



Università degli Studi di Sassari

Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Microbiche Agro-Alimentari
Dipartimento di Scienze Ambientali Agrarie e Biotecnologie Agro-Alimentari
Sezione di Tecnologie Alimentari

Prodotti dolciari freschi e da forno tipici: valutazione delle alterazioni microbiologiche, chimico fisiche e di texture e sviluppo di interventi tecnologici a basso impatto sulla tipicità per l'estensione della shelf life

Tutor:

Prof. Antonio Piga

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Giovanni Antonio Farris

Tesi di dottorato:

Dott.ssa Anna Maria Sanguinetti

Ciclo XXI, 2005-2008

Indice

<u>I - Introduzione</u>	<u>3</u>
1 - Premessa.....	3
2 - Atmosfera modificata.....	10
2.1 - Generalità.....	10
2.2 - Terminologia.....	11
2.3 - Principi.....	12
2.4 - Gas utilizzati.....	16
2.4.1 - Ossigeno.....	16
2.4.2 - Anidride Carbonica.....	18
2.4.3 - Azoto.....	23
2.4.4 - Argon e gas rari.....	24
2.5 - Miscele di gas.....	24
2.6 - Approvvigionamento di gas.....	25
2.7 - Macchinari utilizzati per il confezionamento.....	26
2.8 - Materiali per il confezionamento.....	28
2.9 - I controlli.....	29
2.10 - Prodotti conservati in atmosfera modificata.....	30
2.11 - Evoluzioni delle MAP: active packaging.....	33
<u>II.....</u>	<u>35</u>
1 - Premessa.....	35
<u>III.....</u>	<u>38</u>
1 - Introduzione.....	38
2 - Materiali e metodi.....	42
2.1 - Tecnologia di produzione.....	42
2.2 - Pastorizzazione.....	43
2.3 - Valutazione trattamento termico.....	46
2.3.1 - Analisi microbiologiche.....	46
2.3.2 - Analisi fisico-chimiche.....	52
2.3.3 - Analisi sensoriale.....	53
2.3.4 - Analisi del colore.....	53
2.4 - Confezionamento e conservazione.....	54
2.4.1 - Analisi microbiologiche.....	56
2.4.2 - Analisi fisico-chimiche.....	56
2.4.3 - Analisi sensoriale.....	56
2.4.4 - Analisi dei gas.....	57
2.4.5 - Analisi statistica.....	57
3 - Risultati e discussione.....	58
3.1 - Valutazione trattamento termico.....	58
3.1.1 - Pastorizzazione.....	58
3.1.2 - Analisi microbiologiche.....	59

3.1.3 - Analisi fisico chimiche.....	60
3.1.4 - Analisi sensoriale.....	60
3.1.5 - Analisi del colore.....	61
3.2 - Conservazione.....	62
3.2.1 - Analisi dei gas.....	62
3.2.2 - Analisi microbiologiche.....	62
3.2.3 - Analisi sensoriale.....	63
3.2.4 - Analisi fisico chimiche.....	64
4 - Conclusioni.....	65
<u>IV.....</u>	<u>67</u>
1. - Introduzione.....	67
2. - Materiali e metodi.....	70
2.1 - Tecnologia di produzione.....	70
2.2 - Confezionamento e conservazione.....	71
2.3 - Analisi.....	72
2.3.1 - Determinazioni microbiologiche.....	72
2.3.2 - Determinazioni chimico fisiche.....	75
2.3.3 - Determinazioni strutturali.....	76
2.3.4 - Determinazioni sensoriali.....	79
2.3.5 - Analisi dei gas.....	79
2.3.6 - Analisi statistica.....	80
3. - Risultati e discussione.....	81
3.1 - Analisi dei gas.....	81
3.2 - Determinazioni microbiologiche.....	81
3.3 - Determinazioni chimico-fisiche.....	83
3.4 - Determinazioni strutturali.....	84
3.5 - Determinazioni sensoriali.....	85
4. - Conclusioni.....	86
<u>V Tabelle</u>	<u>87</u>
<u>VI Figure</u>	<u>99</u>
<u>VII Bibliografia</u>	<u>121</u>
<u>Ringraziamenti</u>	<u>131</u>

I - Introduzione

1 - Premessa

Negli anni recenti la consapevolezza del ruolo delle risorse locali è cresciuta considerevolmente fra i ricercatori che si occupano dei processi di tale sviluppo. Non è difficile trovare tracce di questa consapevolezza: si pensi ad esempio ai programmi di sviluppo locale, i programmi di sviluppo regionale o i piani di sviluppo delle Comunità montane. La valorizzazione delle produzioni tipiche, tramite l'interazione del settore turistico, è divenuta una "parola d'ordine" molto diffusa.

Questo è imputabile alle deludenti politiche di industrializzazione del mezzogiorno e all'esigenza di trovare soluzioni diverse dalla grande industria di provenienza esterna, ma anche alla convinzione che le produzioni locali possano essere considerate un metodo di sviluppo alternativo. Infatti, le potenzialità di sviluppo delle produzioni tipiche sono oggi indubbiamente superiori che in passato per diversi motivi: prima di tutto negli anni recenti l'attenzione dei consumatori non locali per questo tipo di prodotti è aumentata considerevolmente; inoltre, la crescita del reddito e la maggiore disponibilità economica dei consumatori hanno attenuato l'incidenza di quello che ha rappresentato finora il principale problema di competitività dei prodotti tipici: il prezzo elevato, dovuto alle tecnologie produttive prevalentemente artigianali e alle piccole dimensioni delle imprese.

Hanno avuto importanza anche la maggiore mobilità della popolazione e lo sviluppo del turismo, che hanno stimolato l'interesse per culture diverse e per i prodotti ad esse legati.

Il principale effetto di questi mutamenti è l'apertura di nuovi spazi di mercato per cui da un lato è cresciuta la possibilità di superare i confini del mercato locale, troppo piccolo per sostenere un significativo processo di espansione di queste produzioni, dall'altro la domanda dei mercati esterni è cambiata favorevolmente, privilegiando la tipicità e la qualità dei prodotti rispetto al prezzo.

Le produzioni radicate nella cultura locale possono rappresentare un tassello importante dello sviluppo socio-economico del mezzogiorno; gli aspetti più importanti che potrebbero essere presi in considerazione sono due: l'ampliamento dei mercati e l'innovazione tecnologica (nonché la loro interazione).

Per sostenere la crescita produttiva è necessario, quindi superare i confini e aprire sbocchi su mercati più ampi, nazionali e internazionali, dove la specificità dei prodotti e la loro differenziazione, rispetto a quelli locali, possono essere un fattore di competitività. Bisogna tenere presente che quando si parla di ampliamento dei mercati, non si intende riferirsi a produzioni di massa, infatti i mercati di questi prodotti rimangono fondamentalmente di nicchia.

Per quanto riguarda l'innovazione tecnologica i settori che stiamo considerando si basano su tecnologie tradizionali specifiche dell'ambiente

locale. Questo aspetto per alcuni è un punto di forza, soprattutto quando il prodotto è di elevata qualità, ma non sempre è compatibile con l'ampliamento dei mercati. Produrre per mercati più vasti significa spesso dover aumentare la scala di produzione e garantire una continuità delle forniture che le tecnologie tradizionali non sempre consentono. L'innovazione non è sempre conciliabile con la tradizione, nel senso che può causare alterazioni delle caratteristiche del prodotto che ne riducono la competitività. Il problema dell'innovazione in questi settori è quindi molto delicato e presuppone una conoscenza approfondita delle problematiche di mercato.

Partendo da questo presupposto, bisogna tenere presente che la struttura produttiva è molto polverizzata in un numero elevato di microimprese, spesso costituite da un solo addetto o comunque a carattere familiare. In questo contesto, la mancanza di cooperazione tra le imprese è molto importante, non tanto perché la cooperazione accresce l'efficienza complessiva del sistema locale, quanto perché il mercato locale non ha dimensioni sufficienti a sostenere una crescita soddisfacente di questi settori e, per di più, quando una microimpresa cerca di superare i confini incontra difficoltà insormontabili. Anche se un'impresa dispone di un prodotto di qualità deve farlo conoscere ai consumatori e i costi di marketing possono essere molto sostenuti. Inoltre si ha spesso a che fare con intermediari, come nel caso della grande distribuzione, che godono di un forte potere di mercato. Si crea così una situazione per cui non si

riesce a spuntare sul mercato un buon ricavo, in quanto l'intermediario si appropria di una buona parte del margine fra prezzo, consumo e costo di produzione. D'altra parte, la grande distribuzione rappresenta una fetta talmente importante del mercato che non può essere trascurata, anche quando si tratta di prodotti di nicchia.

Infine, bisogna prendere in considerazione il fatto che la domanda di beni tipici spesso supera le potenzialità produttive della piccola impresa. Alcune realtà locali (distretti industriali del nord Italia) hanno ovviato a questo problema, grazie alla collaborazione fra le imprese, permettendo a sistemi piccoli di essere competitivi sui mercati globali.

Nella realtà sarda, in genere, la cooperazione è notoriamente difficile, non solo per via dei ben noti problemi di mancanza di fiducia e di individualismo diffuso, bensì per precise ragioni economiche. Se esistono differenze qualitative fra i prodotti di imprese diverse che operano all'interno di uno stesso marchio collettivo si creano le condizioni per comportamenti opportunistici. Quando il prodotto è locale il consumatore conosce il produttore di qualità ed è in grado di distinguerlo dagli altri, quando il mercato si amplia il consumatore tende ad identificare il prodotto con il territorio di origine e a valutarne la qualità sulla base delle informazioni che quest'ultimo convoglia. La valutazione in questo caso interessa tutte le imprese operanti in quel particolare territorio. Aumenta quindi per le singole imprese l'incentivo ad abbassare la qualità e i costi e mantenere il prezzo alto, sfruttando la reputazione collettiva ma, nello

stesso tempo, danneggiandola. Ciò spiega perché la cooperazione nel marketing o l'adesione ad un marchio collettivo sono vissuti da alcune imprese come una grave minaccia alla propria competitività. La scarsa disponibilità alla cooperazione è rafforzata dal carattere fortemente competitivo del mercato locale.

La cooperazione è quindi difficile da attuare, ma allo stesso tempo è una condizione importante per l'ampliamento dei mercati. Una possibile soluzione potrebbe essere quella di spingere alla cooperazione non tutte le imprese ma selezionare solo quelle di qualità.

Se l'entrata sui mercati esterni è così difficile, il mercato turistico potrebbe essere una soluzione alternativa. In effetti, il mercato turistico è "spazialmente vicino", nel senso che può essere raggiunto con costi di trasporto e di marketing accessibili anche a imprese di dimensioni molto piccole. Esso è indubbiamente molto importante e le connessioni fra mercato turistico e produzioni tipiche sono state al centro di programmi di sviluppo incentrati sul turismo rurale. L'esperienza ha comunque mostrato che la domanda turistica non sostituisce completamente i mercati esterni (basta pensare che è limitata a pochi mesi all'anno), può facilitarne piuttosto la penetrazione perché i turisti hanno preferenze legate alla cultura di appartenenza ed esprimono quindi tipologie di domanda diverse da quella locale e vicine a quelle dei mercati dai quali provengono. Inoltre i turisti rappresentano un importante veicolo di marketing perché

contribuiscono a diffondere la conoscenza dei prodotti locali nei luoghi di residenza.

Per quanto riguarda l'aspetto relativo all'innovazione tecnologica, in generale si parte dalla considerazione che la competitività dipende dalla tecnologia o meglio competitività significa saper fare qualcosa che gli altri non sanno fare, il che equivale a dire che bisogna disporre di conoscenze esclusive che i concorrenti potenziali non possiedono. Perché lo sviluppo abbia luogo è necessario un processo di fertilizzazione del sapere locale che deve combinarsi con stimoli e apporti esterni. Questo è valido anche per i prodotti tipici, perché tipicità non significa immobilità nel tempo, al contrario la tradizione si è continuamente evoluta e rinnovata nella storia. La crescita della conoscenza è il frutto della contaminazione dell'identità locale e della commistione fra conoscenze tacite e codificate. Un esempio eclatante per la Sardegna è il settore enologico che nell'ultimo ventennio del secolo scorso ha registrato uno straordinario miglioramento qualitativo passando dalla produzione prevalente di vino da taglio a vini di elevata qualità, capaci di affermarsi in importanti competizioni internazionali. Questo risultato è stato possibile grazie alla connessione di conoscenze esterne (introdotte da enologi provenienti da aree di grande tradizione vinicola come nuove conoscenze sulla fermentazione, sull'invecchiamento ecc.) con competenze locali sulle specifiche caratteristiche dei vitigni e dei terreni.

Tuttavia, le situazioni sono molto diverse e un approccio generico a questi problemi può essere dannoso. Non sempre innovazione e competitività si muovono nella stessa direzione. In alcuni casi l'abbandono delle tecniche tradizionali o l'utilizzo di altre più moderne non comporta mutamenti sostanziali nelle caratteristiche qualitative del prodotto e nella sua specificità, in altri può derivarne un miglioramento della qualità come nel caso del vino.

In conclusione, l'innovazione tecnologica è importante ma non deve essere stimolata con politiche generiche di incentivazione finanziaria che favoriscono una indiscriminata meccanizzazione, e spesso si risolvono in uno scambio fra qualità e abbattimento dei costi. Politiche dell'innovazione non mirate potrebbero causare l'abbassamento della qualità e compromettere il posizionamento del prodotto sul mercato. Occorrono, invece, politiche mirate capaci di affrontare caso per caso le specifiche problematiche che variano, non solo da settore a settore, ma da prodotto a prodotto. La collaborazione tra imprese e centri di ricerca agroalimentare è cruciale da questo punto di vista se guidata dal criterio: "innovare nel rispetto della tradizione".

2 - Atmosfera modificata

2.1 - Generalità

Per atmosfera modificata si intende la sostituzione dell'aria a contatto con gli alimenti con un'appropriata miscela gassosa, al fine di prolungarne la conservazione. È una tecnica nota da decenni che tuttavia, negli ultimi anni, ha registrato un interesse sempre crescente e applicazioni sempre più varie.

Il primo esempio applicativo di atmosfera modificata si ebbe nel 1927, dove venne utilizzata per stoccare le mele in ambiente ad ossigeno ridotto e ad alta concentrazione di anidride carbonica (Kidd & West, 1927). Nel 1930 tale tecnica venne usata su larga scala per il trasporto di frutta nelle navi e, successivamente venne estesa anche al trasporto della carne. In Europa l'atmosfera modificata, per piccole confezioni, venne introdotta per la prima volta nel Regno Unito nel 1979 da Marks e Spencer.

Il confezionamento in atmosfera modificata (*Modified Atmosphere Packaging* MAP) costituisce l'estremo sviluppo del confezionamento in pellicola plastica. Ad esso si è arrivati attraverso il confezionamento sottovuoto che, pur risolvendo una serie di problematiche legate alla conservazione degli alimenti, presenta ancora oggi qualche svantaggio. La mancanza di ossigeno può creare problemi di imbrunimento delle carni (specialmente quelle rosse, che tendono ad assumere un colore rosso mattone spento, dovuto alla formazione di metamioglobina) e il vuoto fa

aderire strettamente la pellicola plastica al prodotto, lo schiaccia, e lo rende a volte commercialmente non troppo presentabile.

Per risolvere questi ed altri problemi gli istituti di ricerca e la produzione hanno ritenuto necessario ricercare sistemi alternativi capaci di elevare le performances delle pellicole e nel contempo di ottimizzare il livello di conservazione degli alimenti. Gli studi approdarono ad una tecnica che consente quindi di estrarre l'aria normale dal contenitore e di sostituirla con uno o più gas scelti appositamente, da soli o in miscela per creare a ridosso dell'alimento una "nuova atmosfera" diversa dall'aria.

2.2 - Terminologia

Il confezionamento in atmosfera modificata (MAP) o atmosfera protettiva è stato più volte descritto erroneamente come sinonimo di confezionamento in atmosfera controllata (CAP) o stoccaggio (CAS). La MAP è definita come "il confezionamento di un prodotto deperibile in un'atmosfera che è stata modificata in modo che la sua composizione sia diversa da quella dell'aria". Questo è in contrasto con il CAS che include il mantenimento di una precisa e definita atmosfera nella camera di stoccaggio, ed il confezionamento sottovuoto che è il confezionamento di un prodotto in un imballaggio ad alta barriera da cui è stata rimossa l'aria. Il CAP può essere considerato come simile al MAP, in quanto è tecnicamente impossibile o irrealizzabile mantenere l'atmosfera originale

intorno al prodotto una volta che esso è sigillato all'interno di una confezione.

2.3 - Principi

Il confezionamento in atmosfera modificata consente in generale di estendere la shelf life degli alimenti, ovvero prolungare la conservazione della loro qualità rallentando quei meccanismi chimici e biologici che sono alla base del deterioramento dell'alimento stesso. L'effetto desiderato è sempre ottenuto applicando congiuntamente alla modificazione dell'atmosfera vari altri interventi quali la refrigerazione, il controllo igienico, l'uso eventuale di additivi ecc.

Intendendo per shelf life il periodo di tempo corrispondente ad una tollerabile diminuzione della qualità di un alimento confezionato, si può ritenere che esista una sostanziale identità fra shelf life dell'alimento e shelf life dell'atmosfera nella confezione; in altre parole è ragionevole considerare garantita la conservabilità dell'alimento fino a che la composizione dell'atmosfera introdotta al momento del confezionamento rimane invariata o meglio varia entro valori accettabili.

In Italia il confezionamento degli alimenti in atmosfere prodotte artificialmente dall'uomo e che hanno una composizione differente da quella dell'aria è regolamentato dal decreto del Ministro della Sanità del 16 marzo 1994, n. 266 ("Regolamento concernente le norme igienico-

sanitarie relative al confezionamento in atmosfera modificata di determinati prodotti alimentari”), oltre che dai decreti ministeriali 49/1988 e 209/1996.

La dicitura “atmosfera protettiva” è stata introdotta dal legislatore con il DPCM 311/1997, intendendola dunque come conservazione mediante l’impiego di gas d’imballaggio consentiti. Tali prodotti devono riportare in etichetta la dicitura “Confezionato in atmosfera protettiva”. Si afferma inoltre, che l’uso della MAP non deve essere concepito nell’ottica di risanare il prodotto o di migliorarne le caratteristiche qualitative, ma è un’operazione tecnologica da abbinare ad ulteriori trattamenti (come la refrigerazione) per aumentarne la durata.

La direttiva 95/2/CEE sugli additivi già recepita in Italia ha definito i gas di imballaggio (Tab. 1). Quelli più comunemente utilizzati sono l’N₂, la CO₂, l’O₂, mentre l’He è utilizzato come tracciante per il controllo dell’ermeticità delle confezioni attraverso l’utilizzo della spettrometria di massa; l’argon presenta caratteristiche di inerzia analoghe a quelle dell’azoto unite, però, ad un peso molecolare più elevato e ad una solubilità in acqua circa doppia. Il protossido di azoto N₂O è invece utilizzato come propellente per schiume erogabili (es. panna e succedanei) in quanto, per le sue proprietà di solubilità, è in grado di sciogliersi sia nella fase acquosa che in quella grassa della composizione cremosa; per lo stesso motivo, quando il prodotto fuoriesce attraverso la valvola della bomboletta, la maggior parte del gas sfugge all’emulsione gonfiando così la crema che diventa una

schiuma voluminosa. Il primo obiettivo delle atmosfere modificate impiegate per il confezionamento degli alimenti è quasi sempre l'eliminazione dell'ossigeno. Infatti, le ossidazioni a carico di costituenti sensibili dell'alimento possono portare a fenomeni indesiderati come la comparsa di gusti/odori anomali, imbrunimenti e modificazioni del colore, irrancidimento dei grassi; inoltre molti microrganismi alterativi (muffe) sono strettamente aerobi. Naturalmente, l'eliminazione dell'O₂ si può ottenere anche mediante l'applicazione del vuoto con lo svantaggio di sottoporre il prodotto a forti compressioni durante l'evacuazione dell'aria. Ad esempio, i prodotti da forno vengono deformati, le fette di carne e formaggio sono deformate e difficili da separare per il consumatore, inoltre le carni perdono una porzione acquosa che comporta una riduzione del valore nutrizionale del prodotto, oltre a modificazioni strutturali. Tutte queste controindicazioni possono essere evitate senza perdere il vantaggio di eliminare l'ossigeno a contatto con l'alimento, ovvero senza ridurre la shelf life, utilizzando un gas inerte per eguagliare la pressione nella confezione a quella esterna.

