STABY

INFLUENZA DEL CONFEZIONAMENTO SULLA SHELF-LIFE DI ORTAGGI DI IV GAMMA

QUALITÀ MICROBIOLOGICA DI FINOCCHI (*FOENICULUM VULGARE*)

MARZIA ALBENZIO - MARIA ROSARIA CORBO - MILENA SINIGAGLIA

Istituto di Produzioni e Preparazioni Alimentari - Facoltà di Agraria - Via Napoli 25 - 71100 Foggia - Italia

*INFLUENCE OF PACKAGING ON SHELF-LIFE AND MICROBIOLOGICAL QUALITY OF MINIMALLY PROCESSED FENNELS (*FOENICULUM VULGARE*)*

SUMMARY

The influence of different packaging techniques on microbiology of minimally processed fennels was studied. In the ready-to-use fennels packaged in ordinary atmosphere the most of the microorganisms belonged to *Pseudomonadaceae*; on the contrary *Vibrionaceae* and *Enterobacteriaceae* are predominant in vacuum packaged samples.
The combination of vacuum packaging and refrigeration (+4°C) was able to extend the product "shelf-life".

RIASSUNTO

È stata studiata l'influenza di diverse tecniche di confezionamento sui principali gruppi microbici degradativi in finocchi "minimamente trattati".
I microrganismi predominanti appartenevano alla famiglia delle Pseudomonadaceae nei campioni confezionati in atmosfera ordinaria, e delle *Vibrionaceae* ed *Enterobacteriaceae* nei finocchi confezionati sotto-vuoto.
Particolarmente interessante è risultato il confezionamento sotto vuoto che in combinazione con la conservazione refrigerata (4°C) consente di prolungare sensibilmente la shelf-life del prodotto.

INTRODUZIONE

I vegetali "lavorati al minimo" (minimally processed foods, od alimenti della IV gamma) si sono inseriti con successo nel mercato ortofrutticolo puntando su caratteristiche relative alla comodità d'uso ed alla freschezza (1). Quest'ultimo aspetto, caratterizzante i prodotti della IV gamma, rappresenta un punto critico poiché, accanto alla freschezza, viene richiesta la conservabilità del prodotto confezionato per un tempo minimo compreso tra 5-7 giorni (2). Ciascuna fase del ciclo tecnologico di trasformazione della materia prima deve quindi essere programmata e messa a punto per ciascun prodotto al fine di garantire l'assoluta sicurezza igienica ed il prolungamento della vita commerciale (shelf-life) del prodotto finito. Tuttavia, la fisiologia della materia prima rende talvolta molto difficile l'ottenimento di prodotti con una durata commerciale di almeno 7 giorni. I prodotti vegetali, infatti, vanno incontro ad una serie di trasformazioni biochimiche che determinano modificazioni quali imbrunimento, appassimento, marciume, a cui si aggiungono una serie di alterazioni derivanti dalle manipolazioni durante il processo di trasformazione (3).

In generale, i meccanismi attraverso i quali un prodotto confezionato perde la sua commerciabilità sono numerosi e diversificati. I principali sono: senescenza dei vegetali, metabolismo anaerobico, modificazioni enzimatiche, danno meccanico apportato alle cellule in prossimità delle zone di taglio, maggiore disponibilità di nutrienti che favoriscono lo sviluppo microbico, modificazioni reologiche, variazioni di colore, riduzione del contenuto vitaminico (vitamina C), incremento dell'attività respiratoria e della produzione di etilene. Tutti questi fenomeni costituiscono forme di deterioramento indipendenti fra loro, a volte simultanee, soggette a fattori che sono legati al prodotto, al processo e all'ambiente di conservazione (4). La composizione dei gas in equilibrio col prodotto è un fattore estrinseco molto importante nel determinare le velocità delle diverse reazioni alterative, per cui la modalità di confezionamento gioca un ruolo importante nel controllo del metabolismo del prodotto e, di conseguenza, nel prolungamento della conservabilità dello stesso (5).

