt \approx \sum_i [\bar{C}_{exp}(t_i) - \bar{C}_{num}(t, D)]^2 \quad (5)$$

essendo  $t_i = 0, 24, 48, 72$

Per implementare  $OF(D_{CO_2})$  nel modello è stato necessario introdurre il parametro  $\bar{C}_{exp}(t)$  relativo alle prove sperimentali. Successivamente la funzione  $OF(D_{CO_2})$  è stata integrata nel tempo tramite il modulo PDE.

Il modello per calcolare  $\bar{C}_{num}(t, D_{CO_2})$  è stato sviluppato in Comsol 3.5 tramite il solutore PDE basato sulla tecnica degli elementi finiti, mentre la minimizzazione della funzione oggettiva è stata risolta attraverso il linguaggio script di Comsol (simile al linguaggio Matlab).

L'algoritmo di Nelder e Mead è stato introdotto nel 1965 ed è rimasto uno dei più popolari algoritmi senza derivate per l'efficienza dimostrata soprattutto per problemi di piccole dimensioni. Questo metodo si sposta nello spazio delle soluzioni tramite semplici, cioè figure geometriche. L'idea è quella di cercare di espandere il semplice se si trovano valori buoni della funzione e contrarlo se non se ne trovano.

Il metodo utilizza solo la somma dei residui quadrati (equazione 4) in successive valutazioni secondo uno schema estremamente rarefatto:

$$S(\beta) = \sum_{i=1}^n [y_i - f(X_i; \beta)]^2 \quad (4)$$

dove  $X$  rappresenta il vettore delle  $n$  variabili indipendenti,  $y$  la variabile dipendente,  $\beta$  il vettore incognito dei  $k$  parametri del modello nella popolazione dei valori. L'espressione  $f(X, \beta)$  esprime il legame che regola l'associazione fra le  $X$  e la  $y$  attraverso un'opportuna combinazione dei parametri.

$b_1, b_2, b_3$  sono punti dello spazio parametrico tali che  $S(b_1) > S(b_2)$  e  $S(b_1) > S(b_3)$ . Esplorando lo spazio parametrico in alcuni punti prefissati lungo il piano che congiunge  $b_1$  al punto di mezzo del piano che congiunge  $b_2$  e  $b_3$  si vuole determinare un punto  $b_4$  tale che  $S(b_4) < S(b_1)$ .

Una volta determinato un punto  $b_4$  le iterazioni proseguono ragionando allo stesso modo con  $b_4, b_2, b_3$ . In pratica, ad ogni passo, l'algoritmo costruisce un semplice ( $k+1$  punti nello spazio a  $k$  dimensioni) il cui orientamento ed il cui volume vengono modificati ad ogni iterazione. Nel caso in cui non fosse possibile determinare il punto  $b_4$  il semplice è contratto intorno a  $b_2$  o  $b_3$  a seconda che  $S(b_2) < S(b_3)$  o viceversa. La ricerca del minimo avviene perciò all'interno di una griglia più o meno sparsa di punti e non seguendo una superficie continua di valori. L'algoritmo si interrompe quando il valore della somma dei minimi quadrati nei vertici del semplice è abbastanza uniforme in base ad un qualche criterio prefissato: ad esempio la varianza della (4) nei vertici del semplice.

Questo algoritmo in generale è una tecnica euristica, nel senso che non è possibile assicurare la convergenza globale della sequenza prodotta.

Tuttavia, sebbene non caratterizzato da proprietà teoriche di convergenza, questo algoritmo si è rivelato in pratica molto efficiente in modo particolare per la soluzione di problemi di dimensioni non superiori alle dieci variabili. Tale metodo è presente in varie librerie standard di ottimizzazione (Tarsitano, 1979).

#### *IV sezione*

Al giorno d'oggi sono disponibili ottimi software commerciali di fluidodinamica computazionale utili alla risoluzione flessibile e simultanea delle equazioni di conservazione dell'energia, della massa e del momento (Scott & Richardson, 1997) ampiamente utilizzati nell'ambito dell'ingegneria alimentare (Bin Xia et al. 2002; Fabbri, 2005). Le equazioni riguardanti la diffusione della CO<sub>2</sub> all'interno dell'uovo durante il trattamento di confezionamento in atmosfera modificata al 100% di CO<sub>2</sub> sono state risolte utilizzando Comsol Multiphysics 3.5 (COMSOL Inc., Burlington, MA, USA), un solutore commerciale di equazioni differenziali alle derivate parziali basato sulla tecnica degli elementi finiti. È stato scelto il risolutore UMFPACK, che è attualmente uno dei più collaudati per la risoluzione di sistemi asimmetrici lineari sparsi.

Inizialmente è stato costruito un modello 2D e, successivamente, con una semplice operazione, è stato costruito un modello 3D. La geometria dell'uovo è assialsimmetrica quindi, il modello 3D può essere facilmente generato dalla rivoluzione del profilo dell'uovo attorno all'asse longitudinale.

Il guscio non è stato preso in considerazione in quanto l'anidride carbonica ha un'elevata capacità di penetrare attraverso il guscio rispetto all'ossigeno (Romanoff & Romanoff, 1949). Per semplificare il modello non è stata considerata la camera d'aria in quanto ha un impatto minimo sul fenomeno diffusivo dell'anidride carbonica all'interno dell'uovo, soprattutto nelle uova fresche dove le sue dimensioni sono ridotte (inferiore ai 4 mm).