Una delle variabili più importanti da considerare è la sensibilità del prodotto nei confronti dell'ossigeno, cioè la quantità di ossigeno che il prodotto può tollerare senza che si verifichi un'apprezzabile variazione sensoriale (Salame, 1974).

I limiti di tolleranza all'O₂ per molti alimenti sono molto piccoli. In alcuni casi quando lo spazio "vuoto" all'interno della confezione è molto ampio o

quando un prodotto contiene grosse quantità di aria nelle sue cavità interne (es. prodotti in polvere ovvero prodotti da forno che trattengono l'aria all'interno della loro matrice porosa), la quantità totale di O₂ presente nella confezione può eccedere il limite di tolleranza per l'alimento. Comunemente, molti liquidi alimentari sono stoccati e poi imbottigliati/confezionati in condizioni di saturazione con O₂ (all'aria), pertanto è importante sapere se la solubilità dell'O₂ nel prodotto è più alta o più bassa del limite di tolleranza; quando infatti, la solubilità dell'O₂ si avvicina al limite di tolleranza, qualunque ulteriore introduzione di O₂ (ad esempio per diffusione attraverso il packaging) deve essere prevenuta. Per le polveri lo spazio vuoto in una confezione può contenere, a seconda della densità apparente, decine o centinaia di volte più O₂ per unità di volume, rispetto ad un uguale volume di acqua alla stessa pressione parziale di O₂ dell'aria. Quindi anche in questo caso è spesso necessario ridurre la quantità di O₂ presente nella confezione, ad esempio sostituendo l'aria con un gas inerte. Quando la quantità di O₂ presente nella confezione supera il limite di tolleranza, la velocità con la quale l'O₂ è consumato (espressa ad esempio in ng di O₂ per grammo di prodotto all'aria) per respirazione, ossidazione o metabolismo, varia fortemente da prodotto a prodotto e non è sempre funzione lineare della pressione parziale di O₂ presente. I prodotti che presentano un'elevata resistenza alla diffusione (perché compatti) sono particolarmente esposti all'azione dell'O₂ perché può essere sufficiente il superamento del limite di tolleranza

sulla sottile superficie esterna per determinare danni sensoriali avvertibili, mentre per i liquidi a bassa viscosità lo stesso effetto è avvertito più tardi perché la diffusione dell'O₂ in tutto il volume dell'alimento rallenta la cinetica della degradazione.

2.4 - Gas utilizzati

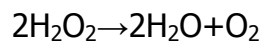
L'aria che respiriamo è normalmente costituita da circa il 21% di ossigeno, il 78% di azoto ed il restante 1% da gas minori, tra i quali l'anidride carbonica è presente per meno dello 0,05%. I tre principali gas utilizzati in atmosfera modificata sono l'ossigeno, l'azoto e l'anidride carbonica da soli o combinati. I gas nobili sono usati commercialmente per una larga serie di prodotti anche se la letteratura è molto limitata sulla loro applicazione e sui loro benefici (Spencer, 2003).

2.4.1 - Ossigeno

L'ossigeno, in concentrazioni superiori a quelle atmosferiche, viene utilizzato fin dal 1976 per mantenere il colore rosso vivo delle carni grazie alla formazione di ossimioglobina, soprattutto in associazione con l'anidride carbonica che tende invece a scurirle. Generalmente la presenza di ossigeno per il mantenimento del colore non è necessaria nel caso del confezionamento di carni bianche, tuttavia nel caso di porzioni di carni bianche prive di pelle (ad esempio pollo porzionato anziché intero) l'uso di

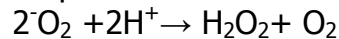
miscele gassose arricchite con ossigeno può migliorare il colore del prodotto. L'ossigeno ad elevate pressioni parziali è tossico per tutte le cellule viventi in quanto ossidante per eccellenza. Fra i meccanismi di protezione dall'azione tossica dell'ossigeno sviluppati dai microrganismi, rientrano le attività di due enzimi:

Catalasi



(eventualmente 1 mol H_2O_2 è sostituibile da un substrato ossidabile)

Superossidodismutasi



Normalmente i microrganismi anaerobi obbligati non posseggono né il primo né il secondo enzima e pertanto l'ossigeno risulta per essi tossico anche a basse concentrazioni. L'assenza di ossigeno può anche facilitare la crescita e la produzione di tossine da parte di microrganismi patogeni (Finn *et al.*, 1997). A tal riguardo è stato proposto l'impiego di ossigeno nelle confezioni ermetiche per prevenire lo sviluppo di *Clostridium botulinum* ma questo aspetto merita seri approfondimenti visto che è stata documentata la presenza di tossina botulinica di tipo E in prodotti ittici mantenuti a 22°C in presenza del 25% di O_2 e 60% CO_2 , e perfino a 4°C con atmosfera del 100% CO_2 , prima che si verificano alterazioni organolettiche apprezzabili.

Riguardo a frutta e verdure, livelli eccessivamente bassi di ossigeno comportano situazioni di respirazione anaerobica con sviluppo di cattivi odori. In special modo le verdure tagliate presentano livelli di respirazione

molto elevati, infatti tagli praticati nei tessuti vegetali lasciano estese superfici danneggiate a seguito della rottura delle pareti cellulari e della compartimentazione subcellulare degli enzimi. In risposta a questi stress si ha un incremento della velocità di respirazione che può essere controllato negli effetti negativi solo abbinando l'uso di un'appropriata atmosfera (tipicamente O₂ 3-10%; CO₂ 3-10%), al mantenimento di condizioni di refrigerazione e all'uso di un materiale di imballaggio con idonee caratteristiche di permeabilità (Exama *et al.*, 1993).

In modo analogo, nel caso del confezionamento del pesce può essere importante mantenere un elevato tenore di ossigeno (es. O₂ 30-40%, CO₂ 60-70%) per ritardare la formazione di trimetilamina che è il principale responsabile del cattivo odore di pesce e che si sviluppa per riduzione del trimetilamina-ossido (il maggior costituente della frazione di azoto non proteico nei teleostei marini) nel metabolismo fermentativo dei microrganismi psicrotrofi ubiquitari dei pesci marini (Boskou & Debevere, 1997).

2.4.2 - Anidride Carbonica

Nel contesto dei gas presenti sia nelle atmosfere modificate che in quelle controllate, l'anidride carbonica riveste indubbiamente un interesse preminente. Fra i principali effetti esercitati sui vegetali si ha l'inibizione della respirazione e il rallentamento della maturazione (inibizione degli

ormoni della crescita, la riduzione dei danni da freddo dei tessuti vegetali, l'inibizione dell'idrolisi delle pectine). Infatti, un'atmosfera ricca di anidride carbonica, inibendo o bloccando la respirazione, rallenta anche la produzione di etilene e degli altri ormoni della crescita. Ad elevate concentrazioni l'anidride carbonica evita anche la degradazione della clorofilla. L'effetto delle atmosfere modificate sulla respirazione di frutta e vegetali dipende fortemente dall'anatomia e morfologia della pianta. Tuttavia per evitare dismetabolismi e difetti, per molti vegetali bisogna utilizzare atmosfere non troppo ricche di CO₂ (Baker *et al.*, 1988).

L'anidride carbonica presenta discreta solubilità sia in acqua che in etanolo/grasso, cioè sia su matrici polari che apolari, la quale aumenta al diminuire della temperatura, sebbene in modo non lineare. I migliori risultati si ottengono pertanto utilizzando la CO₂ unita a condizioni di refrigerazione. In soluzione acquosa a pH<8 l'anidride carbonica si idrata lentamente ad acido carbonico, il quale è presente in equilibrio con le sue forme dissociate:



Nelle normali condizioni fisiologiche è più rilevante la prima dissociazione (equazione 2) infatti, la concentrazione di carbonato è praticamente

trascurabile, d'altro canto l'effetto batteriostatico esercitato dall'anidride carbonica può essere in gran parte ascritto alla presenza in forma indissociata di acido carbonico in quanto è ben nota la maggiore attività antimicrobica degli acidi deboli nella loro forma indissociata.

Anche se la dissociazione determina un modesto abbassamento del pH, essa può esercitare effetti sensoriali indesiderati su alcuni alimenti. L'uso di eventuali percentuali di CO₂ con prodotti nei quali il gas presenta un'elevata solubilità può comportare, inoltre una contrazione del volume gassoso, variazioni nella composizione gassosa e deformazioni o collasso vero e proprio della confezione.

L'anidride carbonica si può legare al residuo aminico di alcuni aminoacidi alterando la funzionalità di alcune proteine (alterazioni dell'attività enzimatica, denaturazione); fenomeno questo che, assieme alla reversibilità e lentezza della reazione, può spiegare "l'effetto residuo", cioè la capacità batteriostatica che permane anche dopo aver tolto l'alimento dalla confezione per qualche tempo (Silliker, 1980).

Anche a livello di membrana, questo fenomeno può operare una certa alterazione delle caratteristiche di permeabilità, infatti si ipotizza che l'anidride carbonica determini una redistribuzione dei lipidi all'interfaccia con l'ambiente esterno ostacolando, per le sue proprietà lipofile, il passaggio della fase costituita dagli acidi grassi dallo stato di gel a quello liquido-cristallino (Enfors *et al.*, 1978).

L'anidride carbonica determinerebbe un irrigidimento della membrana opponendosi ai movimenti dei fosfolipidi delle proteine di trasporto.

Questa ipotesi non spiega però il fatto che spesso i microrganismi risentono dell'azione dell'anidride carbonica solo nella fase di latenza, mentre una modificazione delle proprietà di trasporto della membrana dovrebbe influenzare tutte le fasi di crescita (Zee *et al.*,1984).

Essendo un gas pesante, l'anidride carbonica tende (analogamente ai gas nobili più pesanti) a rimuovere l'ossigeno dai siti reattivi dell'alimento. Questo potrebbe spiegare l'allungamento della fase di latenza (lag-fase) comunemente osservato negli studi sulla crescita microbica. In altri casi si osserva invece un allungamento del tempo di duplicazione. In ogni caso l'azione batteriostatica pare essere ascrivibile a processi di soluzione dei lipidi di membrana, a modificazioni dei sistemi proteici di superficie e ad alterazioni della permeabilità ionica, piuttosto che all'acidificazione. Recentemente è stata prospettata l'inibizione di alcuni enzimi microbici come isocitrato e malato decarbossilasi e la succinato deidrogenasi, con conseguente blocco del ciclo di Krebs, mentre il piruvato proveniente dalla via glicolitica può subire decarbossilazione con sviluppo di etanolo o acetaldeide, i quali influenzano negativamente le caratteristiche organolettiche del prodotto (Piergiovanni & Fava , 1986).

Il principale effetto sulla crescita di batteri aerobi si manifesta con un aumento nella fase di latenza e una riduzione della velocità di sviluppo

all'aumentare della concentrazione di anidride carbonica utilizzata (Gill & Tan, 1980).

Inoltre la combinazione di alte percentuali di CO₂ con alte % di O₂ (ad esempio 30/50) ritarda la crescita sia di microrganismi anaerobi, sia aerobi.

Gli ifomiceti risultano abbastanza sensibili all'anidride carbonica ma alcune specie ne risentono solo parzialmente, mentre il comportamento dei lieviti è variabile e mostrano sensibilità solo in assenza di ossigeno. È stato osservato, impiegando atmosfere modificate, che concentrazioni di CO₂ inferiori al 20% sono spesso inefficaci per bloccare la produzione di micotossine. Infatti la produzione di aflatossine da parte di *Aspergillus flavus* è progressivamente inibita a partire da tale concentrazione di CO₂, analogamente alla produzione di patulina da parte di *Penicillium patulum*. La produzione di ocratossina da parte di *Aspergillus ochraceus* viene bloccata a partire dal 30% di CO₂, mentre quella di tricotecene di *Fusarium tricinctum* viene ridotta solo in presenza del 50% e bloccata, assieme alla crescita del micete, al disopra del 60% di CO₂.

Questi dati dimostrano la necessità dell'impiego di elevate concentrazioni di CO₂ quando si voglia prevenire specificatamente queste contaminazioni.

2.4.3 - Azoto

Nelle atmosfere modificate in senso lato l'azoto è uno dei gas più comuni, spesso usato solo per completare la formula di varie miscele data la sua inerzia. Per la scarsa solubilità, la sua presenza nell'atmosfera modificata può prevenire il collasso delle confezioni nel caso in cui vengano impiegate elevate quantità di CO₂, che invece risulta essere molto solubile in acqua e grassi. L'azoto esplica una scarsa o nulla attività antimicrobica: i microrganismi anaerobi facoltativi crescono ugualmente bene nell'aria o sotto azoto; tuttavia, secondo altri autori, l'azoto sembra comunque stimolare lo sviluppo della microflora anaerobia e anaerobia facoltativa, come confermato dall'aumento della velocità di crescita logaritmica di *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica* ed *Escherichia coli* (Piergiovanni & Fava, 1986). Altri Autori hanno attribuito all'azoto un elevato potere inibente nei confronti dei lieviti e muffe, indipendentemente dalla temperatura di conservazione (Simard *et al.*, 1983) anche se è noto che alcune muffe riescono a svilupparsi in un ambiente saturo di azoto. L'azoto sembra esercitare anche un'azione inibente su enzimi come proteasi e lipasi (Piergiovanni & Fava, 1986). L'azione inibente esercitata sugli enzimi proteolitici può ovviamente evitare la degradazione delle proteine e in tal modo ridurre i fenomeni di essudazione di liquido durante la conservazione dei prodotti carnei (Lee *et al.*, 1985).

2.4.4 - Argon e gas rari

L'argon, e anche gli altri gas nobili più pesanti, presentano rispetto all' N_2 e all' O_2 maggiore solubilità e densità. Potrebbero pertanto essere utilizzati nella composizione di atmosfere modificate non convenzionali con l'intento di sostituirli all' N_2 , quali gas più efficienti per la rimozione dell'ossigeno dai siti del prodotto. Ricercatori francesi hanno misurato la velocità di crescita di lieviti condizionati in atmosfere ottenute con questi gas, riscontrando una riduzione della velocità della crescita, correlabile al PM (alla densità? Il PM non è la densità) del gas considerato (Schvester, 1991). Alcuni autori hanno ipotizzato un meccanismo di competizione con l' O_2 a livello enzimatico visto che l'Ar presenta solubilità e diametro molecolare simili (Carcano et al., 1994).

2.5 - Miscele di gas

La scelta della miscela di gas dipende dal tipo di alimento e dai suoi meccanismi di deterioramento. Dove il deterioramento è prevalentemente microbico è opportuno scegliere livelli di anidride carbonica elevati, senza superare però i limiti di tolleranza, in quanto concentrazioni eccessive causerebbero altre problematiche (es. collassamento delle confezioni). Miscele di gas tipiche per questi alimenti sono rappresentate da 30% a 80% di CO_2 e da 20% a 70% di N_2 . Negli alimenti in cui il deterioramento è prevalentemente ossidativo si utilizzano

normalmente miscele di N₂ (da 0 a 100%) e CO₂ (60-80%) (Robertson, 2005).

2.6 - Approvvigionamento di gas

Tutti i principali produttori di gas tecnici forniscono prodotti di qualità (gas ad elevata purezza), spesso in contenitori dedicati all'uso specifico. Le forme di stoccaggio sono di diverso tipo a seconda dei volumi richiesti:

- bombole per gas compressi (200 bar di pressione di carico) con capacità di 40-50 l;
- pacchi bombole (200 bar di pressione di carico) con capacità di 800-1000 l;
- bidoni, serbatoi e contenitori per gas liquefatti (anidride carbonica ed azoto) di capacità variabile tra 5 e 300 l (1,5 bar di pressione di carico).

La scelta del sistema di approvvigionamento (compressore o liquefatto) è in funzione dei consumi e della logistica dell'azienda utilizzatrice, è quindi una scelta di tipo tecnico economico. I contenitori devono per legge essere mantenuti all'esterno del fabbricato dove è posta la macchina confezionatrice. E' opportuno prestare molta attenzione alle caratteristiche ed alla manutenzione di tubazioni e accessori per evitare costose perdite

di gas e possibili contaminazioni e danneggiamenti degli alimenti confezionati.

2.7 - Macchinari utilizzati per il confezionamento

Diverse sono le apparecchiature utilizzate per eseguire il confezionamento in MAP. Fra queste sono incluse le confezionatrici "gas flushing", che rientrano nella categoria delle FFS (*Form Fill Seal*), orizzontali e verticali. In queste macchine un tubo di alimentazione dei gas si inserisce in una struttura cilindrica costituita dal film precedentemente arrotolato su una bobina. Tale tubo insuffla all'interno del film l'atmosfera precedentemente preparata che sostituisce l'aria presente. Queste macchine portano ad una progressiva diluizione dell'aria nell'atmosfera e non garantiscono quasi mai una completa eliminazione dell'ossigeno atmosferico. A volte prevedono delle modificazioni al sistema saldante per garantire un più lungo tempo di saldatura e quindi una maggiore sicurezza di ermeticità. Questo tipo di confezionamento non è indicato per prodotti porosi, per la difficile rimozione dell'aria contenuta nel prodotto stesso. Le macchine più diffuse sono però quelle che derivano dalle confezionatrici "sottovuoto compensato" e che teoricamente possono suddividersi in macchine "a campana" e "termoformatrici". Nelle prime, la confezione (generalmente una busta o un sacchetto) viene posta sotto vuoto e poi riempita con la miscela di gas, realizzando il ciclo di

riempimento anche più di una volta. Tali macchine possono essere manuali, automatiche e semiautomatiche, da banco o carrellate. Le seconde sono macchine termoformatrici sotto-vuoto; da una sfoglia di laminato plastico piuttosto spessa si forma una vaschetta che viene riempita con il prodotto. La vaschetta viene evacuata dalla macchina e riportata a pressione atmosferica per l'introduzione dell'atmosfera modificata. Di solito le confezioni così ottenute sono costituite da una base in PVC-PE semirigida che viene coperta con il film plastico. Tale tecnica normalmente viene utilizzata per la carne fresca e cotta, per il pesce, per i prodotti da forno, per i formaggi e per le nocciole. È essenziale che queste macchine possiedano dispositivi di controllo per evitare che una mancanza di gas nelle linee porti a prodotti difettosi, e sistemi di controllo per il livello di ossigeno residuo o meglio per la composizione globale dell'atmosfera prodotta.

Per l'atmosfera modificata sono utilizzate spesso anche le termosigillatrici manuali dove le vaschette possono contenere anche liquidi di governo, oppure le chiuditrici automatiche in linea per vaschette preformate usate nel ramo della ristorazione collettiva.

Esistono inoltre sistemi di confezionamento detti *bag-in-box*, in cui il sacchetto chiuso con il prodotto viene inserito nella macchina che esegue prima il vuoto e poi il riempimento con la miscela di gas voluta.

Ricordiamo poi il sistema *Flavaloc*: in questo caso si utilizza un metodo di saldatura che tende il film sopra la confezione; la miscela gassosa viene insufflata tra la base preformata ed il film prima della fase di chiusura.

2.8 - Materiali per il confezionamento

Per confezionare un alimento sotto vuoto o in atmosfera protettiva si impiegano quasi sempre pellicole, vaschette plastiche multistrati e/o metallizzate che, per la loro flessibilità, si adattano bene a seguire i contorni del prodotto alimentare da conservare. Per ottenere buoni risultati di conservazione, bisogna però che il materiale di confezionamento, qualunque esso sia, possieda determinati requisiti:

Buona resistenza alle sollecitazioni fisiche e meccaniche. Dipende sia dai materiali che formano la pellicola sia dallo spessore complessivo. In genere, i materiali più validi hanno una buona resistenza alle escursioni termiche, non devono accartocciarsi o diventare fragili con il congelamento, né sciogliersi se esposti ad alte temperature (per i prodotti *ready-to-use* da cuocere direttamente in forno a microonde non si usano mai materiali a basso punto di fusione quali PVC e suoi poliaccoppiati).