In questo lavoro è stato preso in esame un prodotto vegetale, come i finocchi, non ancora presente singolarmente sul mercato dei minimally pro-

cessed foods quale esempio di una materia prima di difficile lavorazione industriale a causa dell'elevata velocità con cui si manifestano i processi di imbrunimento enzimatico. Il ciclo di produzione è stato realizzato rispettando le norme di buona fabbricazione (Good Manufacturing Practices, GMP) per ottenere un prodotto caratterizzato da un'elevata qualità igienica e commerciale. Inoltre, al fine di determinare l'influenza del confezionamento sulla shelf-life del prodotto finito, sono state confrontate due diverse tecniche ed è stata valutata l'evoluzione nel tempo dei principali gruppi microbici degradativi.

MATERIALI E METODI

Preparazione dei campioni

I campioni sono stati preparati nel giorno di acquisto della materia prima seguendo il diagramma di flusso riportato in fig. 1. La differenza fra le diverse linee riguarda la tecnica ed il materiale di confezionamento ed in particolare:

- i campioni della linea I sono stati confezionati in atmosfera ordinaria in vaschette di polivinilcloruro (PVC) (11x8x5 cm) ricoperte da un film di polipropilene;
- quelli della linea II in buste di polietilene in atmosfera ordinaria;
- i prodotti della linea III sono stati confezionati sotto vuoto in buste di polietilene sigillate a caldo.

Analisi microbiologiche

Da ciascun campione sono stati prelevati sterilmente 10 g di prodotto, diluiti opportunamente in soluzione fisiologica (NaCl 0,9% p/V) ed omogeneizzati con Stomacher (Lab-Blender 400) per un tempo di tre minuti.

Su tale campione, dopo aver preparato diluizioni in base 10 con soluzione fisiologica, è stata eseguita la conta microbica (in doppio) con il metodo ufficiale in piastra.

I microrganismi ricercati sono stati i seguenti: batteri psicrotrofi su Plate Count Agar (PCA, Oxoid) incubati a 5°C per una settimana; coliformi totali e fecali su Violet Red Bile Agar (VRBA, Oxoid) incubati rispettivamente a 37° e 44°C per 24 ore (h); batteri lattici su MRS Agar (Oxoid) incubati a 37°C per 48 ore; lieviti su Sabouraud Dextrose Agar (Oxoid) incubati a 25°C per quattro giorni. Per ciascun campione dalle piastre di PCA sono state scelte diverse colonie differenti per caratteri morfologici; tali colonie sono state purificate su PCA ed identificate mediante i seguenti test: colorazione di Gram, test dell'ossidasi, test della catalasi, reazione di utilizzazione del glucosio in accordo con il test Hugh-Leifson (6).