Il profilo geometrico dell'uovo è stato definito tramite la seguente equazione (Narushin, 1997):

$$y = \pm 1.5396 \frac{B}{L} \sqrt{L^{0.5} x^{1.5} - x^2} \quad (6)$$

dove  $L$  (m) è la lunghezza dell'uovo e  $B$  il diametro equatoriale (m).

All'interno del profilo dell'uovo sono stati inseriti anche il profilo circolare del tuorlo, caratterizzato da un raggio  $r$  (m) e i profili dell'albume denso e liquido. I

parametri  $L$  (0.058 m),  $B$  (0.044) e  $r$  (0.015 m) sono stati determinati attraverso misure dirette effettuate su 30 uova provenienti da galline Hy-Line Brown utilizzando un calibro digitale (CDJB15; Borletti, Italy).

In figura 8.5 è riportata la geometria del modello 2D dove è possibile distinguere i diversi componenti dell'uovo: tuorlo, albume denso e albume liquido. In figura 8.6 invece è riportata la geometria 3D ottenuta tramite rivoluzione di 360 gradi della geometria 2D assialsimmetrica.

Per ottenere un accurato modello CFD bisogna descrivere nel modo più realistico possibile i materiali coinvolti. In questo lavoro è stato quindi necessario descrivere l'uovo tramite le sue reali proprietà diffusive (coefficiente di diffusione della  $CO_2$  nei diversi componenti dell'uovo). I valori dei coefficienti di diffusione della  $CO_2$  nei diversi componenti dell'uovo (albume denso, albume liquido e tuorlo) sono stati definiti precedentemente tramite metodo inverso iterativo (paragrafo precedente).

#### *Equazioni di governo e condizioni al contorno*

Il fenomeno della diffusione è governato dalle leggi di Fick secondo cui il flusso di una massa è proporzionale al gradiente di concentrazione tramite il coefficiente di diffusione ( $D_{CO_2}$ ). Quindi il problema è stato descritto tramite la seconda legge di Fick:

$$\frac{\partial C_{num}}{\partial t} = D_{CO_2} \left( \frac{\partial^2 C_{num}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C_{num}}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C_{num}}{\partial z^2} \right) \quad (7)$$

dove  $C_{num}$  è la concentrazione di  $CO_2$  disciolta calcolata ( $mol\ m^{-3}$ ) al tempo  $t$  (s).

Le condizioni iniziali e al contorno utilizzate sono le seguenti:

- concentrazioni iniziali di  $CO_2$  disciolte uniformemente distribuite ed relative alle determinazioni sperimentali (albume liquido:  $18.8\ mol\ m^{-3}$ ; albume denso:  $19.2$ ; tuorlo :  $5.14\ mol\ m^{-3}$ );
- concentrazione al contorno di  $CO_2$  pari a  $32\ mol\ m^{-3}$ ;

- coefficienti di diffusione ( $D_{co2}$ ) caratteristici per ogni tipologia di costituente (determinati precedentemente tramite metodo inverso).

La concentrazione media di anidride carbonica libera ( $\bar{C}_{num}$ ) al tempo t (s) è stata definita nel seguente modo:

$$\bar{C}_{num} = \frac{1}{V} \int C_{num} dV$$

dove V è il volume dei diversi componenti dell'uovo.

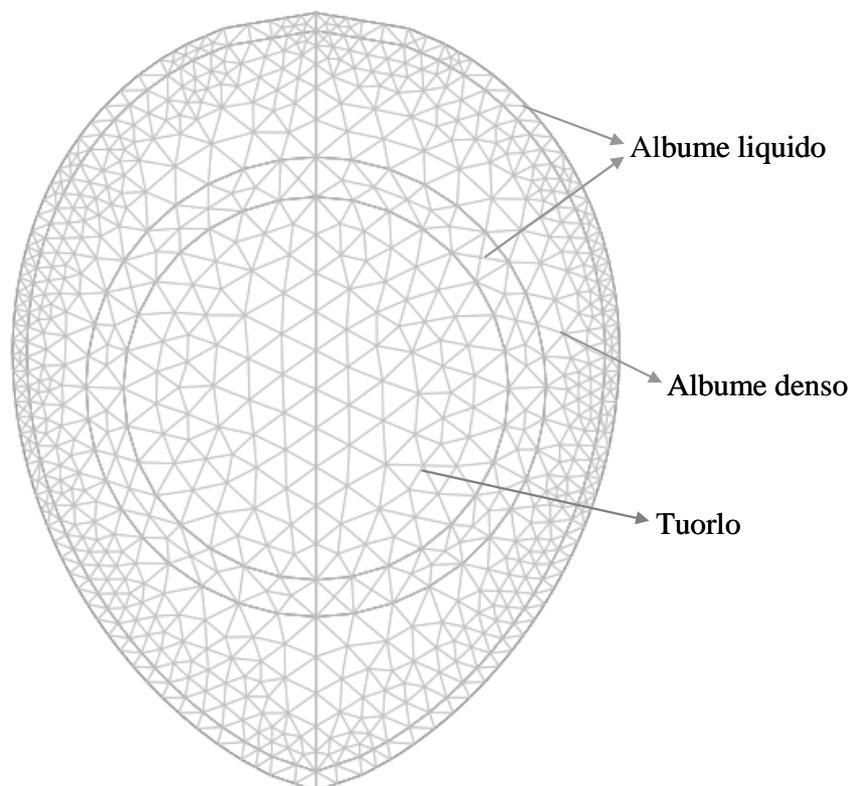
### *Validazione del modello*

La validazione del modello è avvenuta confrontando i valori simulati con i valori sperimentali della concentrazione di anidride carbonica totale determinata nell'albume di uova confezionate in atmosfera satura di CO<sub>2</sub> per 72 ore.