Buona impermeabilità ai gas ed al vapore acqueo. Forse è il requisito più importante di ogni buona pellicola plastica. Un materiale qualsiasi può, infatti, essere estremamente resistente alle sollecitazioni meccaniche, ma se non è sufficientemente impermeabile ai gas non è possibile utilizzarlo

per mettere un alimento sotto vuoto o in atmosfera protettiva (ad eccezione dei vegetali freschi). Questa impermeabilità (misurata in mm³ di ossigeno che filtrano attraverso 1 m² di pellicola in 24 ore, a temperatura di 22°C a pressione ambiente) dipende sia dalla porosità del materiale che dalle condizioni di temperatura, umidità e pressione atmosferica presenti nei locali di conservazione.

Innocuità per il consumatore. È implicito che tutti i materiali destinati a venire a contatto con sostanze alimentari non devono cedere al substrato composti potenzialmente pericolosi per il consumatore e neppure odori o sapori impropri. Esistono ormai moltissime industrie che forniscono pellicole plastiche e altri materiali di confezionamento esplicitamente ideati per le atmosfere protettive.

2.9 - I controlli

Uno dei principali problemi che deve affrontare il responsabile di una linea di confezionamento in atmosfera modificata è quello di controllare la reale composizione dell'atmosfera e per la maggior parte dei prodotti, misurare il livello di ossigeno o aria residua. Una misura di sicurezza preventiva può essere certamente quella di dotare l'impianto di dispositivi in linea per un controllo dell'atmosfera erogata; esiste la possibilità che in alcune confezioni l'atmosfera non sia quella prevista per un difetto di saldatura o per la presenza di microfori. In commercio sono

pochi i sistemi di analisi non distruttiva dell'integrità delle confezioni, è indispensabile quindi sacrificare alcune confezioni a campione, per poter effettuare controlli sull'ermeticità. Le modalità per realizzare analisi della composizione sono diverse. Il sistema più preciso, accurato e completo è rappresentato dalla tecnica gas-cromatografica: l'unico inconveniente è l'investimento richiesto per l'acquisto dello strumento. In alternativa esistono diverse possibilità rappresentate da dispositivi dedicati a questo specifico scopo.

2.10 - Prodotti conservati in atmosfera modificata

Un appropriato uso dei gas non può prescindere dalla conoscenza della natura e delle caratteristiche del prodotto da confezionare. In particolare per una corretta applicazione della tecnica di confezionamento in atmosfera modificata è indispensabile conoscere preventivamente:

- Le principali cause di deterioramento del prodotto (microbiologico, ossidativo, enzimatico).
- La solubilità della CO₂ dell'alimento alle diverse temperature e le variazioni organolettiche associate alla dissoluzione dei gas.
- Il comportamento della microflora nell'atmosfera prescelta.
- La permeabilità dei materiali di confezionamento ai gas impiegati, tenendo conto della temperatura di conservazione e della superficie complessiva.

- L'ermeticità della confezione, cioè l'assenza di microfori e/o di difetti di saldatura.
- L'efficacia dell'operazione di confezionamento e di sostituzione dell'aria, vale a dire scegliere il tipo di macchina di confezionamento più idoneo ed il sistema di erogazione e di miscelazione del gas (www.distam.unimi.it/info/info2.htm).

In linea teorica qualunque alimento potrebbe essere conservato in atmosfera modificata. Ovviamente ciò viene effettuato solo per quegli alimenti che traggono un effettivo beneficio da tale confezionamento.

Di seguito sono riportati alcuni esempi (Tab. 2):

Prodotti carnei: Acquistano una buona conservabilità, in termini di colore sapore e consistenza, per almeno 7- 8 giorni ad una temperatura di 2-4 °C. Si garantisce in questo modo una maggior facilità di distribuzione del prodotto. Solitamente l'atmosfera utilizzata è costituita dal 70% di ossigeno, dal 20% da anidride carbonica e dal 10% da azoto. Nella carne fresca l'anidride carbonica inibisce la crescita di numerosi microrganismi.

L'ossigeno nella confezione è mantenuto per garantire il mantenimento di una gradevole colorazione rossa. La carne più rossa come quella di manzo richiede più ossigeno di quanto non ne richieda quella di maiale. La carne di pollo, si conserva in miscele costituite dal 40- 60% di anidride carbonica a temperature di 4 °C per allungare la shelf- life sino a 28 giorni.

Prodotti caseari: Tali prodotti deperiscono per irrancidimento ossidativo e per crescita di microrganismi alterativi, specialmente muffe e lieviti. Il latte

in polvere è conservato in confezioni metalliche sigillate ermeticamente in miscele di azoto e di anidride carbonica. I formaggi normalmente vengono conservati in atmosfere con il 10-30% di anidride carbonica, in questo modo viene evitato l'ammuffimento e viene preservato il sapore e l'aroma caratteristico. Nei formaggi a pasta dura si utilizza una percentuale di anidride carbonica più alta per il mantenimento della texture e per inibire l'attività di microrganismi, in particolare muffe e *Pseudomonas*.

Nei formaggi a pasta molle, invece, è bene utilizzare basse concentrazioni di ossigeno per inibire l'irrancidimento; l'anidride carbonica in questo caso può disciogliersi nella matrice con il rischio del collassamento della confezione.

Prodotti vegetali: Per i vegetali freschi normalmente vengono utilizzate miscele di gas costituite da azoto e da basse concentrazioni di ossigeno (1-5%) e di anidride carbonica (5-10%); l'atmosfera modificata normalmente è associata a basse temperature di refrigerazione, questo garantisce il mantenimento del turgore dei tessuti, la minore proliferazione microbica e il rallentamento dell'attività enzimatica.

Prodotti da forno: Pane, prodotti lievitati, snack, dolci e molti altri prodotti da forno sono tutti soggetti al fenomeno dell'ammuffimento (in rispetto al loro livello d'umidità), a cambiamenti della parte grassa (irrancidimento) e a variazioni della consistenza (raffermimento). Per questo motivo la loro qualità può diminuire velocemente. Il confezionamento in atmosfera (da 100% azoto a 100% anidride carbonica in accordo al prodotto specifico) è

funzionale contro queste possibili modificazioni qualitative e raddoppia o triplica la conservabilità a temperatura ambiente di questi prodotti alimentari.

Pasta fresca: Qualunque sia il metodo di produzione utilizzato per la pasta fresca (manuale o industriale, pastorizzato o sterilizzato, confezionato o sfuso) un confezionamento in MAP con un contenuto medio di anidride carbonica (10-50%) rispetto all'azoto, permette di fermare la moltiplicazione dei possibili microrganismi contaminanti, evitando lo sviluppo indesiderato di muffe ed aumentando la conservabilità del prodotto a temperature di refrigerazione. Questo permette una più grande flessibilità in produzione ed a livello di distribuzione.

2.11 - Evoluzioni delle MAP: active packaging

Se l'atmosfera modificata esplica i suoi effetti modulando le proporzioni relative di gas mediante il confinamento delle miscele gassose create appositamente in confezioni con determinate caratteristiche di barriera ai gas, l'active packaging amplia il concetto di interazione promuovendo la rimozione e/o il rilascio di componenti utili al mantenimento della qualità degli alimenti.

I dispositivi di active packaging più studiati ed anche gli unici che hanno una consistente diffusione commerciale anche nei mercati europei sono, senza alcun dubbio, gli assorbitori di ossigeno. Essi consentono,

rapidamente ed efficacemente, di eliminare l'ossigeno dalle confezioni portando il residuo a livelli inferiori allo 0,1%. Il loro impiego consente di accrescere l'effetto protettivo delle atmosfere modificate ed, in alcuni casi, di impiegare materiali di confezionamento meno costosi perché meno barriera. Grazie alla loro azione è possibile bloccare lo sviluppo di qualsiasi forma microbica aerobia ed inibire tutte le reazioni chimiche ed enzimatiche che possono alterare la qualità sensoriale e nutrizionale di un alimento confezionato. In teoria possono essere utilizzati per tutti gli alimenti mentre, in pratica, vengono utilizzati per lo più per prodotti a basso contenuto di umidità per diminuire il rischio di proliferazione di microrganismi anaerobi.

Parte Sperimentale

II.

1 - Premessa

Il settore dei prodotti dolciari tipici è caratterizzato nel meridione d'Italia pressoché totalmente da prodotti derivanti, per formulazione e tecnologia, da antiche ricette. A fronte di un'attività dolciaria intensa ed abbastanza capillare, che ha sempre avuto sbocchi soprattutto sul mercato locale, non sono mai state condotte ricerche articolate per l'ottimizzazione tecnologica di tali prodotti. Nasce, pertanto, l'esigenza di dare risposte concrete agli operatori, specialmente al momento attuale, in cui sono notevoli le possibilità di successo dei prodotti dolciari tipici nei mercati di tutto il mondo. La Sardegna, in questo contesto, vanta una secolare tradizione nella preparazione di un numero elevato di prodotti dolciari; esistono delle specificità e tipicità ben precise nelle varie zone dell'isola, ad esempio, possiamo citare due prodotti a prima vista simili, in realtà molto diversi, come le "casadinas" e le "pardulas", prodotte nel nord e sud Sardegna, rispettivamente. Si pensi che dei 156 prodotti tradizionali tipici citati nell'Elenco Nazionale Prodotti Tradizionali della Sardegna, predisposto dall'Assessorato dell'Agricoltura e Riforma Agro-Pastorale della RAS sulla base dei DL n.173/98 e DM n. 350/99, ben 34 sono prodotti dolciari. Tale tradizione, tramandata di generazione in generazione, si basa sulla produzione in via quasi esclusiva, con poche

eccezioni legate spesso a prodotti di ricorrenza, di prodotti dolciari di tipo "secco", quali, ad esempio i "papassinos", le "thiliccas", gli "amaretti", i "guelfos" e tanti altri. Tale scelta produttiva è stata chiaramente obbligata dall'esigenza di avere un prodotto con la maggiore conservabilità possibile, infatti, ai tempi in cui venivano sviluppate queste ricette non si avevano a disposizione i mezzi di conservazione attuali e le risorse erano limitate. In tal modo i vari prodotti potevano essere consumati nell'arco di diversi giorni e a volte, anche di settimane. Tra i prodotti dolciari secchi della Sardegna ne esistono alcuni che, pur con minime variazioni di formulazione e tecnologia di produzione, sono presenti in tutte le parti dell'isola.

Le aziende dolciarie isolate hanno una produzione abbastanza diversificata, anche se quasi sempre la produzione comprende alcuni dolci comuni (come i papassinos e gli amaretti). Dall'analisi dei problemi affrontati sino a ora relativi a diverse tipologie di prodotti dolciari da forno si evince che le cause principali di alterazione siano di tipo microbiologico e chimico-fisico. Nonostante ci sia una certa variabilità di shelf-life (dovuta a diversi fattori, interni ed esterni, quali formulazione, umidità e temperatura di stoccaggio), anche nei casi migliori la durata non consente, comunque, di poter conservare il prodotto per i tempi richiesti dai canali distributivi della grande distribuzione organizzata (GDO). La particolare formulazione di questi prodotti, infatti, li rende dei "sistemi

alimentari" abbastanza complessi, sono, cioè, degli "alimenti multidominio", in quanto le varie zone del prodotto sono a diversa attività dell'acqua, la quale può migrare all'interno del prodotto e scatenare reazioni alterative di tipo chimico-fisico e microbiologico che portano al decadimento strutturale e sensoriale del prodotto. Inoltre, specialmente per alcuni prodotti con valori di attività dell'acqua limite esistono seri rischi di sviluppo microbico, specialmente ad opera di funghi. Oltre ai problemi di tipo strutturale, inoltre, la presenza nella formulazione di alcuni dolci di una notevole quantità di grassi potrebbe portare, durante la conservazione prolungata, a fenomeni di irrancidimento ossidativo, con conseguente comparsa di odori e sapori sgradevoli.

Esistono comunque, oltre ai prodotti a bassa umidità, altri ad umidità intermedia e elevata, come le "Casadinas" o "Formaggelle" e le "Seadas", rispettivamente. Entrambi, infatti, hanno un valore di a_w uguale o superiore a 0,85 (per le seadas il valore è molto più alto), pertanto esiste un serio problema legato all'alterazione microbica (muffe e lieviti), ma soprattutto, potrebbe esserci la possibilità di crescita di microrganismi patogeni.

L'attività del dottorato si è posta come obiettivo l'ottimizzazione delle tecnologie di trasformazione e packaging (condizionamento) di questi prodotti dolciari, le formaggelle e le seadas, con lo scopo di allungarne la

durata commerciale e renderne quindi possibile l'esportazione nei mercati nazionali e internazionali.

Di seguito verrà riportata l'attività di ricerca svolta per ciascun prodotto dolciario.

Sperimentazione "Seadas"

III

1 - Introduzione

La seada, o sebada (Fig.1), è un dolce tipico prodotto in Sardegna, conosciuto e molto apprezzato in tutto il territorio regionale. Di forma solitamente circolare, è un dolce da friggere, con un ripieno di formaggio fresco aromatizzato con scorza di limone o di arancia, ricoperto da una pasta (short) costituita da semola e strutto. Tradizionalmente, tale dolce era preparato dalle donne barbaricine nel periodo primaverile per celebrare il ritorno a casa dei pastori, dopo la fredda stagione invernale passata a pascolare i loro greggi.

Le Seadas fanno parte dell'elenco dei prodotti tradizionali della regione Sardegna (art.8 Decreto Legislativo n. 173/98, art. 2 Decreto Ministeriale n. 350/99), intendendo con il termine "prodotti tradizionali" quei prodotti agro-alimentari le cui metodiche di lavorazione, conservazione e stagionatura risultino consolidate nel tempo, omogenee per tutto il territorio interessato, secondo regole tradizionali, per un periodo non inferiore ai 25 anni. Questo è un marchio di proprietà del Mipaf che si colloca al di fuori della normativa sulle attestazioni DOP, IGP e STG. Questo dolce rientra nella categoria delle paste fresche per gli elevati valori di umidità e di a_w . L'elevata percentuale di acqua lo espone all'attacco di microrganismi con problemi quasi mai immediatamente percepibili. La degradazione sensoriale e le alterazioni in genere, che si

osservano in questi tipi di prodotti, quasi sempre sono causate direttamente o indirettamente, dalle attività di microrganismi che di questi prodotti hanno fatto il loro substrato vitale (in particolare muffe). L'insidia peggiore è costituita dalla possibilità di crescita di microrganismi patogeni, che possono essere causa di tossinfezioni/infezioni a volte gravi e purtroppo in alcuni casi mortali. Non risulta, però, che si siano mai verificate tali condizioni nelle paste fresche (Mondelli G., 2003a).

La commercializzazione delle seadas è regolamentata da una specifica normativa sulle paste fresche (D.P.R. N°187/2001 ART.9). Secondo tale decreto, le paste alimentari fresche poste in vendita in imballaggi preconfezionati devono possedere determinati requisiti:

- Avere un tenore di umidità non inferiore al 24%.
- Avere un'attività dell'acqua libera non inferiore a 0,92 né superiore a 0,97.
- Essere state sottoposte ad un trattamento termico equivalente almeno alla pastorizzazione.
- Essere conservate dalla produzione alla vendita a temperature non superiori a 4°C con tolleranza di 2°C.

La pastorizzazione è una fase di processo obbligatoria per la produzione di pasta fresca confezionata, mentre non è necessaria per il prodotto destinato alla vendita allo stato sfuso. Lo scopo di tale processo è quello di distruggere le forme vegetative patogene e la maggior parte di quelle alteranti ed inoltre di disattivare degli enzimi (Cappelli *et al.*, 1994).

Tuttavia, le condizioni perché questi effetti siano raggiunti variano a seconda della natura intrinseca dei microrganismi e degli enzimi, e delle caratteristiche specifiche dell'alimento.

L'efficacia della pastorizzazione non è pertanto assoluta, ma sempre e soltanto parziale, ciò in quanto l'intensità del trattamento non può superare i limiti imposti dalla sensibilità ai trattamenti termici dell'alimento trattato. Normalmente, il processo produttivo delle paste fresche ripiene confezionate può essere distinto in tre fasi fondamentali:

- Stoccaggio ed utilizzo di materie prime, ingredienti, ecc. per la formazione dell'impasto e la preparazione del ripieno.
- Processo produttivo vero e proprio (formatura, pastorizzazione raffreddamento).
- Confezionamento e stoccaggio refrigerato.

È evidente che se, per ognuna delle tre fasi considerate, le operazioni relative sono svolte in modo ottimale per quanto riguarda le rispettive variabili microbiologiche, e se anche le altre situazioni comuni di rischio sono correttamente gestite, all'inizio della vita del prodotto confezionato e refrigerato corrisponderà un livello di carica microbica nel prodotto stesso idoneo a garantire la shelf life richiesta. Dopo il trattamento termico, la shelf life del prodotto è determinata dalle proprietà del confezionamento, dalla qualità dello stoccaggio (mantenimento della catena del freddo) e dalla quantità e dal tipo di contaminazione microbica residua nel prodotto subito dopo il confezionamento.

Scopo del lavoro è stato quello di allungare la shelf life delle seadas prodotte in un pastificio artigianale. Valutati inizialmente gli effetti prodotti dal trattamento di pastorizzazione, si è pensato, considerato che l'azienda è in grado di mantenere il prodotto confezionato nei punti vendita per soli 10 giorni, di intervenire sull'impiego di nuove tecnologie di confezionamento (atmosfera modificata). Scegliendo la giusta miscela di gas, l'atmosfera modificata associata alla refrigerazione poteva essere una soluzione per prolungare la "vita commerciale" del dolce studiato.

2 . Materiali e metodi

2.1 - Tecnologia di produzione

Le seadas sono state prodotte in un pastificio locale secondo la formulazione tradizionale. Di seguito sono indicati gli ingredienti utilizzati con le rispettive percentuali:

Ingredienti per l'impasto

- Semola di grano duro 80%
- Acqua 5%
- Strutto 15%
- Sale (q.b.)

Ingredienti per il ripieno

- Formaggio fresco (pasta filata) 95%
- Aroma arancio 5%

L'impasto, ottenuto dalla lavorazione degli ingredienti per circa 20 minuti in un'impastatrice ad asse verticale (Fig.2), viene laminato e compresso tra rulli e avvolto su di un perno in materiale inerte, con spessore di circa 6-8 mm, fino alla formazione di un rotolo (Fig.3). Tale rotolo, grazie alle sagome laterali del perno stesso, viene spostato manualmente sui supporti di ingresso della formatrice (Fig 4). Nella formatrice si caricano gli ingredienti del ripieno, opportunamente miscelati, e si procede alla fase finale di produzione del dolce.

2.2 - Pastorizzazione

Come è stato detto più volte per la produzione e la commercializzazione della pasta fresca confezionata, la normativa italiana impone l'obbligo della pastorizzazione del prodotto o di un trattamento equivalente.

Le seadas a temperatura ambiente sono state introdotte manualmente, dopo la fase di formatura, per mezzo di un nastro trasportatore largo 70 cm a maglia fine, la cui velocità può essere regolata consentendo diversi tempi di trattamento, in un tunnel di pastorizzazione a vapore sorgente. La linea è costituita da una camera di pastorizzazione di 6 m di lunghezza (Fig. 5).

Il vapore nel pastorizzatore a vapore saturo è generato dall'ebollizione dell'acqua all'interno di una vasca posta sotto il prodotto da trattare. Il riscaldamento dell'acqua avviene tramite scambiatori di calore alimentati a loro volta da vapore. La logica del funzionamento consiste nel mantenere l'acqua a temperature prossime all'ebollizione, in modo da riuscire a fornire al prodotto solo la quantità necessaria al processo. La vaporizzazione consente un ottimo scambio termico con il prodotto, dato che il principale vettore di calore è l'acqua contenuta nel vapore stesso, e che il grado di saturazione aumenta con la temperatura e la pressione.

Il dolce entra ad una temperatura di circa 20°C e procede attraverso una griglia di trasporto lungo la camera di pastorizzazione satura di vapore,

per un tempo dipendente dalla velocità del nastro. Dopo una serie di prove preliminari si è deciso, al fine di minimizzare il danno termico e raggiungere i valori minimi prefissati di F_0 , di operare alla temperatura di 91°C e con un tempo di permanenza all'interno della camera di pastorizzazione di 9 minuti.

Per sottoporre a monitoraggio questa fase di processo è stato indispensabile conoscere il campo di variazione dei parametri coinvolti (tempo di trattamento e temperatura della camera di pastorizzazione). Risulta inoltre di notevole importanza conoscere e definire il valore di F_0 più idoneo per ottenere una sufficiente pastorizzazione senza allo stesso tempo stressare eccessivamente il prodotto. Il valore F_0 è definito come letalità del trattamento, ovvero il numero di minuti equivalenti ad una temperatura di riferimento di tutto il processo termico, ottenuto facendo la somma infinitesimale di tutti i singoli contributi (integrale degli F).