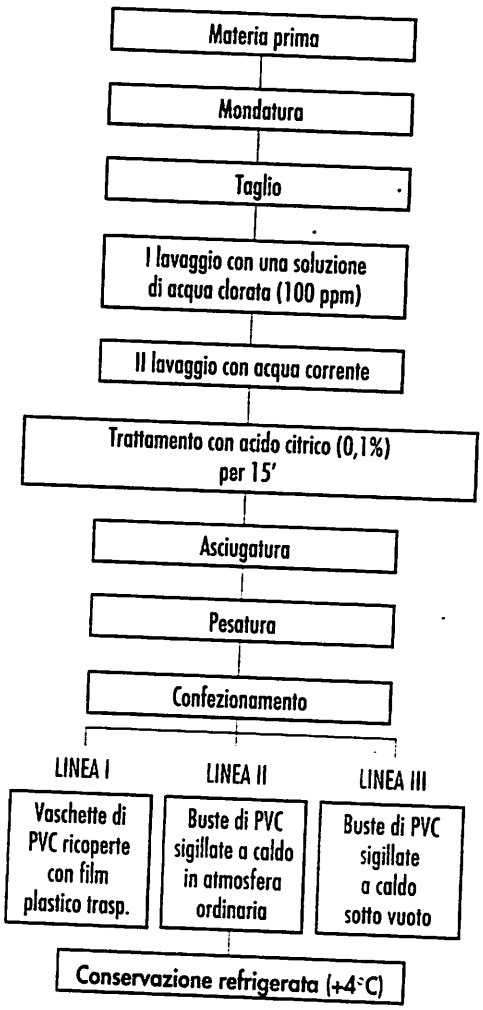

Fig. 1 - Ciclo di lavorazione per la produzione di finocchi minimamente trattati.

Modellazione dei dati microbiologici

Le curve di sviluppo sono state dellate secondo l'equazione di G pertz modificata da Zwietering e (1990) (7):

$$y=K+A\cdot\exp-\exp[(\mu_{max}\cdot e/A)\cdot(\lambda-t$$

dove: y rappresenta il livello di luppo espresso come log UFC/g; A r presenta il carico massimo raggiunt fase stazionaria (log UFC/g); μ_{max} la m sima velocità di sviluppo misura come Δlog UFC/g per giorno e λ è lunghezza della fase lag espressa giorni.

Trattamento antimicrobico e antiossidante

Per verificare l'efficacia del tratt mento con acido citrico nel rallent mento dei processi di imbruniment sono state effettuate delle prove pre minari alle concentrazioni e per i tem di contatto seguenti:

a) soluzione di acido citrico al 4, 2, 0,5%, per un tempo di contatto di minuti;

b) soluzione di acido citrico al 4, 2, 0,5%, per un tempo di contatto di 3 minuti;

c) soluzione di acido citrico allo 0,- 0,3, 0,2, 0,1% per un tempo di contatt di 15 minuti.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Valutazione qualitativa dei campioni nel corso della conservazione

Al fine di prolungare la shelf-life dei finocchi lavorati e di evitare imbrunimenti nel corso della conservazione, è stato sperimentato un trattamento con acido citrico. Tale acido può essere infatti utilizzato per prevenire l'imbrunimento da polifenolossidasi (PPO) perché, oltre a ridurre il pH, è in grado di chelare il rame (8). L'acido citrico svolge

oltre, una funzione antimicrobica in anto, riducendo il pH interno (pH) lla cellula microbica, la destabilizza a ello della membrana cellulare (9).

Sono state valutate, quindi, le caratteristiche di commerciabilità di finocchi IV gamma in funzione dei diversi attamenti con acido citrico e dei medi di confezionamento.

I vegetali trattati con le concentrazioni più elevate di acido citrico e per mpi di contatto più lunghi, dopo soli giorni di conservazione refrigerata nno mostrato fenomeni di disidratazione e processi di imbrunimento talente evidenti da essere giudicati non onei alla commercializzazione. Invei finocchi sottoposti al trattamento blando, per concentrazione e tempo di contatto, hanno mostrato i risultati più soddisfacenti: infatti, il tempo ecessario affinché sui vegetali cominassero a comparire colorazioni scure, dice di processi ossidativi e fenomeni disidratazione, era superiore ai 5 orni. Inoltre, la combinazione di tale ando trattamento antiossidante con confezionamento sotto-vuoto ha so il prodotto più stabile dal punto di sta enzimatico: infatti, dopo 10 giorni conservazione refrigerata a +4°C i occhi presentavano ancora una apezzabile qualità commerciale (colore, xture).

alutazione della microflora

Nelle tab. 1, 2, 3 sono riportati i livelli edi di carico di alcuni gruppi microbici alizzati durante la conservazione di occhi preparati secondo tre diverse ee di produzione (fig. 1). Dal confronto delle tabelle si può osservare che le alisi microbiologiche di campioni odotti nelle linee I e II non sono state ettuate per un tempo superiore ai 6 orni. Infatti il confezionamento in atosfera ordinaria non induceva alcuna izione nello sviluppo di muffe che al sesto giorno di conservazione ovocavano visibili alterazioni tali da dere il prodotto inaccettabile dal to di vista igienico e commerciale. prodotti della linea III, invece, sono

Tabella 1 - Livello di carico iniziale e successiva evoluzione della popolazione microbica in finocchi di IV gamma (linea I).