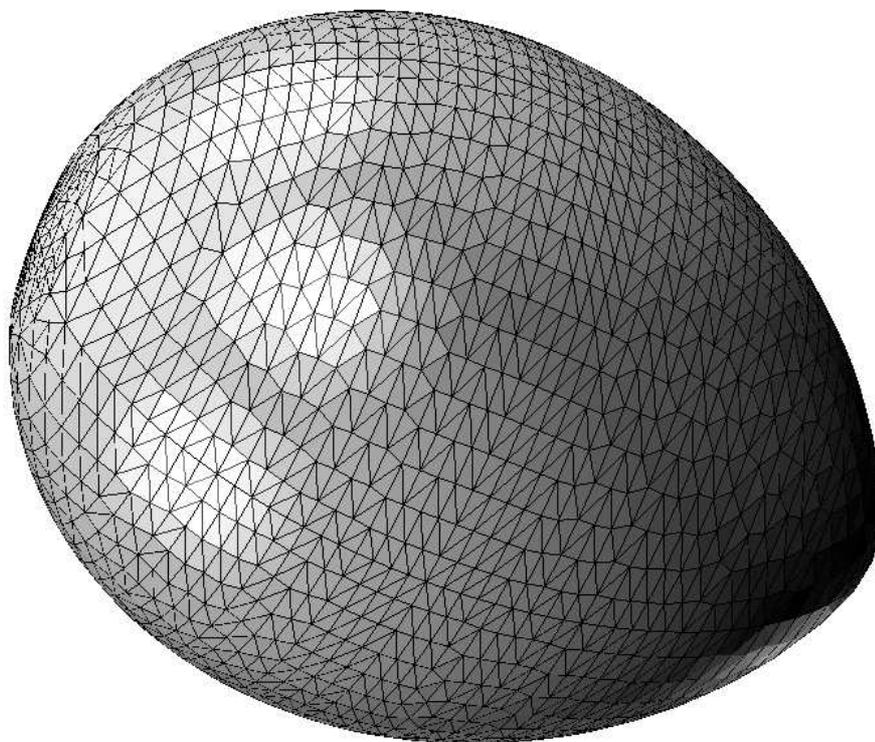
Un campione di 10 uova è stato conservato a temperatura ambiente in buste impermeabili (PE-PA-PE 20 x 30 cm, 105 µm spessore) contenenti atmosfera satura di CO<sub>2</sub> rispettivamente per 0, 24, 48 e 72 ore (40 uova totali).

Dopo 0, 24, 48 e 72 ore, utilizzando il metodo proposto da Keener (descritto in precedenza), è stata determinata la concentrazione di CO<sub>2</sub> totale presente nell'albume delle diverse uova.

I valori ottenuti sono stati successivamente convertiti da mg g<sup>-1</sup> a moli m<sup>-3</sup> per essere confrontati con i valori determinati numericamente.



**Figura 8.5:** geometria 2D caratterizzata da 1514 elementi triangolari e 816 nodi; è possibile distinguere i diversi costituenti dell'uovo.



**Figura 8.6:** geometria 3D caratterizzata da 35494 elementi tetraedrici e 7031 nodi.

## Risultati e discussione

In tabella 8.1 sono riportate le medie e le deviazioni standard delle concentrazioni di anidride carbonica totale ( $\text{mgCO}_2/\text{g}$ ) determinate sperimentalmente nei diversi costituenti dell'uovo conservati per 72 ore in atmosfera satura di  $\text{CO}_2$ .

In tabella 8.2 sono riportati i coefficienti di correlazione  $r$  e i valori dei coefficienti  $a$ ,  $b$  e  $c$  relativi all'equazione esponenziale (1), rispettivamente per albume denso, albume liquido e tuorlo.

In figura 8.7 sono riportati i valori di  $\bar{C}_{\text{exp}}$  ( $\text{mol m}^{-3}$ ) in funzione del tempo e delle tre tipologie di campione (albume denso, albume liquido e tuorlo) successivamente interpolati con l'equazione esponenziale (1).

In tabella 8.3 sono riportati i valori dei coefficienti di diffusione ( $D_{\text{CO}_2}$ ) determinati tramite metodo inverso iterativo ed utilizzati successivamente per caratterizzare i materiali del modello diffusivo. I valori determinati, con particolare riferimento al valore dell'albume denso, sono dello stesso ordine di grandezza dei valori riportati da Gros et al. (1974) relativi ad uno studio sulla diffusione facilitata dell'anidride carbonica in soluzioni di albumina a diverse pressioni parziali ( $8\text{E}-10 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). È possibile anche notare che il valore di  $D_{\text{CO}_2}$  dell'albume liquido è molto simile al valore del coefficiente di diffusione dell'anidride carbonica in acqua ( $1\text{E}-9 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Tale considerazione è importante se si sottolinea il fatto che l'albume liquido è composto per il 90% da acqua.