Sulla base dell'esperienza di numerose aziende operanti in questo settore, si è scelto di utilizzare un valore di F_0 pari a 50 minuti (70 °C, $z=10$). Tale valore normalmente è indicato per la categoria delle paste fresche ripiene ad alto valore organolettico.

Nel nostro studio, l'effetto complessivo del trattamento termico secondo il profilo tempo/temperatura, è stato determinato sperimentalmente attraverso un sistema di rilevamento costituito da:

- una sonda di penetrazione (data logger Micropack III): versione di misura per temperatura da -24°C a +140°C, pressione massima

operativa maggiore di 10 bar, velocità di risposta 0,9<5 secondi, corpo in acciaio AISI316 e memoria circa 16000 dati (Fig. 6);

- sistema per programmazione e scarico dati Micropack completo di: Software Datatrace per Windows, verifica integrità dati, verifica stato funzionale dei micropack, funzione export dati, calcolo Fo (Fig. 7);

La valutazione del trattamento termico è stata effettuata posizionando la sonda nel centro delle seadas, ossia nel punto del prodotto termicamente più sfavorito (Fig. 8).

La seada, in uscita dalla zona di trattamento a calore umido, è stata sottoposta a ventilazione forzata ad aria calda per una sua parziale asciugatura (Fig. 9). Questa operazione viene eseguita, perché parte del vapore saturo a contatto con la pasta condensa, creando un velo d'acqua superficiale sul prodotto. La seada esce dunque molto bagnata dalla sezione di trattamento del pastorizzatore e deve essere subito asciugata per evitare che si formi una soluzione colloidale con gli amidi (ma soprattutto con gli zuccheri prodotti dal danneggiamento degli amidi stessi) presenti sulla superficie della sfoglia (Mondelli, 2003b).

2.3 - Valutazione trattamento termico

Per stimare gli effetti del trattamento termico le seadas sono state analizzate prima e dopo il processo, (SP=seadas prima del trattamento; SD=seadas dopo il trattamento).

Sono state quindi condotte le seguenti analisi:

- analisi microbiologiche: (conta batterica totale, muffe, lieviti, *Staphilococcus aureus* (SCP), clostridi, enterobatteri, salmonella e batteri sporigeni aerobi);
- analisi chimico-fisiche (a_w , sostanza secca e pH);
- analisi sensoriale (test di differenza con 5 assaggiatori);
- analisi del colore.

2.3.1 - Analisi microbiologiche

Le analisi microbiologiche condotte sulle seadas fanno riferimento essenzialmente agli indicatori di processo (conta di germi mesofili e coliformi), indici di patogeni (*E.coli* e *S. aureus*), e ad alcuni patogeni più frequenti (*Salmonella* spp). Il ministero della Sanità ha fissato standard (C.M. 32/85) di indicatori di processo e di indici di patogeni che fanno riferimento a due valori, valore guida (m) (inteso come valore che informa sulla corretta applicazione del sistema HACCP) e valore limite (M). Il superamento del primo comporta un adeguamento dei processi, il

superamento del secondo comporta la non accettabilità (Rossi *et al.*, 2005).

Preparazione campione

Due seadas per tesi (SP e SD) sono state prelevate rispettivamente in condizioni sterili all'entrata e all'uscita del pastorizzatore. I campioni all'arrivo in laboratorio sono stati analizzati. Le determinazioni, per ciascuna tesi, sono state effettuate in doppio ed eseguite sia nella pasta che nel ripieno. Per l'allestimento della sospensione madre e delle successive diluizioni scalari è stato prelevato un quantitativo di campione pari a 10 grammi. Dalle sospensioni così preparate è stato prelevato un opportuno quantitativo per la semina o l'inclusione nel terreno di coltura specifico a seconda del microrganismo ricercato secondo le indicazioni riportate di seguito.

Conta microbica totale

Preparazione del terreno di coltura

Per la preparazione è stato impiegato il terreno PCA (Oxoid, Milano, Italy).

Semina del campione

Il campione, preparato secondo le opportune diluizioni, è stato seminato per inclusione secondo un'aliquota di 1000 µL per piastra. Dopo l'incubazione per 48 ore 30 °C è stata effettuata la conta delle UFC per

ciascuna diluizione. Sono state prese in considerazione le piastre che rientravano nell'intervallo 30 – 300 UFC/piastra. Il risultato è stato espresso in UFC/g.

Lieviti e muffe

Preparazione del terreno

Per l'analisi delle muffe e dei lieviti è stato utilizzato il terreno di coltura YPD, preparato nel seguente modo:

- 1% di estratto di lievito;
- 2% di bacto - peptone;
- 2% di destrosio;
- 1% di agar.

Semina del campione

Il campione, preparato secondo le opportune diluizioni, è stato seminato per spandimento, secondo un'aliquota di 500 µL per piastra. Le piastre sono state incubate alla temperatura di 25 °C e le letture sono state effettuate a 48 ore per i lieviti e a 96 ore per le muffe. La conta è stata eseguita per ciascuna diluizione e sono state prese in considerazione le conte che rientravano nell'intervallo 30 – 300 UFC/piastra. Il risultato è stato espresso in UFC / g.

Stafilococchi

Preparazione del terreno

Per la ricerca degli stafilococchi è stato utilizzato il mezzo colturale Baird Parker Agar (Oxoid) con aggiunta di Tellurite Yolk Emulsion (Oxoid).

Semina del campione

Il campione, 500 µL per ogni diluizione, è stato seminato per spatolamento superficiale sul mezzo di coltura e incubato a 37 °C per 48 ore. La conta è stata eseguita su tutte le diluizioni, sono state però considerate solo le piastre in cui il numero delle colonie era compreso fra 30 – 300 UFC/piastra.

Le colonie sospette "tipiche" (nere o grigie, lucenti e convesse con margine opalescente, biancastro circondate da alone trasparente) sono state prelevate con ansa e sottoposte al test della coagulasi. Il risultato è stato espresso in UFC/g.

Clostridi

Preparazione del terreno

Per la ricerca dei clostridi solfito-riduttori è stato impiegato il terreno Differential Reduced Clostridial Medium DRCM (Oxoid), disposto in provette in aliquote di 9 mL.

Semina del campione

Il campione, preparato secondo le opportune diluizioni, è stato seminato nelle provette secondo un'aliquota di 1000 µL per ciascuna provetta (per un totale di tre provette per ogni diluizione) coprendo la superficie libera del terreno seminato con un mL di paraffina. Le provette

seminate, sono state prima pastorizzate in bagno d'acqua alla temperatura di 80 °C per 10 minuti al fine di distruggere le forme vegetative, poi sono state incubate alla temperatura di 37 °C per 48 ore. La conta è stata valutata sulla base dell'esito di positività, per tutte le provette della tripletta, consistente nel deciso viraggio in scuro del terreno e del sollevamento del tappo di paraffina. La conta è stata effettuata tramite il metodo MPN.

Enterobatteri

Preparazione del terreno

Per gli enterobatteri è stato impiegato il terreno Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) (Oxoid, Milano, Italy).

Semina del campione

Il campione, preparato secondo le opportune diluizioni, è stato seminato per inclusione secondo un'aliquota di 1000 µL per piastra. Dopo l'incubazione per 48 ore 37 °C è stata effettuata la conta delle UFC per ciascuna diluizione. Sono state prese in considerazione le piastre che rientravano nell'intervallo 30 – 300 UFC/piastra. Il risultato è stato espresso in UFC/g.

Salmonella

Preparazione del terreno

Per la ricerca della salmonella è stato utilizzato un metodo rapido non convenzionale il Rapid Test (Oxoid). Esso è rappresentato da un kit per la ricerca di Salmonelle mobili, la cui positività viene indicata dal viraggio di colore di differenti substrati metabolici.

Semina e preparazione del campione

Per la ricerca del patogeno, si prepara un pre- arricchimento, di 25 grammi di campione omogeneizzati in 225 mL di acqua peptonata tamponata, il quale viene incubato a 37°C per 18 ore. Da tale pre-arricchimento si prelevano 1000 µL che vengono seminati all'interno del recipiente di cui dispone il kit. Dopo 24 ore di incubazione a 40° C dall'osservazione del kit si registra l'eventuale presenza di Salmonella. Il kit è associato poi ad un test sierologico di agglutinazione al lattice tramite il quale si procede alla conferma degli eventuali risultati positivi.

Batteri sporigeni aerobi

Preparazione del terreno

Per la ricerca dei batteri sporigeni aerobi è stato utilizzato il Nutrient Agar (Oxoid).

Semina del campione

Per eliminare tutte le forme vegetative, la sospensione madre e le successive diluizioni sono state pastorizzate a 80°C per 10 min.

I campioni, seminati per spandimento superficiale, dopo la pastorizzazione, sono stati seminati secondo un'aliquota di 500 µL. Le

piastre, incubate a 30 °C, sono state conteggiate dopo 48 ore. Il risultato è stato espresso in UFC/g.

2.3.2 - Analisi fisico-chimiche

Preparazione dei campioni

Per le determinazioni chimico-fisiche, sono state utilizzate due seadas. Le misurazioni, effettuate in triplo, sono state condotte sia sulla pasta che sul ripieno preventivamente omogeneizzati.

pH

Il pH è stato misurato utilizzando un elettrodo combinato (mod. Double Pore, Hamilton, Reno, USA) per solidi e semi-solidi collegato mediante uno strumento misuratore del pH (modello 710/A, Orion Research Inc., Beverly, USA). La taratura dello strumento è stata effettuata all'inizio di ogni sessione di prove, utilizzando soluzioni tampone a pH noto nei punti di pH 4,01 e 7.

Sostanza secca

Il contenuto di umidità è stato determinato mediante stufa sotto vuoto per 12 ore a 70°C, secondo la metodica ufficiale (AOAC, 1990).

Attività dell'acqua

La stima dell'attività dell'acqua è stata condotta attraverso l'impiego di un igrometro (modello BT – RS1, AW-Win Hygroskop, Rotronic "Pbi international", Svizzera). I campioni da analizzare, nel quantitativo di 1-2 grammi, sono stati stratificati all'interno di una capsula monouso in materiale plastico e posti all'interno del contenitore sonda. Il valore è stato letto al quinto minuto successivo all'equilibrio. Lo strumento è stato calibrato con soluzioni di LiCl in un range di attività di 0.1- 0.95 (Labuza, Acott, Tatini, Lee, Flink, & McCall, 1976).

2.3.3 - Analisi sensoriale

Per l'analisi sensoriale si è condotto un test di differenza con un panel interno al laboratorio di cinque assaggiatori. Al panel è stato chiesto di valutare se vi fosse una differenza fra le due tesi analizzate SP e SD. Con l'obiettivo qualora si fosse riscontrata una minima differenza di condurre un test triangolare.

2.3.4 - Analisi del colore

La variazione del colore delle seadas è stata determinata, impiegando un colorimetro tristimolo (Chromameter-2 Reflectance, Minolta, Osaka, Japan), accoppiato ad un'unità di misurazione CR-300. Lo strumento prima dell'utilizzo è stato calibrato con mattonella di riferimento bianca ($L=9,28$; $a=0,41$; $b=1,89$). Per ogni tesi sono state effettuate dieci letture.

Il colore è stato misurato utilizzando lo spazio di colore di Hunter (L, a, b), il valore L indica la luminosità, il parametro a fornisce l'indicazione dell'attribuzione del colore nel suo passaggio dal verde (-a) al rosso (+a), mentre b dà l'indicazione del passaggio del colore dal blu (-b) al giallo (+b). Da questi valori, è stata determinata la coordinata tristimolo Z o indice di giallo (Frau *et al.*, 1999).

2.4 - Confezionamento e conservazione

Subito dopo la pastorizzazione le seadas vengono raffreddate rapidamente nell'abbattitore, alla temperatura di conservazione di 4-6°C. Questo è un passaggio molto importante nel processo di produzione, soprattutto per la fase successiva del confezionamento. È necessario, infatti, che il rialzo termico in questa fase non porti la temperatura della seadas oltre i limiti di "non sicurezza" (>10 °C). La durata della fase di confezionamento è stata molto breve, per cui l'aumento di temperatura e il relativo rischio è stato decisamente contenuto. È necessario che il delta termico subito dal prodotto appena uscito del raffreddatore e durante il confezionamento, sia mantenuto entro limiti corretti, per evitare non solo il parziale riscaldamento della seadas, ma anche la formazione sulla sua superficie di un velo di umidità, dovuto ai fenomeni di condensazione, con conseguenti incollature tra i singoli pezzi (Mondelli, 2003b).

Le seadas pastorizzate sono state confezionate in due differenti modi: in atmosfera ordinaria (AO) con film non barrierato ai gas, secondo la metodica comunemente utilizzata nell'azienda (Fig. 10), e in atmosfera modificata (AM) utilizzando una miscela 50%/50% di N₂/CO₂ (Fig. 11) (Zardetto, 2005). Per quest'ultimo confezionamento si sono utilizzati vassoi in polistirolo espanso estruso laminato (Aerpack B5-30, Coopbox Italia, Reggio Emilia, Italy) (O₂, 1,07 cm³ m⁻² 24h⁻¹ bar⁻¹ a 23°C; CO₂, 5,35 cm³ m⁻² 24h⁻¹ bar⁻¹ a 23°C; vapore acqueo, 63 g m⁻² 24h⁻¹ at 38°C) e film multistrato barrierato ai gas e all'acqua (EVOH/OPET/PE), (EOM 360B, Sealed Air, USA) (O₂, 4 cm³ m⁻² 24h⁻¹ bar⁻¹ a 23°C; CO₂, 13 cm³ m⁻² 24h⁻¹ bar⁻¹ at 23°C; vapore acqueo, 9 g m⁻² 24h⁻¹ at 38°C). In AO sono state posizionate tre seadas per confezione mentre in AM ne sono state posizionate due.

I campioni, conservati in cella termostata a 4°C, sono stati analizzati ad intervalli regolari di tempo a 0, 7, 14, 28, 35 e 42 giorni.

Su entrambe le tesi sono state condotte le seguenti determinazioni:

- analisi microbiologiche: (conta totale, muffe e lieviti, stafilococchi, clostridi, enterobatteri, salmonella e batteri sporigeni aerobi);
- analisi chimico-fisiche: (a_w, sostanza secca e pH);
- analisi sensoriale: (test di accettabilità);
- analisi dei gas all'interno della confezione.

2.4.1 - Analisi microbiologiche

Preparazione campione

Per ogni campionamento si è utilizzata una vaschetta per tesi. Le determinazioni, effettuate in doppio, sono state condotte sia sulla pasta che sul ripieno secondo le metodiche precedentemente descritte.

2.4.2 - Analisi fisico-chimiche

Preparazione del campione

Le metodiche utilizzate per le determinazioni fisico-chimiche sono state effettuate come descritto precedentemente. Ad ogni campionamento si è utilizzata una vaschetta per tesi.

2.4.3 - Analisi sensoriale

Per la valutazione sensoriale si è eseguito un test di accettabilità seguendo gli standards IDF 99B (1995). Per tale scopo, si è utilizzato un panel non addestrato di 30 giudici, interno al laboratorio. Agli assaggiatori è stato chiesto di valutare il colore, l'intensità olfattiva, l'acidità, l'aroma, l'off-flavour, la friabilità della pasta e la masticabilità su una scala edonistica a 7 punti in cui 4 rappresentava il punteggio minimo di accettabilità.

Per l'esecuzione del test, le seadas sono state fritte con una friggitrice (mod. Friggimeglio DeLonghi) in olio di oliva alla temperatura predeterminata di 170 °C per 4 minuti, 2 minuti per la frittura della parte

superiore e due minuti per la frittura della parte inferiore. Ai giudici, la seadas è stata servita subito dopo la frittura.

2.4.4 - Analisi dei gas

La composizione dei gas, nelle vaschette in AM, è stata misurata durante la conservazione per mezzo di un analizzatore di gas (Mod. Combi Check 9800-1, PBI-Dansensor, Denmark).

2.4.5 - Analisi statistica

Per l'elaborazione statistica dei dati si è utilizzato il software statistico, Statistica 6.0 per Windows. Si è eseguita l'ANOVA ad una via, dove il predittore categoriale era rappresentato, nel primo caso dai due campioni SP e SD, nel secondo caso dal periodo di conservazione. La differenza fra le medie è stata effettuata applicando il Duncan's Multiple Range Test con un livello $p \leq 0,05$.

3 - Risultati e discussione

3.1 - Valutazione trattamento termico

3.1.1 - Pastorizzazione

Nella pastorizzazione della pasta fresca ripiena, e in questo caso delle seadas, il riscaldamento del prodotto trattato non è praticamente mai omogeneo per tutta la massa del prodotto stesso. La pasta si riscalda più velocemente del ripieno con la conseguenza che il tempo di esposizione al calore è certamente più lungo rispetto alla farcitura. Anche la temperatura, ovviamente, cresce più rapidamente all'esterno, fino a raggiungere valori prossimi a quelli ambientali interni alla camera di pastorizzazione. La conseguenza di questo stato di cose è che l'efficacia della pastorizzazione della sfoglia è sempre maggiore di quella del ripieno, che costituisce pertanto il componente più critico ai fini della sanificazione del prodotto e della sua shelf life. La dinamica di pastorizzazione delle seadas, ha riguardato conseguentemente soprattutto il ripieno, specificatamente il cuore del prodotto, al quale hanno fatto riferimento i parametri fondamentali del processo. Il controllo del trattamento termico, per l'ottenimento di un F_0 pari a 50, è stato ottenuto variando il parametro tempo, ossia, regolando la velocità di transito della pasta nella camera di pastorizzazione con dispositivi meccanici che modificano la velocità di scorrimento della griglia, e il parametro temperatura. La storia termica del prodotto è indicata nella Fig. 12. Come si può facilmente osservare, il

prodotto raggiunge la temperatura massima di 82 °C, con un tempo di processo totale di 15 minuti.

3.1.2 - Analisi microbiologiche

I risultati delle analisi microbiologiche hanno evidenziato l'efficacia del trattamento di pastorizzazione. Infatti, come si può osservare nella Tab. 3, si è avuta una riduzione logaritmica di 4 cicli di unità formanti colonie per grammo (Ufc/g) per la carica mesofila totale, 3 per gli enterobatteri e 1 ciclo per lieviti ed stafilococchi coagulasi negativi. I clostridi e i batteri sporigeni aerobi, seppur presenti in quantità minime, sono invece risultati insensibili al trattamento termico subito, come era lecito attendersi, visto i dati riportati in letteratura (Mondelli, 2007). Infatti, la termoresistenza dei microrganismi è legata principalmente alla natura intrinseca dei microrganismi stessi; normalmente i batteri non sporigeni, le muffe ed i lieviti sono relativamente sensibili al calore, anche se le eccezioni ovviamente non mancano. Alcuni batteri non sporigeni, come ad esempio gli enterococchi, presentano una notevole resistenza, così come alcune specie di lattobacilli. Elevata inoltre è la resistenza al calore delle spore dei batteri sporigeni *Bacillus* (aerobi) e *Clostridium* (anaerobi), l'inattivazione delle quali richiede un trattamento di sterilizzazione con temperature molto elevate (>120°C).

3.1.3 - Analisi fisico chimiche

I risultati delle analisi fisico-chimiche sono riportati nella tabella Tab. 4.

Come si può facilmente vedere il pH varia significativamente, sia nel ripieno, che nella pasta, mentre per quanto riguarda l' a_w il valore di 0,97 misurato prima del trattamento non si modifica dopo il processo.

L'umidità invece, aumenta significativamente solo nella pasta a causa del processo di pastorizzazione. Durante il processo termico la pasta, oltre a riscaldarsi per mezzo del calore ceduto dal vapore saturo, assorbe l'umidità accumulata sulla sua superficie, tanto da bagnarsi completamente. È importante che, dopo tale fase, la pasta venga ventilata energicamente con aria molto calda, (in particolar modo se si utilizza un pastorizzatore a vapore sorgente) per asciugare la superficie ed evitare quindi l'insorgere di problemi di incollatura. La pasta fresca, infatti, tende ad incollarsi quando la superficie è particolarmente umida (www.professionalpasta.it).