Tempo (giorni)	Coliformi totali	Coliformi fecali	Batteri lattici	Batteri psicrotrofi	Lieviti
0[b]	4,70[a]	2,70	1,20	5,38	1,50
0[c]	2,70	1,59	1,00	4,80	<1,00
1	2,70	1,50	1,00	5,40	<1,00
3	3,10	<1,00	1,00	5,50	<1,00
4	4,50	<1,00	<1,00	6,40	<1,00
5	5,10	<1,00	<1,00	7,20	<1,00
6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

[a] Espresso come log UFC/g;
[b] Materia prima;
[c] Prodotto finito;
n.d.=Non determinato (prodotto era da considerarsi commercialmente inaccettabile).

Tabella 2 - Livello di carico iniziale e successiva evoluzione della popolazione microbica in finocchi di IV gamma (linea II).

Tempo (giorni)	Coliformi totali	Coliformi fecali	Batteri lattici	Batteri psicrotrofi	Lieviti
0[b]	4,70[a]	2,70	1,20	5,38	2,80
0[c]	3,00	1,48	1,00	4,00	2,50
1	3,20	1,40	<1,00	4,60	<1,00
3	3,47	<1,00	<1,00	5,50	<1,00
4	4,20	<1,00	<1,00	6,20	<1,00
5	5,00	<1,00	<1,00	6,20	<1,00
6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

[a] Espresso come log UFC/g;
[b] Materia prima;
[c] Prodotto finito;
n.d.=Non determinata (il prodotto era da considerarsi commercialmente inaccettabile).

Tabella 3 - Livello di carico iniziale e successiva evoluzione della popolazione microbica in finocchi di IV gamma (linea III).

Tempo (giorni)	Coliformi totali	Coliformi fecali	Batteri lattici	Batteri psicrotrofi	Lieviti
0[b]	4,70[a]	2,70	1,20	5,38	4,36
0[c]	3,10	1,60	1,00	4,97	3,23
1	3,15	1,00	<1,00	5,00	2,00
3	3,40	<1,00	<1,00	5,13	<1,00
4	5,00	<1,00	<1,00	5,48	<1,00
5	6,15	<1,00	<1,00	6,00	<1,00
10	7,00	<1,00	<1,00	6,36	<1,00
15	7,00	<1,00	<1,00	8,23	<1,00
21	7,00	<1,00	<1,00	8,20	<1,00

[a] Espresso come log UFC/g;
[b] Materia prima;
[c] Prodotto finito.

stati analizzati per un tempo di tre settimane; durante tale periodo non si sono verificate alterazioni visibili dal punto di vista organolettico né microbiologico.

Passando all'analisi dei singoli gruppi microbici è possibile osservare che, indipendentemente dalla linea di produzione, il carico dei coliformi fecali diminuiva costantemente durante la conservazione fino a livelli al di sotto della soglia di determinazione. I batteri lattici e i lieviti mostravano un andamento analogo: dopo il primo giorno di conservazione refrigerata non erano più isolabili con le comuni tecniche di piastramento. La sensibile riduzione di tali microrganismi è verosimilmente da imputare sia all'efficacia del trattamento con acqua clorata (10), sia al trattamento con l'antiossidante cui è ovviamente associata una blanda azione antimicrobica (8).