	Tempo (ore)			
	0	24	48	72
<b>mg CO<sub>2</sub>/g albume liquido</b>	2.04 0.02	2.82 0.03	2.90 0.03	3.17 0.03
<b>mg CO<sub>2</sub>/g albume denso</b>	2.03 0.07	2.48 0.17	2.75 0.24	2.96 0.07
<b>mg CO<sub>2</sub>/g tuorlo</b>	0.31 0.02	0.60 0.04	0.86 0.12	1.28 0.14

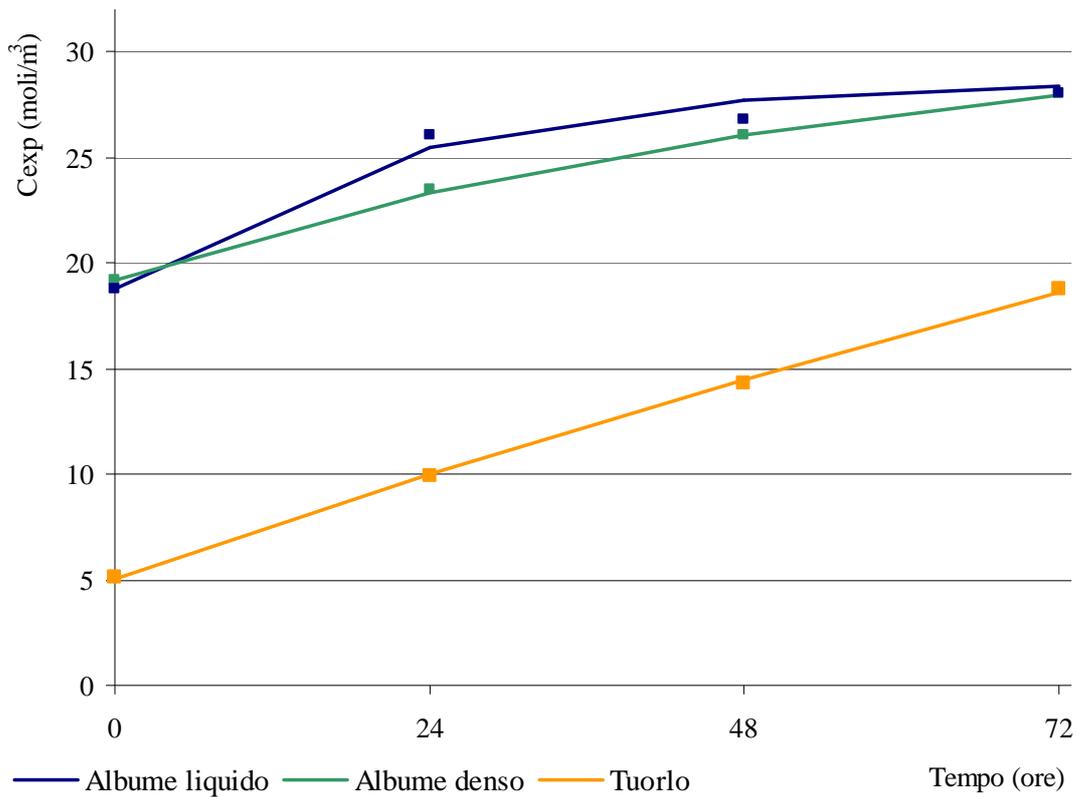
**Tabella 8.1:** concentrazione di CO<sub>2</sub> totale (disciolta e solubile) in albume denso, liquido e tuorlo conservati in atmosfera satura di CO<sub>2</sub> per 72 ore.

	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>r</b>
Albume denso	12.318	2.560	0.017	0.980
Albume liquido	8.890	3.110	0.065	0.960
Tuorlo	58.860	1.086	0.004	0.980

**Tabella 8.2:** coefficienti a, b e c caratterizzanti l'equazione (1) e relativi coefficienti di correlazione *r*.

	$D_{CO_2} \text{ (m}^2 \text{ s}^{-1}\text{)}$
Albume liquido	1.80E-09
Albume denso	8.50E-10
Tuorlo	1.60E-10

**Tabella 8.3:** valori dei coefficienti di diffusione determinati tramite metodo inverso iterativo.



**Figura 8:7** Valori della concentrazione di CO<sub>2</sub> solubile determinati sperimentalmente (■) e stimati con l'equazione esponenziale (1) (—).