3.1.4 - Analisi sensoriale

Per tutti i componenti del panel esiste una sostanziale differenza fra il campione SP e il campione SD, giudicando di migliore qualità il campione SD. Vista la netta diversità riscontrata fra i campioni, da tutti i componenti del panel, non è stato necessario eseguire un test triangolare (Meilgaard *et al.*, 1985).

3.1.5 - Analisi del colore

Il colore è una delle componenti più importanti della pasta fresca ed è influenzato dal tipo di materia prima presente nella formulazione (Pagani *et al.*, 1999), dal tipo di lavorazione che l'impasto subisce in fase di laminazione (Zardetto *et al.*, 2003) e dal trattamento termico a cui il prodotto è sottoposto (Zardetto & Dalla Rosa, 2005).

La seada, caratterizzata da un colore bianco, dopo la pastorizzazione subisce un viraggio di colore verso il giallo a causa di diverse reazioni biochimiche. Dall'analisi colorimetrica ottenuta utilizzando lo spazio di colore di Hunter è stata determinata la coordinata tristimolo Z. Questo parametro di colore è definito indice di giallo e diminuisce significativamente dopo il trattamento di pastorizzazione. I dati ottenuti hanno evidenziato una diminuzione significativa dell'indice di giallo, con conseguente progressivo aumento del parametro b (coordinata giallo/blu). Per quanto riguarda il valore di L abbiamo notato una diminuzione, in disaccordo con quanto riportato in letteratura (Gris & Sensidoni, 2005). Nelle paste fresche, infatti, l'aumento della luminosità in seguito ad un trattamento termico è conseguenza della traslucenza dovuta alla gelatinizzazione dell'amido. Nel nostro caso, però, la contemporanea presenza di una matrice lipidica (strutto) può aver superato gli effetti di aumento dati dall'amido.

3.2 - Conservazione

3.2.1 - Analisi dei gas

La concentrazione di ossigeno misurata nello spazio di testa delle confezioni in atmosfera modificata era pari a 0 % alla partenza, ed è lievemente aumentata sino a 0,35%, per mantenersi poi costante durante tutto il periodo della sperimentazione. L'anidride carbonica invece, è diminuita leggermente passando dal 50% al 45%, per via probabilmente di un piccolo assorbimento da parte del dolce.

3.2.2 - Analisi microbiologiche

Le analisi microbiologiche, come indicato in Tab. 5, eseguite il giorno stesso della produzione e prima del confezionamento, hanno mostrato una ridotta carica microbica. In particolare, è stata rilevata una limitata crescita di clostridi e di sporigeni aerobi, che passati indenni al trattamento di pastorizzazione, sono aumentati durante la conservazione senza però oltrepassare i limiti di legge. Tra il settimo e il quattordicesimo giorno il campione AO ha presentato una crescita di muffe, visibili ad occhio nudo, prima sulla piastra e poi sulla superficie del prodotto (Fig. 13-14). Per tale motivo su questo campione è stata interrotta la sperimentazione e non sono state effettuate ulteriori analisi. Nel campione AM, invece, non è stato rilevato sviluppo di muffe per tutta la durata della

sperimentazione, e il numero degli altri gruppi microbici analizzati si è mantenuto costante durante tale periodo.

3.2.3 - Analisi sensoriale

L'analisi sensoriale ha permesso di valutare l'accettabilità delle seadas durante la conservazione per entrambi i metodi di confezionamento (Fig. 15). Nel primo giorno di campionamento gli assaggiatori hanno attribuito al prodotto non confezionato un punteggio globale di 5,59. Al settimo giorno tale punteggio è diminuito di 0,2 e di 0,3 punti rispettivamente per l'AO e per l'AM. In questo giorno di campionamento l'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative fra le due tesi.

Nelle altre date di campionamento il test è stato effettuato unicamente nella tesi AM. I risultati, durante la conservazione, hanno evidenziato una variazione significativa per i parametri del colore, della friabilità e della masticabilità, e non significativa per l'intensità olfattiva, per l'acidità, per l'aroma e per l'off-flavour. Si è avuto un aumento del punteggio per il colore ed una diminuzione per la friabilità e per la masticabilità, anche se comunque non è mai stato inferiore al punteggio di 5. Il giudizio complessivo comunque, è sempre stato intorno al "buono" e non è mai stato inferiore alla soglia di accettabilità (Tab. 6).

3.2.4 - Analisi fisico chimiche

I risultati delle analisi fisico-chimiche sono riportati nella Tab. 7.

La tesi AO, durante la conservazione, non ha mostrato variazioni significative né per il pH, né per l' a_w , mentre la sostanza secca è aumentata significativamente sia nel ripieno, che nella pasta.

Per la tesi AM invece, nell' a_w non si è osservata nessuna variazione significativa, infatti il valore di 0,97 misurato alla partenza si è mantenuto costante durante tutta la sperimentazione, sia nella pasta, che nel ripieno. È importante osservare che tale valore, se pur al limite, rientra ancora nei limiti di legge secondo il D.P.R n° 187/2001 Art.9.

L'analisi dei valori del pH del ripieno non ha evidenziato differenze statisticamente rilevanti durante tutta la conservazione. Nella sfoglia si è osservata invece un'acidificazione significativa di 0,3 punti. Ciò probabilmente, è da imputare alla lieve dissoluzione della CO₂ nel prodotto, favorita dalle caratteristiche del prodotto stesso e dalle temperature di refrigerazione utilizzate nella conservazione. Ricordiamo, che la CO₂ è solubile negli alimenti ad alto contenuto di acqua e di grassi, e che la solubilità aumenta con il diminuire della temperatura (Lupatini, 2002).

Il valore della sostanza secca della sfoglia alla partenza e alla fine della sperimentazione è del 69% e del 70% rispettivamente. Dai dati analitici si evidenzia che durante la conservazione essa tende ad aumentare e/o diminuire con scostamenti dal valore iniziale intorno all'1-2%.

Il ripieno invece, presenta valori iniziali del 53% e aumenta significativamente durante la conservazione fino a 58,8%.

4 - Conclusioni

I parametri di processo utilizzati nella pastorizzazione hanno permesso di ottenere un prodotto più sicuro dal punto di vista igienico sanitario e qualitativamente superiore dal punto di vista sensoriale. Il trattamento termico impostato ha avuto effetti letali su tutte le forme vegetative (patogene e non) determinando una riduzione microbica di 4 unità logaritmiche della CBT. Per le forme sporigene, invece, (come ci si aspettava), la carica non è diminuita ma è rimasta costante, il trattamento in questo caso è risultato inefficace.

La tecnologia di confezionamento in atmosfera protettiva, ossia la sostituzione dell'aria presente all'interno della confezione con una miscela di gas 50% CO₂ e 50% N₂, ha permesso di estendere la vita commerciale del prodotto. Infatti, mentre le seadas confezionate secondo la metodica comunemente impiegata in azienda presentavano sviluppo superficiale di muffe già al decimo giorno di conservazione, le seadas confezionate in atmosfera protettiva al quarantaduesimo giorno erano ancora commerciabili. L'effetto inibitorio dell'anidride carbonica sui microrganismi in un sistema alimentare dipende, oltre che da fattori intrinseci (pH, a_w), anche dalla percentuale di CO₂ utilizzata e dalla concentrazione residua di

ossigeno. Le nostre condizioni sperimentali (percentuale di anidride carbonica 50% e residuo di ossigeno 0,35%) sono risultate ideali per inibire la crescita di tali microrganismi, inoltre, la piccola percentuale di CO₂ assorbita dal prodotto non ha provocato nessun sgradevole "effetto vuoto". Alla fine della sperimentazione non solo i parametri microbiologici rientravano ancora nei limiti di legge, ma anche la valutazione sensoriale dava risultati più che positivi sul prodotto. L'analisi sensoriale abbinata alle classiche analisi, si è dimostrata un ottimo strumento per la definizione della qualità finale del prodotto in termini di colore, d'intensità olfattiva, di acidità, di aroma, di off-flavour, di friabilità della pasta e di masticabilità.

Sperimentazione "Formaggelle"

IV

1. - Introduzione

Le formaggelle sono dolci da forno tipici prodotti in Sardegna (Fig. 16). Sono composti da una sfoglia di pasta fresca (short con strutto) che racchiude un ripieno di formaggio di vacca o di pecora, miscelato con tuorlo d'uovo, zucchero e sostanze aromatizzanti. Anche questo dolce fa parte dell'elenco dei prodotti tradizionali della regione Sardegna. Diffuso in tutto il territorio regionale tradizionalmente veniva preparato in occasione della Pasqua.

Questo prodotto dolciario, caratterizzato da una percentuale di umidità del 30% e da valori medi di a_w intorno allo 0,92, rientra nella categoria dei prodotti da forno ad umidità intermedia (Smith & Simpson, 1995; Jones, 2000). I prodotti con tali caratteristiche vanno incontro ad un rapido decadimento qualitativo per crescita di microrganismi, in particolare muffe, e per trasformazioni strutturali e chimico-fisiche (Smith *et al.*, 2004).

Per aumentare la shelf life di questi prodotti occorre innanzitutto prevenire lo sviluppo di microrganismi e quindi rallentare il decadimento strutturale tipico dei prodotti da forno (Cauvain, 1998). Questi risultati possono essere raggiunti in modo diverso: riducendo quanto più possibile la contaminazione microbica durante il confezionamento, riducendo l' a_w dell'alimento, modificando la formulazione dei prodotti (Smith *et al.*,

1990), utilizzando degli additivi (Sofos, 1989; Grundy, 1996; Legan & Voysey, 1991) ed infine utilizzando l'imbballaggio più appropriato (Smith & Simpson, 1995; Guynot *et al.*, 2003a; Guynot *et al.*, 2003b; Smith *et al.*, 2004).

Scopo del lavoro è stato quello di allungare la shelf life delle formaggelle tradizionali prodotte in un'azienda artigianale. Lo sviluppo di muffe sulla superficie del dolce permette all'azienda di mantenere il prodotto nei punti vendita per soli 7 giorni.

Per risolvere questi problemi si è preferito non intervenire sulla formulazione del prodotto, né utilizzare additivi, che poco si sposerebbero con la definizione di prodotto caratteristico. La nostra attenzione si è quindi focalizzata sull'impiego di nuove tecnologie di confezionamento, in particolare si è pensato di utilizzare l'atmosfera modificata e gli assorbitori di ossigeno.

Per i prodotti da forno, di norma, vengono impiegate miscele di gas costituite da CO₂ e N₂; l'ossigeno non viene impiegato in quanto è individuato spesso come fattore chiave della limitata shelf life, in quanto oltre a facilitare lo sviluppo di microrganismi aerobi favorisce i processi di ossidazione, responsabili delle variazioni di colore, sapore, e degradazione delle sostanze nutritive (Suppakul *et al.*, 2003).

Tra le tecniche innovative di confezionamento figura anche l'uso degli "assorbitori di ossigeno". Si tratta di sostanze in grado di eliminare l'ossigeno presente all'interno della confezione degli alimenti, garantendo

concentrazioni nello spazio di testa, inferiori allo 0,01%. Negli ordinari sistemi di gas packaging, normalmente si raggiungono concentrazioni di O₂ dello 0,2% (Hurme *et al.*, 2002), tali livelli, sono molto spesso insufficienti ad inibire lo sviluppo di muffe e di microrganismi aerobi (Nakamura *et al.*, 1983).

2. - Materiali e metodi

2.1 - Tecnologia di produzione

Le formaggelle sono state fornite da un produttore locale. Gli ingredienti utilizzati sono i seguenti e nelle seguenti proporzioni:

Per la pasta:

- Farina 70%
- Strutto 15%
- Acqua
- Sale (q.b.)

Per il ripieno:

- Formaggio fresco di pecora 75%
- Zucchero 11%
- Semola 4%
- Uva sultanina 4%
- Uova 4%
- Scorza di arancia e aromi 2%

L'impasto, ottenuto dalla lavorazione degli ingredienti della pasta in un'impastatrice ad asse verticale circa per 20 minuti, liscio e compatto, è stato laminato meccanicamente fino ad ottenere una sfoglia di 6-8 mm di spessore. Tale sfoglia è stata suddivisa in forme circolari di circa 12 cm di diametro. Nel centro della sfoglia, per mezzo di una macchina colatrice, sono stati posizionati gli ingredienti del ripieno, opportunamente miscelati.

Il bordo della sfoglia è stato poi sollevato manualmente e pizzicato attorno al ripieno. Il prodotto così ottenuto è stato cotto in forno con piattaforma girevole (Mod. RotoReal SP, Real Forni, Verona, Italy) a 180 °C per 15 minuti, raffreddato a temperatura ambiente e confezionato.

2.2 - Confezionamento e conservazione

Le formaggelle impiegate per le analisi sono state confezionate seguendo quattro diversi protocolli sperimentali:

- Atmosfera ordinaria (controllo).
- Atmosfera modificata 70% N₂ e 30% CO₂ (70/30).
- Atmosfera modificata 20% N₂ e 80% CO₂ (20/80).
- Assorbitori di ossigeno (AP) (Fig. 17).

In ciascun vassoio sono state posizionate due formaggelle. Per il controllo è stato utilizzato un film non barrierato ai gas, secondo la metodica comunemente utilizzata in azienda. Per gli altri protocolli si sono utilizzati: vassoi in polistirolo espanso estruso laminato (Aerpack B5-30, Coopbox Italia, Reggio Emilia, Italy) con le seguenti permeabilità ai gas: O₂, 1,07 cm³ m⁻² 24h⁻¹ bar⁻¹ a 23°C; CO₂, 5,35 cm³ m⁻² 24h⁻¹ bar⁻¹ a 23°C; vapore acqueo, 63 g m⁻² 24h⁻¹ at 38°C; film multistrato barrierato ai gas e all'acqua (EVOH/OPET/PE), (EOM 360B, Sealed Air, USA) con le seguenti permeabilità ai gas: O₂, 4 cm³ m⁻² 24h⁻¹ bar⁻¹ a 23°C; CO₂, 13 cm³ m⁻² 24h⁻¹ bar⁻¹ at 23°C; vapore acqueo, 9 g m⁻² 24h⁻¹ at 38°C (Fig. 18). Per la

tesi AP, si è posizionato all'interno della confezione un sacchetto di assorbitore di ossigeno (ATCO FT 210, Standa Industrie, France). Il confezionamento è stata realizzato tramite una confezionatrice "sottovuoto compensato" (Mod. Reetray 250, Reepack s.r.l., Seriate, Italia).

Le formaggelle conservate a 20 °C in cella termostata sono state analizzate ad intervalli regolari di tempo di 0, 7, 14, 27, 34 e 48 giorni.

2.3 - Analisi

Per valutare la shelf life delle formaggelle ad ogni campionamento sono state condotte le seguenti determinazioni:

- Determinazioni microbiologiche.
- Determinazioni chimico fisiche.
- Determinazioni strutturali.
- Determinazioni sensoriali.
- Analisi dei gas.

2.3.1 - Determinazioni microbiologiche

Preparazione del campione

Le determinazioni microbiologiche sono state condotte in triplo, per ciascuna tesi si è utilizzata una singola confezione. Le formaggelle prelevate asetticamente sono state tritate manualmente all'interno di

buste stomacher. Un quantitativo pari a 10 grammi è stato prelevato per la preparazione della sospensione madre e per le successive diluizioni scalari. Da tali sospensioni è stato prelevato un opportuno quantitativo per la semina o l'inclusione nel terreno di coltura specifico, per ogni tipologia d'analisi e secondo le indicazioni riportate di seguito.

Conta microbica totale

Preparazione del terreno di coltura

Per la preparazione è stato impiegato il terreno PCA (Oxoid, Milano, Italy).

Semina del campione

Il campione, preparato secondo le opportune diluizioni, è stato seminato per inclusione secondo un'aliquota di 1000 μ L per piastra. La conta delle UFC è stata effettuata dopo l'incubazione a 30 °C per 48 ore. Sono state prese in considerazione le piastre che rientravano nell'intervallo 30–300 UFC. Il risultato è stato espresso in UFC/g.

Lieviti e muffe

Preparazione del terreno

Per l'analisi delle muffe e dei lieviti è stato utilizzato il terreno di coltura YPD, preparato nel seguente modo:

- 1% di estratto di lievito;
- 2% di bacto - peptone;

- 2% di glucosio;
- 1% di agar;

Semina del campione

Il campione, preparato secondo le opportune diluizioni, è stato seminato per spandimento, secondo un'aliquota di 500 µL per piastra. Le piastre sono state incubate alla temperatura di 25 °C e le letture sono state effettuate a 48 ore per i lieviti e a 96 ore per le muffe. La conta è stata eseguita per ciascuna diluizione e sono state prese in considerazione le conte che rientravano nell'intervallo 30–300 UFC/piastra. Il risultato è stato espresso in UFC/g.

Staphylococcus spp

Preparazione del terreno di coltura

Per la ricerca dello *Staphylococcus* è stato utilizzato il mezzo colturale Baird Parker Agar (Oxoid) con aggiunta di Tellurite Yolk Emulsion (Oxoid).

Semina del campione

Il campione è stato seminato per spatolamento superficiale secondo un quantitativo di 500 µL su piastra per ciascuna diluizione. Dopo l'incubazione a 37 °C per 48 ore, è stata eseguita la conta su tutte le diluizioni. Sono state considerate le piastre in cui il numero delle colonie era compreso fra 30–300 UFC/piastra. Il risultato è stato espresso in UFC/g. Le colonie sospette "tipiche" (nere o grigie, lucenti e convesse con

marginie opalescenti, biancastro circondate da aloni trasparenti) sono state prelevate con ansa e sottoposte al test della coagulazione. Il risultato è stato espresso in UFC/g.

2.3.2 - Determinazioni chimico fisiche

Preparazione dei campioni

Le determinazioni chimico fisiche, effettuate sulle formagge precedentemente utilizzate per le prove strutturali, sono state condotte in triplo sia sulla sfoglia che sul ripieno opportunamente omogeneizzati.

pH

Il pH è stato misurato utilizzando un elettrodo combinato (mod. Double Pore, Hamilton, Reno, USA) per solidi e semi-solidi collegato mediante uno strumento misuratore del pH (modello 710/A, Orion research inc., Beverly, USA). La taratura dello strumento è stata effettuata all'inizio di ogni sessione di prova, utilizzando soluzioni tampone a pH noto nei punti di pH 4,01 e 7.

Umidità

Il contenuto di umidità è stato determinato mediante stufa sotto vuoto per 12 ore a 70°C, secondo la metodica ufficiale riportata nell' "Official Methods of Analysis" (AOAC, 1990).

Attività dell'acqua

L'analisi dell'attività dell'acqua è stata condotta attraverso l'impiego di un igrometro AW-Win Hygroskop Rotronic "Pbi international", modello BT – RS1, Svizzera. I campioni da analizzare nel quantitativo di 1-2 grammi sono stati stratificati all'interno di una capsula monouso in materiale plastico e posto all'interno del contenitore sonda. Il valore è stato letto al quinto minuto successivo all'equilibrio. Lo strumento è stato calibrato con soluzioni di LiCl in un range di attività di 0,1- 0,95 (Labuza, *et al.*, 1976).

2.3.3 - Determinazioni strutturali

Caratteristiche dell'analizzatore di "Texture"

L'analizzatore di "texture" utilizzato è il TA.XT2 (Stable Micro Systems, Surrey, UK). Il modello è quello a braccio singolo, sviluppato specialmente per gli usi alimentari. Ha una capacità di forza di 5, 25 e 50 kg e velocità del braccio programmabile da 0,1 a 10 mm al secondo. Lo strumento è connesso ad una tastiera di controllo ed ad un Personal Computer, tramite apposita interfaccia e software dedicato (Texture Expert Ver. 1.21). L'interfacciamento con il PC permette di vedere i dati sotto forma di grafico, su cui possono essere svolte molteplici operazioni, quali: trovare picchi multipli, calcolare gradienti, aree, medie e salvare i dati su dischi. E' possibile inoltre creare curve, medie o di minimo-massimo e fare confronti tra queste e nuovi test. Lo strumento, misurando

forza, distanza e tempo, permette di costruire grafici tridimensionali. Dai dati acquisiti è possibile costruire macro di calcolo. Il braccio, che contiene la cella di carico, può essere connesso ad un numero veramente elevato di sonde, circa 1500, di cui oltre un centinaio solo per usi alimentari. Lo strumento è veloce, facile da usare, fornisce dati riproducibili, è estremamente versatile. Inoltre il software può essere aggiornato online, ed è possibile, tramite contatto con il centro di assistenza nazionale un rapporto diretto per sviluppare nuovi test, creare macro di calcolo e anche nuove sonde.