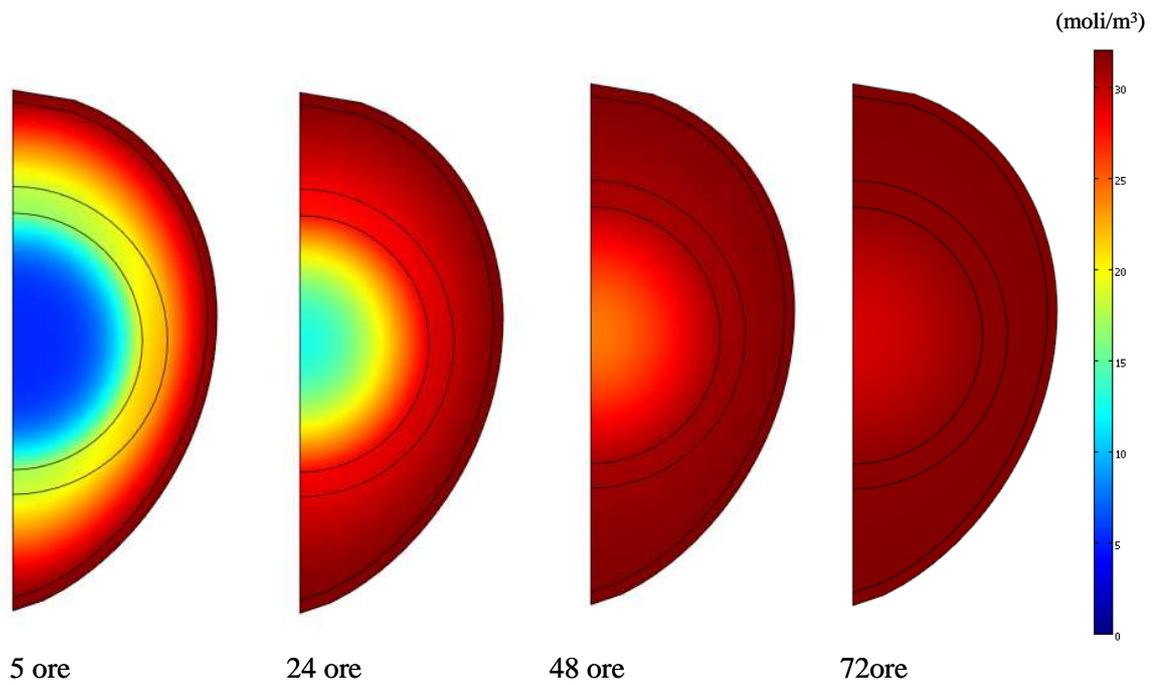
Per quanto riguarda i risultati relativi all'elaborazione del modello, in figura 8.8 è riportato l'andamento della concentrazione di anidride carbonica solubile all'interno dell'uovo dopo 5, 24, 48, e 72 ore (modello 2D). L'aumento di concentrazione è rappresentato dalla gradazione di colori (0-32 mol m<sup>-3</sup>).

In figura 8.9 è riportato l'andamento della concentrazione di anidride carbonica solubile dopo 24 ore di trattamento in sezioni della geometria 3D. Si nota che il valore minimo è circa 16 mol m<sup>-3</sup> (tuorlo) mentre il valore massimo è prossimo a 32 mol m<sup>-3</sup> (albume liquido esterno).

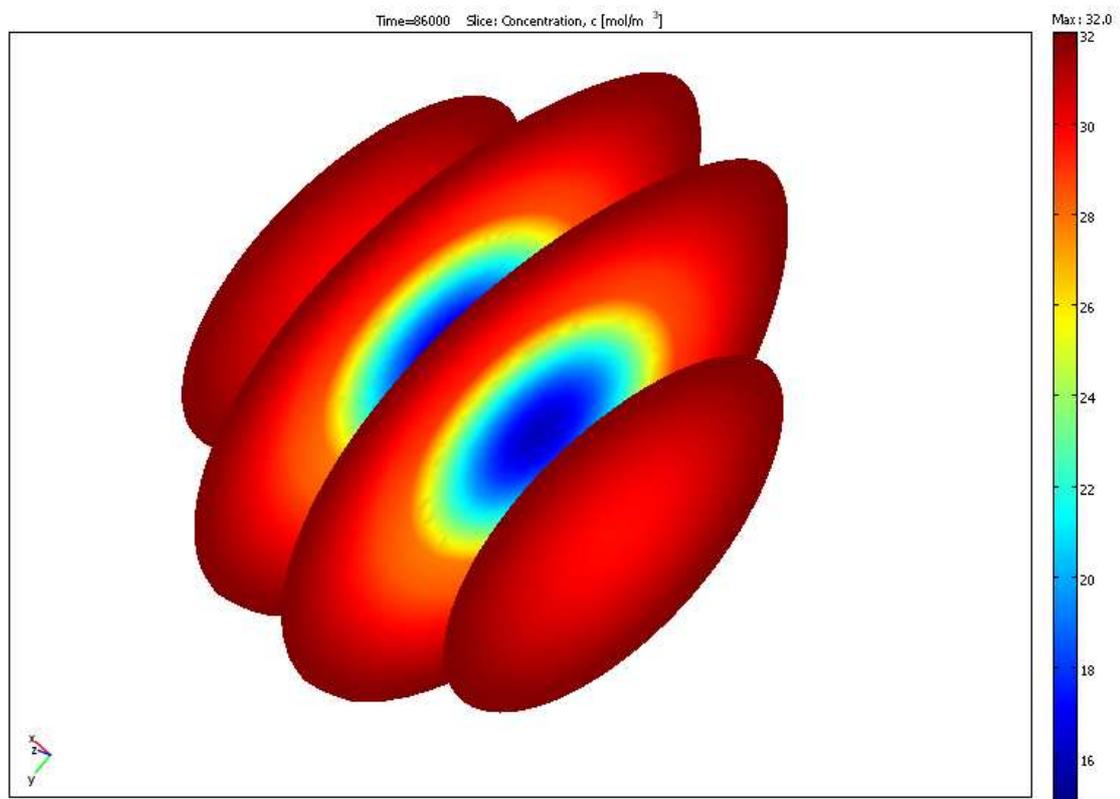
In figura 8.10 e 8.11 sono riportati rispettivamente gli andamenti della concentrazione media di anidride carbonica disciolta e totale (disciolta e combinata) durante le 72 ore di conservazione in atmosfera satura di CO<sub>2</sub> per albume denso, liquido e tuorlo .

E' possibile osservare che, dopo circa 35 ore di trattamento, sia l'albume denso che l'albume liquido arrivano in media a saturazione, mentre il tuorlo a 72 ore ancora non ha raggiunto, in media, il valore massimo di saturazione.

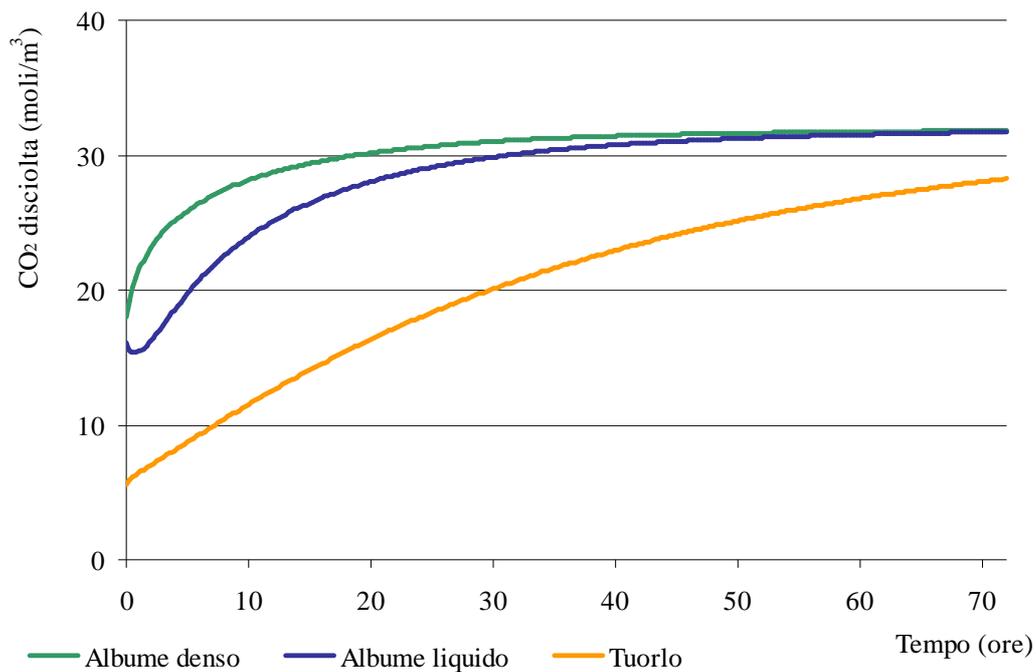
La concentrazione totale di anidride carbonica nell'albume è massima dopo circa 35 ore (80 mol m<sup>-3</sup>), indipendentemente che si tratti di albume denso o liquido. La concentrazione totale di anidride carbonica nel tuorlo raggiunge il valore massimo dopo circa 50 ore.



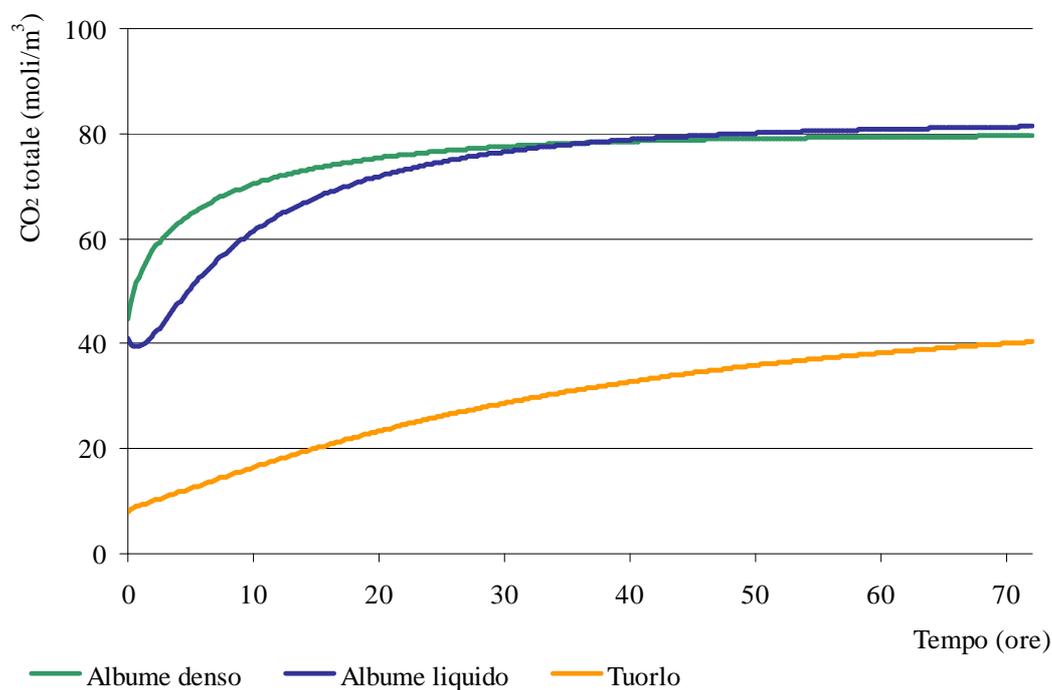
**Figura 8.8** andamento della concentrazione di anidride carbonica disciolta all'interno dell'uovo dopo 5, 24, 48, e 72 ore.



**Figura 8.9:** andamento della concentrazione di CO<sub>2</sub> solubile dopo 24 ore di trattamento ( 4 sezioni della geometria 3D).