Analisi di struttura

La durezza delle formaggelle e la sua evoluzione durante la conservazione è stata valutata tramite lo strumento e il software descritto precedentemente, utilizzando una cella di carico di 50 kg. Le determinazioni di texture sono state condotte su quattro formaggelle per tesi utilizzando le seguenti sonde:

- sistema con lama per le prove di taglio (mod. HDP/BS);
- cilindro di 5 mm di diametro per il test di penetrazione (mod. P/5).

In entrambi i casi le formaggelle sono state tagliate o penetrate totalmente, nell'intento di verificare eventuali differenze nelle caratteristiche strutturali della superficie, e dell'interno. Per far ciò il piatto di supporto è stato sostituito da:

- un supporto con fenditura per il passaggio della lama, che fungeva da guida della lama e, contemporaneamente, teneva ben in sede il campione per il test di taglio;
- un supporto per il campione, che permetteva una completa penetrazione, fornito di un foro da 6 mm di diametro per il test di penetrazione.

I parametri riportati per ciascuna delle due prove sono riportati nella Tab.8. Il test è stato condotto secondo i seguenti criteri:

- nel taglio, i campioni sono stati sistemati in posizione centrale al di sotto della lama;
- nella penetrazione, i campioni sono stati sistemati centralmente sopra il piatto.

Prima di ogni test è stata eseguita la calibrazione della cella di carico e della sonda. Il campione per il taglio è stato preparato tagliando da due formaggelle quattro strisce delle dimensioni di sei cm di lunghezza e due cm di larghezza contenenti da un lato la crosta esterna (Fig. 19). Per il test di compressione le formaggelle sono state penetrate in sei punti, quattro situati ad un cm dal bordo e due in posizione centrale (Fig. 20-21). La variazione delle caratteristiche di "texture" è stata seguita calcolando diversi indici rappresentativi la "durezza" dei campioni. In particolare, si è seguito un andamento del tipo forza (g) su distanza (mm) e si sono calcolati i seguenti tre indici:

- Area sottesa dalla curva (g mm), calcolata dal momento in cui la sonda tocca la formaggella fino alla sua fuoriuscita (Papantoniou *et al.*, 2003).
- Gradiente (g/mm), calcolato dal momento in cui la sonda tocca la formaggella fino alla forza massima di rottura.
- Sforzo massimo (g).

2.3.4 - Determinazioni sensoriali

La valutazione sensoriale è stata effettuata mediante un test di accettabilità seguendo gli standards IDF 99B (1995), con un panel interno al laboratorio di 32 giudici non addestrati. A ciascun giudice è stata fornita una scheda di valutazione per tesi in cui era richiesto di esprimere un voto relativamente alle caratteristiche del colore, dell'intensità olfattiva, del gusto e della consistenza. Il punteggio è stato riportato su una scala edonistica a 7 punti con punteggio minimo di accettabilità pari a 4.

2.3.5 - Analisi dei gas

La composizione dei gas all'interno delle confezioni è stata misurata durante la conservazione tramite un gas analizzatore (Mod. Combi Check 9800-1, PBI-Dansensor, Denmark). Le misurazioni sono state effettuate ad ogni campionamento su tre vaschette.

2.3.6 - Analisi statistica

L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata con il software statistico Statistica 6.0 per Windows. Si è eseguita l'ANOVA ad una via, dove il predittore categoriale era rappresentato dal periodo di conservazione. La differenza fra le medie è stata valutata applicando la formula Duncan's Multiple Range Test con un livello $p \leq 0,05$.

Il lavoro in oggetto è stato eseguito due volte. La seconda sperimentazione conferma quanto ottenuto nella prima, per questo motivo nella sezione "risultati e discussione" sono riportati i risultati di una singola prova.

3. – Risultati e discussione

3.1 - Analisi dei gas

La concentrazione di O₂ misurata nello spazio di testa delle confezioni in atmosfera modificata, era pari a 0% alla partenza ed è aumentata durante la conservazione fino a 0,40%. Nelle confezioni conservate con gli assorbitori di ossigeno, 24 ore dopo la chiusura della confezione, la concentrazione di O₂ misurata era pari a 0%. Tale valore si è mantenuto costante per tutta la durata della sperimentazione.

Questi dati confermano quanto già scritto da altri autori sui prodotti da forno (Guynot *et al.*, 2003a; Guynot *et al.*, 2003b). Gli assorbitori riescono a garantire concentrazioni di O₂, nello spazio di testa delle confezioni, inferiori allo 0,01%. Tali concentrazioni non si possono ottenere con i normali sistemi di gas packaging anche se, come abbiamo visto, l'aumento di O₂ nelle confezioni in atmosfera modificata risulta essere molto limitato. Per quanto riguarda la concentrazione della CO₂ nelle vaschette in atmosfera protettiva si è notata una diminuzione non superiore al 3%.

3.2 - Determinazioni microbiologiche

Le formaggelle possiedono un valore di a_w di 0,91-0,92, in tale intervallo è favorita la crescita di muffe e di lieviti mentre è sfavorita la crescita di patogeni, a parte gli stafilococchi.

Il mezzo colturale PCA al primo campionamento, e per tutte le tesi, 48 ore dopo la semina ha presentato una bassa crescita microbica, mentre il BP e il YPD non hanno evidenziato nessuna colonia (Tab. 9). Nel controllo, a sette giorni di conservazione, sono apparse colonie di muffe visibili sia sulla superficie della formaggella sia sulla piastra (Fig. 22). Per questa tesi è stata interrotta la sperimentazione e non sono state effettuate ulteriori analisi. Nella tesi 70/30 le muffe sono apparse al quattordicesimo giorno di conservazione, mentre nella 20/80 le muffe sono cresciute quarantottesimo giorno di conservazione solo sulla piastra, con una carica di $7,0 \times 10^3$ UFC/g (Tab. 9). Tali risultati mostrano una relazione abbastanza marcata tra la crescita di muffe e la concentrazione di CO₂. Nella tesi AP, per tutta la durata della sperimentazione, non è stata osservata nessuna colonia di muffa.

L'effetto inibitorio dell'anidride carbonica sui microrganismi in un sistema alimentare dipende, oltre che da fattori intrinseci (pH, a_w), anche dalla percentuale di CO₂ utilizzata e dalla concentrazione di residua di ossigeno. Le muffe sono per definizione microrganismi strettamente aerobi e la quantità di ossigeno all'interno della confezione risulta un fattore importante per la crescita del microrganismo. Diversi studi hanno messo in evidenza che le muffe possono crescere in presenza di elevate concentrazioni di anidride carbonica, se presente una quantità di ossigeno residuo sufficiente (Bogatdke, 1979). Smith *et al.* (1986) riportano concentrazioni minime di ossigeno per la crescita di *Penicillium* spp., dello

0,4% in atmosfere costituite dal 60% di anidride carbonica. Abellana *et al.* (2000) hanno messo in evidenza che, al diminuire della concentrazione dell'anidride carbonica, il livello di ossigeno influenza in misura maggiore la cinetica di crescita del microorganismo (Ooraikul, 1991; Seiler, 1989; Stöllman *et al.*, 1994). I nostri risultati confermano quanto riportato in letteratura.

Durante la conservazione per tutte le tesi analizzate non si è osservata alcuna contaminazione stafilococcica. La carica degli aerobi mesofli, sul mezzo PCA, arriva fino a 10^4 e 10^5 UFC/g rispettivamente per le tesi 70/30 e 20/80. Nessuna crescita è stata invece osservata per la tesi AP

3.3 - Determinazioni chimico-fisiche

I risultati delle analisi chimico-fisiche sono riportati in Tab. 10.

I valori dell'attività dell'acqua, più elevati nel ripieno piuttosto che nella pasta, sono diminuiti significativamente durante la conservazione e per tutte le tesi analizzate.

Il contenuto di umidità misurato alla partenza era rispettivamente di 32,02 e 27,03% per il ripieno e per la pasta ed è diminuito significativamente in tutte le tesi durante la conservazione. Tale diminuzione è da attribuire principalmente alla richiesta di umidità da parte dello spazio di testa della confezione per il ripristino dell'equilibrio interno (Esse & Saari, 2004).

Per quanto riguarda il pH del ripieno non sono state riscontrate differenze significative durante la conservazione. Per la pasta invece si è osservata

una acidificazione in tutte le tesi analizzate, ciò probabilmente imputabile alla lieve dissoluzione della CO₂ nel prodotto.

3.4 - Determinazioni strutturali

I grafici ottenuti dal test di taglio e dal test di compressione sono tra loro molto simili, si discostano solamente per i valori corrispondenti delle forze (Fig. 23-24) e per la prima parte del grafico. Nel test di taglio infatti, la lama nei primi mm di penetrazione risente la presenza, su di un lato, del bordo della formaggella.

Nel test di compressione la sonda penetra interamente la formaggella, il grafico risultante ha un aspetto a cuspidate derivante dal progressivo aumento della forza durante la penetrazione. Il picco massimo del grafico rilevato tra 10 e 15 mm di corsa della sonda, corrisponde alla forza necessaria per deformare la superficie della formaggella, prima che la sonda la tagli e la penetri completamente. La forza dopo aver raggiunto il punto massimo diminuisce drasticamente; la sonda, infatti, dopo aver deformato e fratturato lo strato superficiale incontra la parte morbida del ripieno. Il profilo del grafico è assimilabile a quello di tipo C descritto da Bourne (1979).

L'evoluzione degli indici di struttura delle diverse tesi è riportato in Tab. 11. I risultati del test di penetrazione dimostrano un indurimento per il controllo durante la conservazione, sia della parte superficiale per un aumento della forza massima, sia per il ripieno per l'aumento dell'area e

del gradiente. La tesi 70/30 durante la conservazione non ha mostrato differenze significative per gli indici analizzati, mentre nelle tesi 20/80 e AP si osserva un aumento significativo degli indici dopo il quattordicesimo giorno. La tesi AP recupera i valori iniziali all'ultimo giorno di campionamento.

Il test di taglio non ha mostrato la stessa accuratezza del test di penetrazione nel discriminare le variazioni di texture delle formaggelle.

L'indurimento delle formaggelle durante la conservazione può essere certamente attribuito ad una perdita di acqua nello spazio di testa della confezione.

3.5 - Determinazioni sensoriali

I risultati hanno evidenziato una diminuzione significativa dei parametri rilevati colore, intensità olfattiva, gusto e consistenza in tutti i campioni esaminati. I punteggi di ogni singolo descrittore non sono mai stati inferiori alla soglia di accettabilità, ad eccezione della tesi assorbitori al quarantottesimo giorno per il gusto e per la consistenza. Il punteggio di accettabilità globale non è comunque, mai stato inferiore alla soglia di accettabilità. I risultati sono mostrati in Tab. 12.

4. - Conclusioni

Il principale fattore limitante la durata commerciale delle formaggelle, come si è potuto facilmente osservare, è la crescita di muffe. Nello studio da noi effettuato il campione confezionato secondo la metodica comunemente impiegata in azienda, a causa dei suoi alti valori di umidità e di attività dell'acqua, presenta uno sviluppo di muffe già al settimo giorno di conservazione.

L'intervento delle atmosfere modificate e degli assorbitori di ossigeno hanno permesso di estendere significativamente la shelf life delle formaggelle. Il risultato peggiore, a parte il controllo, si è avuto con la tesi 70/30, mentre quello migliore con la tesi AP. Gli assorbitori di ossigeno hanno permesso di allungare la vita commerciale del dolce fino a 48 giorni. In questa tesi quindi, alla fine della sperimentazione non solo non si è avuta crescita di microrganismi, ma anche la valutazione sensoriale ha dato risultati positivi sul prodotto. Un problema riguardante l'utilizzo degli assorbitori di ossigeno negli alimenti da parte del consumatore, potrebbe riguardare la presenza di "un corpo estraneo" nella confezione. Molte ricerche sono orientate alla risoluzione di queste problematiche, un'ipotesi di soluzione potrebbe essere quella di mimetizzare la bustina con sostanze assorbenti nell'involucro dell'imballaggio, oppure di utilizzare film plastici con l'assorbitore inglobato nella matrice polimerica.

V. - Tabelle

Tab. 1. - Gas d'imballaggio.

Gas	Solubilità^a	PM (g/mol)	Densità (Kg/m³)^b	N° CEE	Applicazioni generali
CO ₂	0,8780	44,011	1,977	E 290	Surgelazione, MAP, gasatura e spinta bevande, termoregolazione, trasporti refrigerati
Ar	0,0336	39,940	1,784	E 938	Applicazioni in via di sviluppo
He	0,0088	4,002	0,179	E 939	Controllo dell'ermeticità delle confezioni per spettrometria di massa
N ₂	0,1557	28,014	1,250	E 941	Surgelazione, ,MAP, spinta e inertizzazione liquidi, termoregolazione
N ₂ O	0,6295	44,013	1,980	E 942	Panne erogabili (schiume)
O ₂	0,0314	32,000	1,429	E 948	MAP (carni rosse/vegetali)

^a coefficiente di assorbimento di Bunsen (cm³ gas/cm³H₂O)

^b T= 0 °C, P=1,013 bar

Tab.2 - Esempi di confezionamento.

Prodotti	Temperature	O₂	CO₂	N₂
<i>Carne</i>				
Manzo	0-2	40-80	20	20-60
Pollo	0-2	0	20-100	0-80
Maiale	0-2	40-80	20	20-60
<i>Pesce</i>				
Pesce azzurro	0-2	30	40	30
Salmone	0-2	30	40	30
Scampi	0-2	30	40	30
Gamberi	0-2	30	40	30
<i>Frutta e vegetali</i>				
Mela	0-4	1-3	0-3	94-96
Broccoli	0-1	3-5	10-15	80-87
Sedano	2-5	4-6	3-5	89-93
Lattuga	<5	2-3	5-6	91-93
Pomodoro	7-12	4	4	92
<i>Prodotti da forno</i>				
Pane	Temp. ambiente	0	60	40
Torte	Temp. ambiente	0	60	40
Frittelle	Temp. ambiente	0	60	40
Crepes	Temp. ambiente	0	60	40
<i>Pasta</i>				
Pasta	2-4	0	80	20
Pizza	5	0	50	50

Tab. 3 - Caratterizzazione microbiologica della seadas (pasta e ripieno) prima (SP) e dopo (SD) il trattamento di pastorizzazione.

	Parte	CBT Ufc/g	Enterobatteri Ufc/g	SCP ^x Ufc/g	SCN ^y Ufc/g	Muffe Ufc/g	Lieviti Ufc/g	Salmonella Ufc/g	Clostridi (MPN)	Sporigeni Aerobi
SP	Ripieno	3,5x10 ⁶	2,2x10 ⁵	<10	4,5x10 ³	<10	4x10 ²	assente	9	6x10
SD	Ripieno	3x10 ²	<10	<10	6x10 ²	<10	<10	assente	<3	2x10
SP	Pasta	1,15x10 ⁵	9,8x10 ³	<10	1x10 ³	<10	6x10	assente	4	10
SD	Pasta	4x10 ¹	<10	<10	1x10 ²	<10	<10	assente	4	10

^x Stafilococchi coagulasi positivi.

^y Stafilococchi coagulasi negativi.

Tab. 4. - Valori chimico-fisici delle sedas prima e dopo il trattamento termico

Tesi	Parte	a_w	Sostanza secca	pH
^xSP	Ripieno	0,97a*	52,81a	5,78a
^ySD	Ripieno	0,97a	52,81a	5,67b
SP	Pasta	0,97a	76,22b	6,18a
SD	Pasta	0,97a	69,76a	6,07b

*Dati seguiti da lettere diverse all'interno di ogni tesi e colonna differiscono significativamente secondo il Duncan's Multiple Range Test con un livello di P <0.05.

^xSP: Sedas prima della pastorizzazione.

^ySP: Sedas dopo a pastorizzazione.

Tab. 5. – Evoluzione microbiologica delle seadas confezionate in atmosfera ordinaria (AO) e in atmosfera modificata (AM) durante la conservazione.

Microorganismi	Confezionamento	Tempo di conservazione						
		Parte	0	7	14	28	35	42
Conta B. totale	AO	Pasta	40	<10	25	—	—	—
		Ripieno	300	10	10	—	—	—
	AM	Pasta	—	25	50	<10	<10	<10
		Ripieno	—	<10	10	200	200	200
Enterobatteri	AO	Pasta	<10	<10	<10	—	—	—
		Ripieno	<10	<10	<10	—	—	—
	AM	Pasta	—	<10	<10	<10	<10	<10
		Ripieno	—	<10	<10	<10	<10	<10
Lieviti	AO	Pasta	<10	<10	<10	—	—	—
		Ripieno	<10	<10	<10	—	—	—
	AM	Pasta	—	<10	<10	<10	<10	<10
		Ripieno	—	<10	<10	<10	<10	<10
Muffe	AO	Pasta	<10	<10	70	—	—	—
		Ripieno	<10	<10	<10	—	—	—
	AM	Pasta	—	<10	<10	<10	<10	<10
		Ripieno	—	<10	<10	<10	<10	<10
Stafilococchi (SCN)	AO	Pasta	100	<10	<10	—	—	—
		Ripieno	600	<10	<10	—	—	—
	AM	Pasta	—	<10	<10	<10	<10	<10
		Ripieno	—	<10	<10	<10	<10	<10
Stafilococchi (SCP)	AO	Pasta	<10	<10	<10	—	—	—
		Ripieno	<10	<10	<10	—	—	—
	AM	Pasta	—	<10	<10	<10	<10	<10
		Ripieno	—	<10	<10	<10	<10	<10
Salmonella	AO	Pasta	Assente	Assente	—	—	—	—
		Ripieno	Assente	Assente	—	—	—	—
	AM	Pasta	—	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
		Ripieno	—	Assente	Assente	Assente	Assente	Assente
Clostridi	AO	Pasta	4	<3	<3	—	—	—
		Ripieno	<3	4	3	—	—	—
	AM	Pasta	—	4	6	3	<3	<3
		Ripieno	—	3	<3	3	3	3
Batteri sporigeni aerobi	AO	Pasta	20	<3	10	—	—	—
		Ripieno	10	50	60	—	—	—
	AM	Pasta	—	3	10	50	50	10
		Ripieno	—	40	10	100	100	100

Tab. 6. – Evoluzione degli attributi sensoriali delle seadas durante la sperimentazione

Confezionamento	Atmosfera ordinaria						Atmosfera modificata					
	0	7	14	28	35	42	0	7	14	28	35	42
Tempo di conservazione												
Colore	4,70b*	5,50a	—	—	—	—	4,70c	5,47b	5,77ab	6,00a	5,73ab	5,46b
Intensità olfattiva	5,67a	5,37a	—	—	—	—	5,67a	5,13a	5,63a	5,57a	5,37a	5,36a
Acidità	5,80a	5,40a	—	—	—	—	5,80a	5,43a	5,47a	5,40a	5,13a	5,29a
Aroma	5,33a	5,00a	—	—	—	—	5,33a	5,73a	5,17a	5,13a	4,77a	5,04a
Off-flavour	5,90a	5,23a	—	—	—	—	5,90a	5,27a	6,07a	5,57a	5,40a	5,46a
Friabilità	5,83a	5,57a	—	—	—	—	5,83a	5,47ab	5,50ab	5,53ab	5,07b	5,25b
Masticabilità	5,63a	5,63a	—	—	—	—	5,63a	5,53ab	5,50ab	5,40ab	5,01b	5,32b

*Dati seguiti da lettere diverse all'interno di ogni tesi e riga differiscono significativamente secondo il Duncan's Multiple Range Test con un livello di $P < 0.05$.

Tab. 7. – Evoluzione dei parametri chimico-fisici delle seadas durante la sperimentazione.