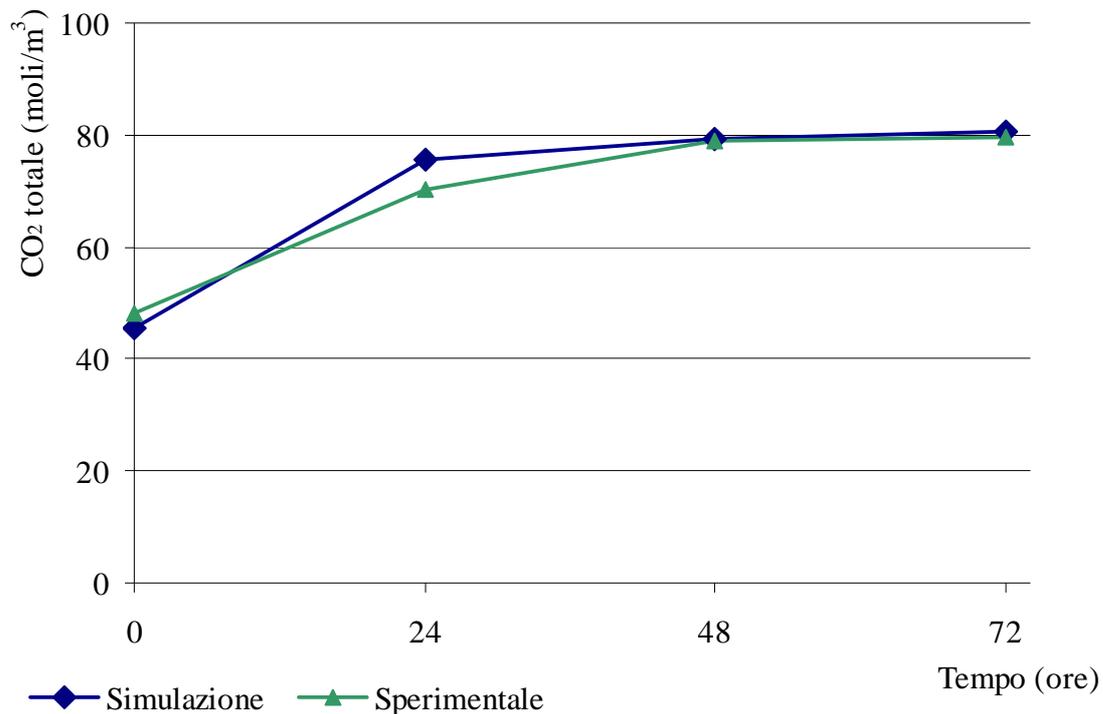


**Figura 8.10:** andamento della concentrazione media di anidride carbonica solubile, nei diversi costituenti dell'uovo, durante le 72 ore di trattamento in atmosfera satura di CO<sub>2</sub>.



**Figura 8.11:** andamento della concentrazione media di anidride carbonica totale, nei diversi costituenti dell'uovo, durante le 72 ore di trattamento in atmosfera satura di CO<sub>2</sub>.

Per quanto riguarda la validazione del modello, in figura 8.12 sono riportati i valori della concentrazione totale media di CO<sub>2</sub> determinata nell'albume al tempo 0, 24, 48 e 72 ore, rispettivamente tramite metodo sperimentale (verde) e simulazione numerica (blu). I valori relativi alla simulazione numerica sono stati determinati mediando i valori medi dell'albume denso e dell'albume liquido. Per tutti i tempi di trattamento, i valori simulati e sperimentali risultano essere in buon accordo.



**Figura 8.12:** valori sperimentali (verde) e valori simulati (blu) relativi alla concentrazione totale media di CO<sub>2</sub> presente nell'albume a 0, 24, 48, 72 ore di conservazione in atmosfera satura di CO<sub>2</sub>.

La letteratura scientifica riporta applicazioni di inversioni di modelli algebrici, differenziali alle derivate ordinarie o parziali ma non di inversione di sistemi di PDE, tuttavia l'inversione di un modello ad EF si è dimostrata una tecnica efficace nella determinazione dei coefficienti di diffusione della CO<sub>2</sub> nei componenti dell'uovo. Inoltre tale tecnica rappresenta una possibilità più economica e veloce rispetto a quelle correnti.

Lo sviluppo di un modello numerico del fenomeno diffusivo ha permesso di studiare il campo di concentrazione con un grado di dettaglio irraggiungibile dalle tecniche sperimentali. I risultati, in forma integrale, del modello si trovano in ottimo accordo con quelli osservati sperimentalmente.

La combinazione di metodi di simulazione numerica con metodi inversi, può rappresentare un nuovo paradigma nel settore delle misure fisiche in senso molto generale (fluidodinamiche, termiche, meccaniche, elettromagnetiche, ...).

## **Bibliografia**

Bin, X., & Da-Wen, S. (2002). Applications of computational fluid dynamics (CFD) in the food industry: a review. *Computers and Electronics in Agriculture*, 34, 5-24.

Brooks, J., & Pace, J. (1938) The distribution of carbon dioxide in the hen's egg, *Proceedings of the Royal Society of London, Biological Sciences* 126 , 196-210.

Chang, Y.I., Chen, T.C., Lee, G.H., & Chang, K. S. (1999). Rheological, surface and colorimetric properties of egg albumen gel affected by pH. *International Journal of Food Properties*. 2, 101-111.

Colombo, I., Grassi. Lapasin, M.R., Pricl, S. (1997) Determination of the drug diffusion coefficient in swollen hydrogel polymeric matrices by means of the inverse sectioning method *Journal of Controlled Release* 47, 305-314

Cotterill, O.J., & Gardner, F. (1956) Retention of interior shell egg quality with carbon dioxide., *Poultry Science* 35, 1138.

Da Silva, C.K.F, Da Silva, Z.E. & Mariani, V.C. (2009) Determination of the diffusion coefficient of dry mushrooms using the inverse method. *Journal of Food Engineering* 95, 1-10.

\* Fabbri, A., Cevoli, C., Cocci, E., & Rocculi, P. (2010) Determination of the CO<sub>2</sub> diffusion coefficient of egg components by FE model inversion. Inviato per pubblicazione al *Journal of food Engineering*

Fabbri, A. (2005) Applicazioni dei metodi di simulazione numerica nell'ingegneria agroalimentare. *Proceedings of AIIA meeting 2005*, Catania 27-30 June 2005

Gros, G., & Moll, W. (1974) Facilitated diffusion of CO<sub>2</sub> across albumin solution. *The Journal of General Physiology*. 64, 356-371

Healy, D.J., & Peter, A.M. (1925) The Hydrogen ion concentration and basicity of egg yolk and egg white. *American Journal Physiology* 74, 363-368

Hopmans, J.W., & Simunek, J., (1999) *Review of inverse estimation of soil hydraulic properties*. In: van Genuchten, M.Th., Leij, F.J., Wu, L. (Eds.), *Proceedings of the International Workshop, Characterization and Measurement of the Hydraulic Properties of Unsaturated Porous Media*. University of California, Riverside, CA, 713-72

- Jarny, Y., Maillet, D. (1999) *Problèmes inverses et estimation de grandeurs en thermique*. In: Cours C1A, Ecole d'Hiver METTI '99. Presses Universitaires de Perpignan, 1–50.
- Keener, K.M., LaCrosse, J.D, & Babson, J.K. (2001) Chemical Method for Determination of Carbon Dioxide Content in Egg Yolk and Egg Albumen *Poultry Science* 80, 983-987
- Keener, K.M., LaCrosse, J.D, Curtis, P.A., Anderson K.E, & Farkas, B.E. (2000) Gas Exchange into Shell Eggs From Cryogenic Cooling. *Poultry Science* 78, 275-280
- Keener, K.M., LaCrosse, J.D, Curtis, P.A., Anderson K.E, & Farkas, B.E. (2000) The Influence of Rapid Air Cooling and Carbon Dioxide Cooling and Subsequent Storage in Air and Carbon Dioxide on Shell Egg Quality. *Poultry Science* 79, 1067-1071
- Liang, Y., & Kristinsson, H.G. (2007). Structural and foaming properties of egg albumen subjected to different pH-treatments in the presence of calcium ions. *Food Research International*, 40, 668-678.
- Monteau ,J.Y. (2008) Estimation of thermal conductivity of sandwich bread using an inverse method *Journal of Food Engineering* 85,132–140
- Moran, T. (1937) Gas storage of eggs, *Journal of the Society for Industrial Chemistry* 56.
- Narushin, V.G. (1997) The avian egg: geometrical description and calculation of parameters, *Journal of Agricultural Engineering Research*. 68, 201-205.
- Nelder, J.A. and Mead, R. (1965) A simplex method for function minimization. *Computer Journal* 7, 308–313.
- Overfield, N.D., (1982) *Quality testing of eggs Reference Book* 428, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London
- Ritter, A., Hupet, F., Munoz-Carpena, R., Lambot, S., M., & Vanclooster, M. (2003) Using inverse methods for estimating soil hydraulic properties from field data as an alternative to direct methods. *Agricultural water management* 59, 77-96.

Rocculi, P., Tylewicz, U., Pękosińska, A., Romani, S., Sirri, F., Siracusa, V. , Dalla Rosa, M. (2009). MAP storage of shell hen eggs, Part 1. Effect on physico-chemical characteristics of the fresh product. *LWT – Food Science and Technology* 42, 758-762

Scott, G., & Richardson, P. (1997). The application of computational fluid dynamics in the food industry. *Trends Food Science Technology*, 8, 119-24

Simpson, R., Acevedo, C., & Almonacid, S. (200) Mass transfer of CO<sub>2</sub> in Map System: Advances for non-respiring foods. *Journal of food engineering*. 92, 233-239.

Simpson, R., & Cortes, C. (2004). An inverse method to estimate thermophysical properties of foods at freezing temperatures: apparent volumetric specific heat. *Journal of Food Engineering*, 64, 89–96.

Tarsitano, A. (1979) Alcune considerazioni sulle regressioni non lineari;  
<http://www.ecostat.unical.it/tarsitano/Publications/Textpubs/regnolin.pdf>

Yang, S. C., & Baldwin, R. E. (1995). Functional properties of eggs in food. In W. J. Stadelman, & O. J. Cotterill (Eds.), *Egg science and technology* (4th ed.). New York: Food Products Press.

Zueco, J., Alhama, F., & González Fernández, C. F. (2004). Inverse determination of the specific heat of foods. *Journal of Food Engineering*, 64, 347-353.

\* *L'articolo è diretta espressione dell'attività di ricerca illustrata nel precedente capitolo.*