	Confezionamento		AO ^x		AM ^y	
	Tempo di conservazione	Ripieno	Pasta	Ripieno	Pasta	
pH	0	5,68a [*]	6,07a	5,68a	6,07a	
	7	6,01a	5,69a	5,68a	5,92b	
	14	—	—	5,60a	5,93b	
	28	—	—	5,56a	5,85c	
	35	—	—	5,61a	5,86c	
	42	—	—	5,60a	5,76d	
	0	0,970a	0,970a	0,970a	0,970a	
a _w	7	0,970a	0,971a	0,968a	0,970a	
	14	—	—	0,966a	0,967a	
	28	—	—	0,965a	0,962a	
	35	—	—	0,970a	0,963a	
	42	—	—	0,966a	0,966a	
	0	53,5%b	70,8%b	53,5%e	69,8%d	
SS	7	55,4%a	71,8%a	55,3%d	71,6%b	
	14	—	—	58,5%ab	68,1%e	
	28	—	—	57,0%bc	72,7%a	
	35	—	—	59,7%a	70,3%c	
	42	—	—	58,8%ab	70,1%cd	

*Dati seguiti da lettere diverse per ogni parametro e all'interno di ogni tesi e colonna differiscono significativamente secondo il Duncan's Multiple Range Test con un livello di P < 0.05.

^xAO: atmosfera ordinaria

^yAM: atmosfera modificata

Tab. 8 - Impostazioni dell'analizzatore di struttura TA.XT2 per le misurazioni della durezza mediante prove di taglio e penetrazione delle formaggelle.

Taglio		Penetrazione	
Modalità	Return to start	Modalità	Return to start
Velocità Pre-test	2 mm sec ⁻¹	Velocità Pre-test	2 mm sec ⁻¹
Velocità Test	2 mm sec ⁻¹	Velocità Test	1 mm sec ⁻¹
Velocità Post-test	10 mm sec ⁻¹	Velocità Post-test	5 mm sec ⁻¹
Distanza	35 mm	Distanza	30 mm
Sensibilità	Auto	Sensibilità	Auto
Forza	20 gr	Forza	30 gr
Distanza	mm	Distanza	mm
Forza	gr	Forza	gr
Sonda	Lama	Sonda	5 mm diametro cilindro

Tab 9 – Crescita (UFC/g) della flora microbica totale (PCA)^x, dei lieviti e delle muffe (YPD) degli *staphylococci* (BP) durante la conservazione delle formaggelle confezionate in MAP e in AP.

Terreni colturali	Confezionamento	Tempo di conservazione (giorni)					
		0	7	14	27	34	48
PCA	Controllo	1.4x10 ²	2.2x10 ⁵	- ^w	-	-	-
	70/30 ^y	1.4x10 ²	9.8x10 ³	2.1x10 ⁴	-	-	-
	20/80	1.4x10 ²	1.1x10 ⁴	1.2x10 ⁴	5.9x10 ⁵	1.2x10 ⁴	2.5x10 ⁵
	Assorbitori	1.4x10 ²	<10	<10	<10	<10	<10
YPD	Controllo	<10	4.2x10 ²	-	-	-	-
	70/30	<10	<10	<10	-	-	-
	20/80	<10	<10	<10	<10	<10	7.0x10 ³
	Assorbitori	<10	<10	<10	<10	<10	<10
BP	Controllo	<10	<10	-	-	-	-
	70/30	<10	<10	<10	-	-	-
	20/80	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	Assorbitori	<10	<10	<10	<10	<10	<10

^xPCA, Plate count agar; YPD, yeast peptone dextrose agar; BP, Baird Parker Agar.

^y70/30 = 70% N₂ e 30% CO₂; 20/80 = 20% N₂ e 80% CO₂.

^w Le analisi sono state interrotte per crescita di muffe, visibili ad occhio nudo sia sulla formaggella che sulla piastra.

Tab.10 – Evoluzione dei parametri chimico-fisici delle formaggelle durante la sperimentazione.

Tesi	Tempo di conservazione (giorni)	Parametri					
		a_w		Umidità (%)		pH	
		Pasta	Ripieno	Pasta	Ripieno	Pasta	Ripieno
Controllo	0	0.912a*	0.921a	37.02b	27.03a	5.42a	4.86a
70/30		0.912a	0.921a	37.02	27.03	5.42a	4.86a
20/80		0.912a	0.921a	37.02	27.03	5.42a	4.86a
Assorbitori		0.912a	0.921a	37.02	27.03	5.42a	4.86a
Controllo	7	0.912a	0.916b	28.66b	22.88b	5.32b	4.87a
70/30		0.907b	0.917b	35.29	25.63b	5.31b	4.88a
20/80		0.907b	0.918b	33.63b	23.45b	5.42a	4.90a
Assorbitori		0.909b	0.918b	35.64b	24.90b	5.35ab	4.91a
70/30	14	0.904c	0.913c	34.56b	24.61b	5.28b	4.88a
20/80		0.905bc	0.914c	32.24c	21.28c	5.23c	4.91a
Assorbitori		0.907bc	0.916bc	35.31b	23.83b	5.33b	4.91a
20/80	27	0.903c	0.911cd	27.88d	22.01c	5.13d	4.85a
Assorbitori		0.906c	0.914c	29.38c	22.43b	5.13c	4.89a
20/80	34	0.901cd	0.909d	25.80e	17.68d	5.32b	4.87a
Assorbitori		0.904cd	0.912cd	27.42d	17.70c	5.27b	4.90a
20/80	48	0.900d	0.908d	24.98e	17.09d	5.19c	4.87a
Assorbitori		0.902d	0.910d	27.08d	17.52c	5.04d	4.92a

*Dati seguiti da lettere diverse all'interno di ogni tesi e colonna differiscono significativamente secondo il Duncan's Multiple range Test con un livello di P <0.05.

Tab. 11 – Evoluzione degli indici di texture delle formagelle durante la conservazione.

Tesi	Tempo di conservazione (giorni)	Test di compressione						Test di taglio		
		Parte esterna(4 punti)			Parte interna (2 punti)			Forza massima (g)	Area (g . mm)	Gradiente (g mm ⁻¹)
		Forza massima (g)	Area (g . mm)	Gradiente (g mm ⁻¹)	Forza massima (g)	Area (g . mm)	Gradiente (g mm ⁻¹)			
Controllo	0	747b*	5649b	67b	638b	5733b	60b	7180a	49416a	416a
70/30		747a	5649a	67a	638b	5733a	60b	7180a	49416a	416a
20/80		747c	5649c	67d	638d	5733c	60c	7180cd	49416a	416b
Assorbitori		747c	5649c	67b	638c	5733b	60c	7180abc	49416ab	416bc
Controllo	7	971a	6970a	114a	846a	6862a	119a	7426a	47600a	546a
70/30		718a	6274a	99a	600b	5376a	75b	6830a	53598a	408a
20/80		651c	6274c	51d	552d	6165c	66c	10247ab	59868a	713a
Assorbitori		659c	6983b	76b	639c	6733a	77c	4544c	41582b	319c
70/30	14	713a	6973a	100a	737a	5544a	164a	7336a	55380a	503a
20/80		756c	6444c	91d	685cd	6542c	105c	6339d	50054a	382b
Assorbitori		657c	6498bc	76b	586c	6577a	64c	5154c	38364b	416bc
20/80	27	1080b	8004b	144c	1220b	8581b	211b	11713a	63434a	754a
Assorbitori		1236b	8048a	243a	1380a	7112a	324a	8972ab	59402a	630ab
20/80	34	2010a	12346a	285a	1905a	11664a	332a	8259bcd	55278a	557ab
Assorbitori		1436a	8791a	300a	997b	7051a	170b	9865a	60294a	778a
20/80	48	1180b	7475b	201b	998bc	6279c	204b	9772abc	56455a	824a
Assorbitori		651c	6199bc	101b	630c	5849b	128bc	6431bc	52648ab	411bc

*Dati seguiti da lettere diverse all'interno di ogni tesi e colonna differiscono significativamente secondo Duncan's Multiple Range Test con un livello di P <0.05.

Tab. 12 – Evoluzione dei descrittori sensoriali delle formaggelle durante la conservazione

Tesi	Tempo di conservazione (giorni)	Decrittori sensoriali				
		Colore	Intensità olfattiva	Gusto	Consistenza	Accettabilità
Controllo	0	5.00a*	5.00a	5.03a	4.91a	4.98a
70/30		5.00a	5.00a	5.03a	4.91a	4.98a
20/80		5.00a	5.00a	5.03a	4.91a	4.98a
Assorbitorir		5.00a	5.00a	5.03a	4.91a	4.98a
Controllo	7	4.77a	4.61a	4.32b	4.29b	4.50b
70/30		4.90a	4.35b	4.41b	4.26b	4.48b
20/80		4.87a	4.46ab	4.46ab	4.40ab	4.55bc
Assorbitori		4.73ab	4.46bc	4.53ab	4.60ab	4.58b
70/30	14	4.87a	4.59ab	4.75ab	4.47ab	4.67b
20/80		4.80a	4.20b	4.23b	4.26b	4.37c
Assorbitori		5.00ab	4.60ab	4.46ab	4.36ab	4.61b
20/80	27	5.13a	4.50ab	4.50ab	4.50ab	4.66b
Assorbitori		4.70ab	4.10c	3.90cd	4.40ab	4.27cd
20/80	34	4.96a	4.30b	4.40ab	4.4ab	4.52bc
Assorbitori		4.63b	4.56ab	4.27c	4.10bc	4.39bc
Assorbitori	48	4.73ab	4.03c	3.87d	3.87c	4.13d

Dati seguiti da lettere diverse all'interno di ogni tesi e colonna differiscono significativamente secondo Duncan's Multiple Range Test per $P < 0.05$.

VI. – Figure

Fig. 1 - Dolce seadas.



Fig. 2 – Impastatrice.



Fig. 3 - Laminatore



Fig. 4 – Seadatrice.



Fig. 5 – Pastorizzatore.



Fig. 6 - Data logger Micropack III.



Fig. 7 - Sistema per acquisizione/scarico dati.



Fig.8 - Particolare sonda inserita nel punto termico sfavorito della seadas.



Fig. 9 - Ventilatore uscita pastorizzatore.



Fig. 10 - Confezionatrice aziendale.



Fig. 11 - Confezionatrice per Atmosfera Modificata.



Fig.12 – Diagramma di pastorizzazione delle seadas con indicazione della storia termica e del valore di F_0 .

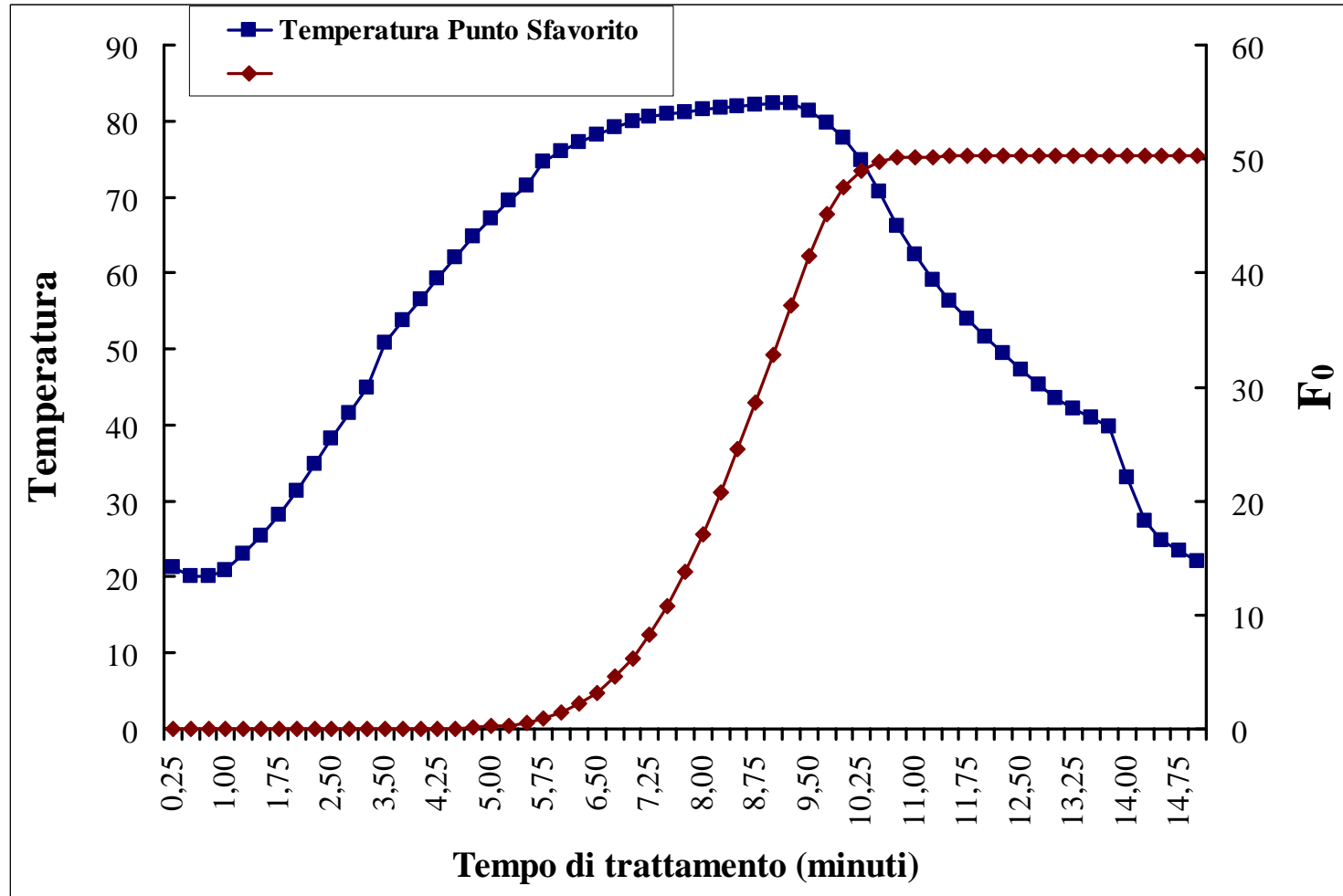


Fig. 13 - Confronto seadas in AO e in AM a 10 giorni di conservazione.



Fig. 14 - Particolare colonie di muffe sulla seadas in AO.



Fig. 15 - Accettabilità seadas durante la conservazione.

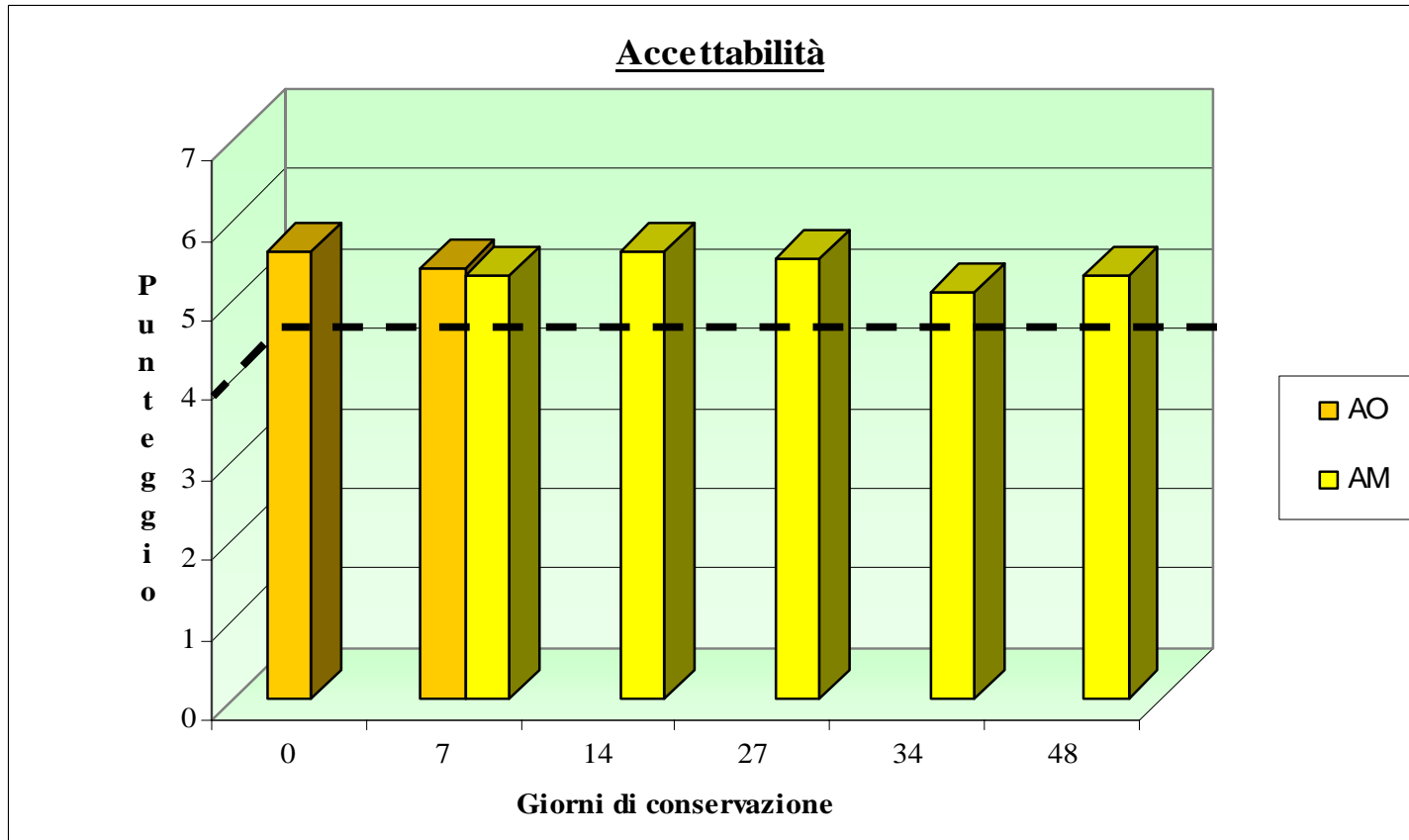


Fig. 16 – Formaggelle.



Fig. 17 – Confezione formaggelle con assorbitori di ossigeno.



Fig. 18 – Formaggelle confezionate con assorbitori di ossigeno e con atmosfera modificata.

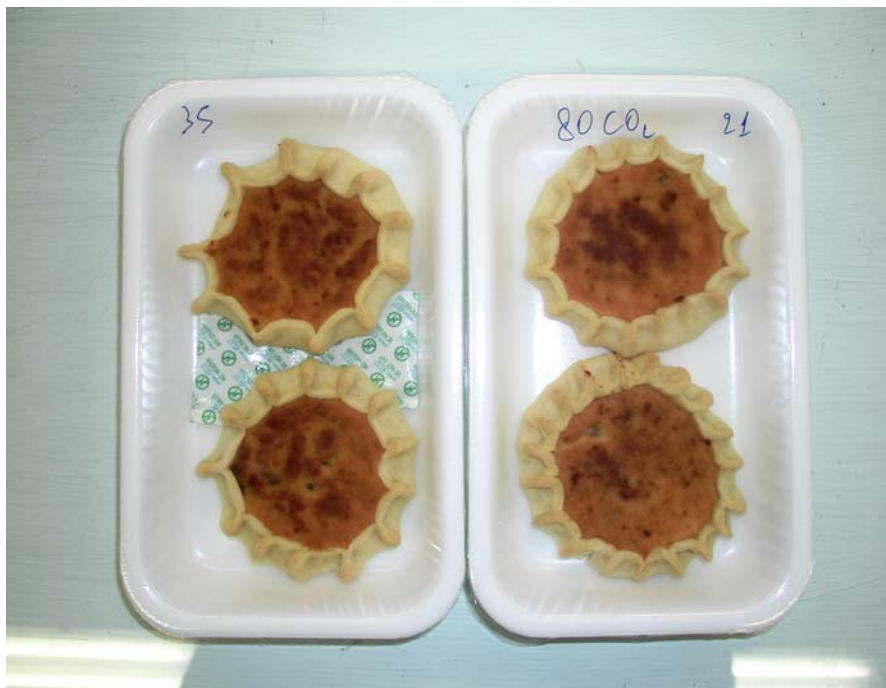


Fig. 19 – Test di taglio.

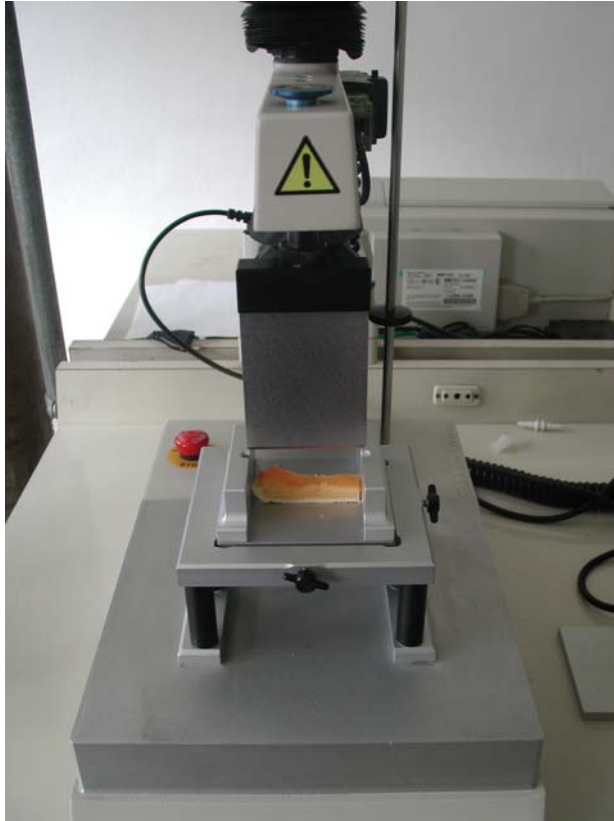


Fig. 20 – Particolare test di penetrazione.



Fig. 21 – Test di compressione.



Fig. 22 – Colonie di muffe sulle formaggelle del controllo al settimo giorno di conservazione.



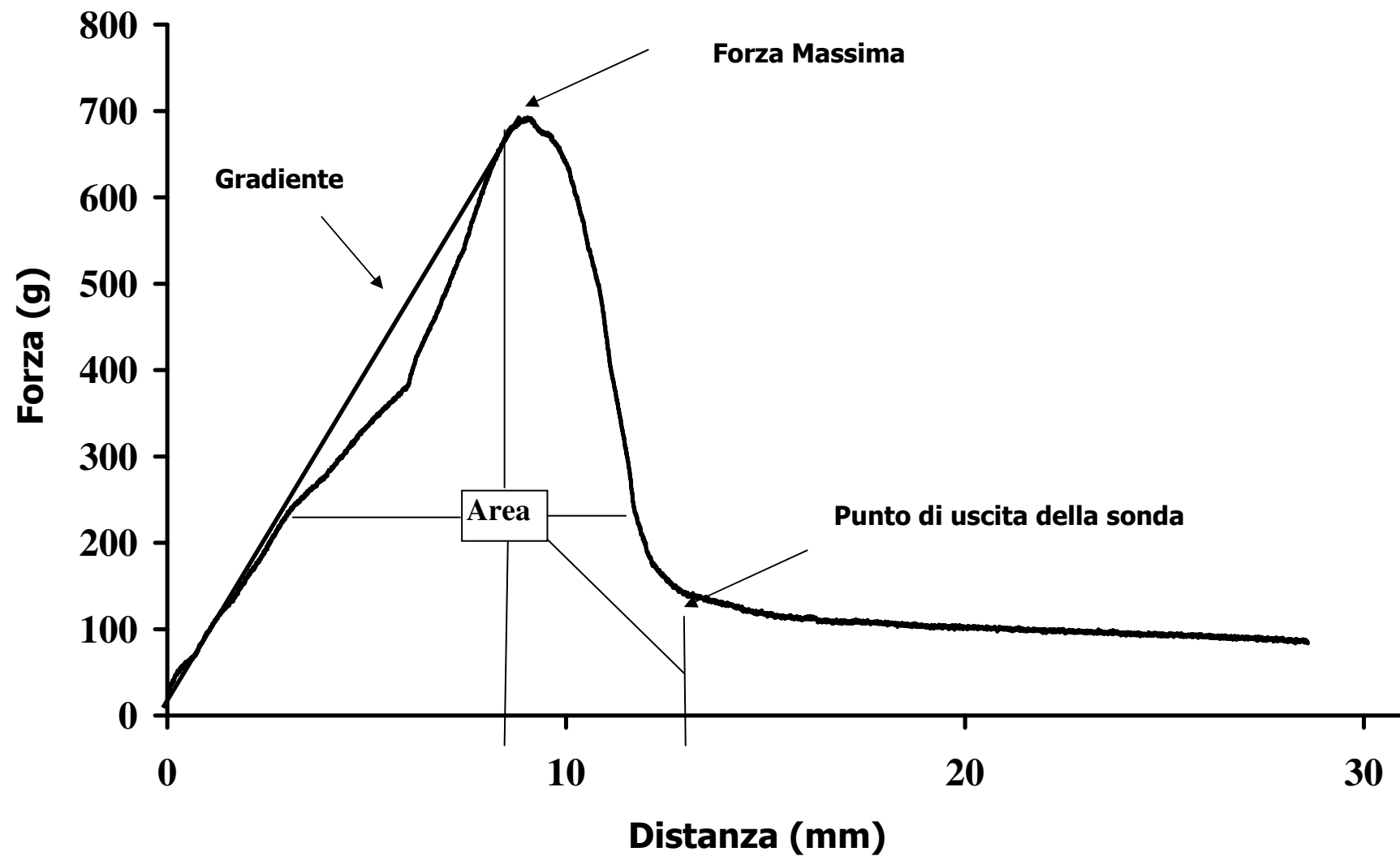


Fig. 23 - Test di compressione.

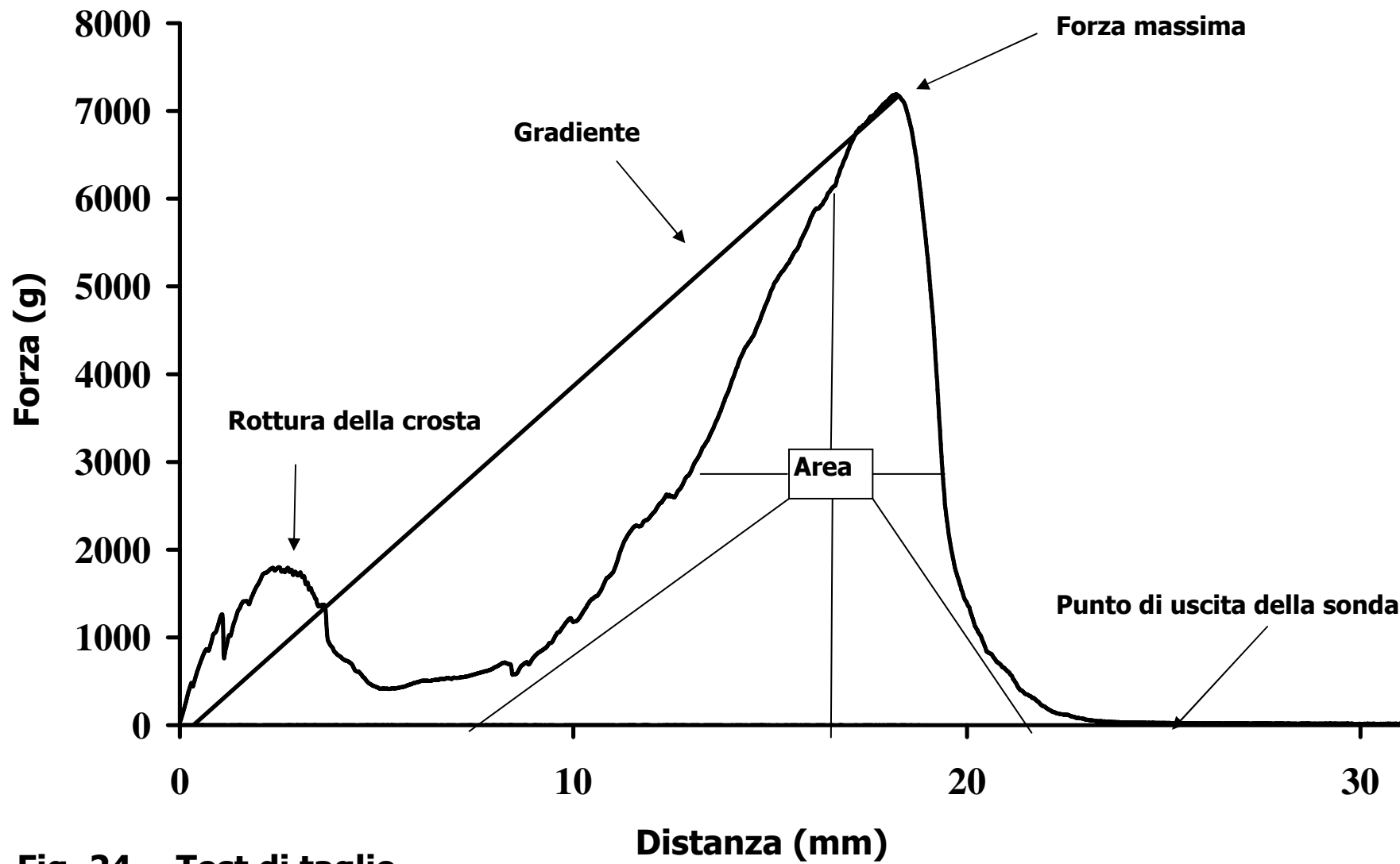


Fig. 24 - Test di taglio.

VII. Bibliografia

Abellana M., Sanchis, V., Ramos, A.J., Nilesen, P.V., (2000). Effect of modified atmosphere packaging and water activity on growth of *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri* and *E. herbariorum* on a sponge cake analogue. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 606-616.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 1990. Metodica 920.151, Solids (Total), in: Fruits and Fruit products, Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, vol. II, 910 – 928.

Baker R.C., Wong Hahn P., Robbins K.R. 1988. Fundamentals of new food products development. In *Developments in food science*. Elsevier, vol 16.

Bogadtke B., 1979. Use of CO₂ in packaging foods. *Ernahrungs-wirtschaft*, 7/8, 33-43.

Boskou G., Debevere J. 1997. Reduction of trimethylamine oxide by *Shewanella* spp. under modified atmospheres in vitro. *Food Microbiology*, 14.

Cappelli P., Vannucchi V., 1994. In: Chimica degli alimenti. Zanichelli, Bologna 12,3, 161.

Carcano M., Nicoli P., Lodi R., 1994. Effetto di alcuni gas rari su microrganismi di interesse alimentare. Atti del workshop CNR-RAISA. Imballaggio funzionale per una migliore qualità degli alimenti confezionati – Arti Poligrafiche Europee.

Cauvain S.P., 1998. Improving the control of staling in frozen bakery products. Trend in food science & technology, 9, 56-61.

Enfors S.O., Molin G., 1978. Mechanism of the inhibition of the spore germination by inert gases and carbon dioxide. In Spores VII. Editions, Americans Society for Microbiology. Washington DC.

Esse R., Saari A., 2004. Shelf-life and moisture management. In Understanding and measuring the shelf-life of food. CRC Press, 24-41.

Exama A., Arul J., Lencki R.W., Lee L.Z., Toupin C., 1993. Suitability of plastic films for modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. Journal food Science, 58.

FIL-IDF 99B, 1995. Sensory Evaluation of Dairy Products. FIL-IDF, Brussels.

Finn M.J., Upton M.E., 1997. Survival of pathogens on modified-atmosphere-packaged shredded carrot and cabbage. Journal food protect, 60.

Frau M., Simal S., Femenia A., Sanjuan E., Rossello C., 1999 " Use of principal component analysis to evaluate the physical properties of Mahon cheese". European Food Research and Technology, 210, 73-76.

Gill C.O., Tan K.A. 1980. Effect of carbon dioxide on growth of meat spoilage bacteria . Applied Environmental Microbiology. 39.

Gris A., Sensidoni A., 2005. Pastorizzazione della pasta fresca farcita, studio analitico di confronto tra due moderni impianti. Tecnica Molitoria, Dicembre, 1289-1299.

Grundy J.G., 1996. Preservatives. In Baked Goods Freshness,. New York: Marcel Dekker. 189-204.

Guynot M.E., Marin S., Sanchis V., Ramos A.J., 2003a. Modified atmosphere packaging for prevention of mold spoilage of bakery products

with different pH and water activity levels. *Journal of Food Protection*, 56, 1864-1872.

Guynot M.E., Sanchis V., Ramos A.J., Marin S., 2003b. Mold-free shelf life extension of bakery products by active packaging. *Journal of Food Science*, 68, 2547-2552.

Hurme E., Ahvenainen R., Nielsen T., 2002. Active and intelligent packaging. In: *Minimal processing technologies in the food industry*, 87-123.

Jones H.P., 2000. Ambient Packaged Cakes. IC.M.D. In *Shelf life evaluation of foods*, (2nd ed.). Gaithersburg, Mariland: Aspen Publishers, Inc, 140-156.

Kidd F., West C., Kidd M. N. 1927. Gas storage of fruit. *Food Invest Special Report*, Gran Bretagna, 1-87.

Labuza T.P., Acott K., Tatini S.R., Lee R.Y., Flink J., McCall W., 1976. Water Activity Determination: A Collaborative Study Of Different Methods. *Journal of Food Science*, 41, 910-917.

Lee J.S., Simard R.E., Laleye C.L., Holley R.A., 1985. Effect of temperature and storage duration on the microflora, physicochemical and sensory changes of vacuum or nitrogen packed pork. *Meat science*, 13.

Legan J.D., Voysey P.A. 1991. Yeast spoilage of bakery products and ingredients. *Journal of Applied Bacteriology*, 70, 361-371.

Lupatini M., 2002. I gas per il confezionamento in atmosfera modificata dei prodotti alimentari. *Ingredienti alimentari*, 1, 11-17.

Meilgaard M., Civille G.V., Carr B.T. 1999. Overall Differences Test: Does a sensory Difference Exist Between Samples?. In: *Sensory Evaluation Techniques*. CRC press; New York; 59-98.

Mondelli G., 2003a. Batteri responsabili di malattie da alimenti. *Professional pasta*. 21, 28-33.

Mondelli G., 2003b. Approccio alla logica di processo per la pastorizzazione della pasta fresca". *Pasta e pastai*, 32, 16-21.

Mondelli G., 2007. Considerazioni sui presupposti tecnici e tecnologici per la pastorizzazione della pasta. *Pasta e Pastai*, 57, 20-29.

Nakamura H., Hoshino J., 1983. Techniques for the preservation of food by employment of an oxygen absorber. TechInformation, Ageless Div., Mitsubishi Gas Chemical Co Tokyo: 1-45.

Ooraikul B., 1991. Modified atmosphere packaging of bakery Products. In Modified atmosphere packaging of food; Chichester: Ellis Horwood; England, 38–114.

Papantoniou E., Hammond E.W., Tsiami A.A., Scriven F., Gordon M.H., Schofield, J.D., 2003. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 1057-1063.

Piergiovanni L., Fava P., 1986. Il confezionamento alimentare in atmosfera modificata; un rapporto sulle conoscenze, le esperienze, le tecniche. DISTAM, Milano.

Robertson G.L., 2005. Modified Atmosphere Packaging. In Food Packaging, Principles and Practice, second Edition; Crc, Taylor & Francis; New York, 313-331.

Rossi A., Febbraro F., Tombolini B., Cenni C., 2005. Problematiche igienico sanitarie delle paste alimentari fresche. *Tecnica molitoria*, Maggio, 465-481.

Salame M., 1974. The use of low permeation thermoplastics. In food and beverage packaging. *ACS Division of organic coating and plastics chemistry.*, 24.

Schvester P., 1991. The effect of noble gases on extending the shelf life of foods. *Proceedings of the 6th International Conference on Controlled/Modified and vacuum packaging, USA, 91, 111-120.*

Seiler D.A.L., 1989. Envasado en atmósferas modificadas de los productos de panadería. In *Envasado de alimentos en atmósferas controladas, modificadas y a vacío; Zaragoza: Acribia, 141-157.*

Silliker J.H., 1980. The influence of atmosphere containing elevated levels of carbon dioxide on growth of psychrotrophic organism in meat and poultry. In *Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity. Academic Press, London.*

Simard R.E., Lee B. H., Laleye C.L., Holley R.A., 1983. Effect of temperature, light and storage time on the physicochemical and sensory characteristics of vacuum or nitrogen packed frankfurters. *Journal food Protection*. 46, 3.

Smith J.P., Ooraikul B., Koersen W.J., Jackson E.D. 1986. Novel approach to oxygen control in modified atmosphere packaging of bakery products. *Food Microbiology* 3, 315-320.

Smith J.P., Ramaswamy H.S., Simpson B.K., 1990. Developments in food packaging technology. Part II: Storage aspects. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 112-118.

Smith J.P., Simpson B.K., 1995. Modified atmosphere packaging of bakery and pasta products. In *Principles of modified atmosphere and sous vide product packaging*. Lancaster, Technomic Publishing Company, 207-242.

Smith J.P., Daifas D.P., El-Khoury W., Koukotsis J., El-Khoury A., 2004. Shelf life and safety concerns of bakery products – A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 19-55.

Sofos J.N. 1989. Antimicrobial activity. In, Sorbate food preservatives. Boca Raton: CRC Press, 33-48.

Spencer, K.C., Humphreys, D.J., 2003. Argon packaging and processing preserves and enhances flavors, freshness and shelf life of food. In: Freshness and Shelf Life of Foods, ACS Symposium Series 836. American Chemical Society; Washington ,20.

Suppakul P., Miltz J., Sonneveld K., Bigger S.W., 2003. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. Journal of food science, 68, 408-420.

Stöllman U., Johansson F., Leufvén A., 1994. Packaging and Food Quality. In Modified Atmosphere Packaging of Foods. Blackie Academic & Professional, New York, 52-71.

www.distam.unimi.it/info/info2.htm, Piergiovanni L., 1997. Il confezionamento in atmosfera modificata protettiva.

www.Professionalpasta.it. Quando la pasta si incolla, ovvero cause comuni e rimedi possibili.

Zardetto S., 2005. Effect of modified atmosphere packaging at abuse temperature on the growth of *Penicillium aurantiogriseum* isolated from fresh filled pasta. *Food Microbiology*, 22, 367-371.

Zardetto S., Dalla Rosa M., 2005. Effects of heat treatment on the microbiology and quality of fresh filled pasta. *Focus on Food Policy, Control and Research*. Nova Science Publishers, Inc.

Zee J.A., Bouchard C., Simard R.E.K., Pichard B., Holley R.A., 1984. Effect de N₂, CO et CO₂ sur la croissance de bacteries des produits carnes sous atmospheres modifiees. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 2.

Ringraziamenti

Giunta al termine di questo lavoro desidero ringraziare ed esprimere la mia riconoscenza nei confronti di tutte le persone che, in modi diversi, mi sono state vicine e hanno permesso e incoraggiato la realizzazione e stesura di questa tesi. I miei più sentiti ringraziamenti vanno anche a chi mi ha seguito durante la redazione del lavoro di tesi di dottorato:

Ringrazio, prima di tutti, il prof. Antonio Piga e la Dott.ssa Alessandra Del Caro per la costante disponibilità e cortesia avute nei miei confronti. Particolarmente preziose sono risultate le loro indicazioni, con le quali sono stata costantemente guidata nell'elaborazione di questa tesi.

Ringrazio il Coordinatore del Dottorato, Chiar.mo Prof. Giovanni Antonio Farris per la continua attenzione e per la sensibilità dimostrate nei miei confronti.

Un ringraziamento particolare va a Costantino Fadda amico e collega per la disponibilità e per l'incoraggiamento di questi anni di dottorato.

Un doveroso ringraziamento va rivolto a Dott. Vacca, Giangiaco Milella, Monica Madrau, Paolo Fenu, Alessandra Nieddu, Cinzia Fanara e la Sig.ra Ivana Cicu per avermi supportato ma soprattutto sopportato durante il mio lavoro di ricerca.

Desidero ancora ringraziare La Porto Conte Ricerche, Dott.ssa Tonina Roggio, Dott. Pasquale Catzeddu, Nicola Secchi e Giuseppe Stara per aver reso possibile la realizzazione di questa tesi.

Ringrazio sentitamente la Dott.ssa Nicoletta Mangia per aver contribuito alla realizzazione di questo lavoro.

Ringrazio tutto il panel di analisi sensoriale per la gentile collaborazione.

Ringrazio il Prof. Stephan Desobry, LSGA, ENSAIA, Nancy (Francia), per avermi dato la possibilità di svolgere un periodo di formazione nel suo dipartimento e per aver contribuito alla mia formazione e crescita in campo professionale.

Doverosi sono i ringraziamenti anche a chi ha permesso di sperimentare il mio lavoro di ricerca in ambito industriale:

Ditta Progen, Ozieri, Pasticceria l'Artigiana, Ozieri, La sfoglia D'oro, Sassari.

Grazie a tutte le persone che in questa pagina, non volendo, ho dimenticato.

Anna Maria