Relativamente ai coliformi totali nel prodotto finito si rilevava un carico cellulare inferiore a quello determinato sulla materia prima. Anche in questo caso tale riduzione poteva essere attribuita al trattamento con soluzione clorata. Durante la conservazione, invece, il numero dei coliformi totali aumentava e nei campioni confezionati sottovuoto si raggiungeva un carico cellulare massimo pari a 7,00 log UFC/g dopo 10 giorni a temperatura di 4°C. Tale livello di carico non veniva mai raggiunto nei campioni confezionati in atmosfera ordinaria in quanto le analisi non venivano effettuate per un tempo superiore ai 6 giorni. Andamento analogo presentavano i batteri psicrotrofi i quali mostravano un incremento cellulare che nella linea III raggiungeva un livello pari a 8,95 log UFC/g dopo 21 giorni.

Nelle fig. 2 e 3 è rappresentata l'evoluzione dei coliformi totali e dei batteri psicrotrofi in finocchi della linea III modellata secondo l'equazione di Gompertz.

I parametri (K, A, μ_{max} e λ) ottenuti dalla suddetta equazione, sono riportati in tab. 4, nella quale è anche riportata la "shelf-life" predetta, calcolata come il tempo in giorni necessario per raggiun-

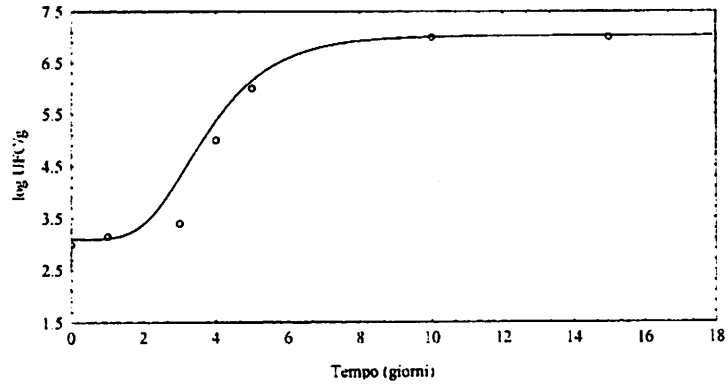

Fig. 2 - Curva di sviluppo di coliformi totali in finocchi di IV gamma.

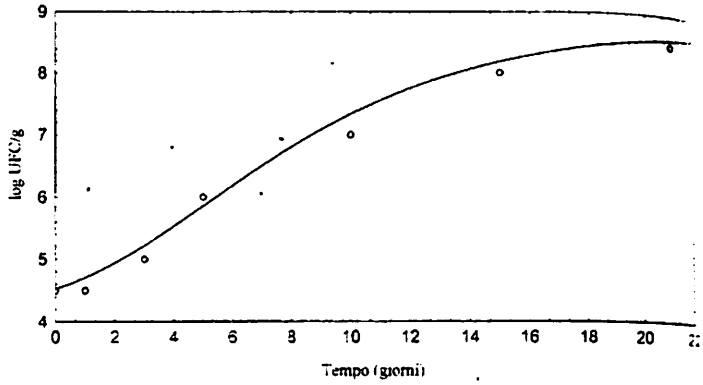

Fig. 3 - Curva di sviluppo di batteri psicrotrofi in finocchi di IV gamma.

Tabella 4 - Parametri dell'equazione di Gompertz e "shelf-life" predetta di finocchi prodotti secondo la linea III.

	K[a]	A	μ_{max}	λ	R^2	T[b]
Coliformi totali	3,10	7,03	1,12	1,94	0,999	10,27
Batteri psicrotrofi	4,24	8,80	0,33	0,10	0,996	12,68

[a] Parametri dell'equazione di Gompertz: K, carico iniziale (log UFC/g); A, massimo carico cellulare (log UFC/g) raggiunto in fase stazionaria; μ_{max}, velocità massima di crescita; λ, fase lag (giorni); R^2, coefficiente di regressione.
[b] Shelf-life predetta calcolata come il tempo (giorni) necessario per il raggiungimento di un carico cellulare di 10^7 UFC/g.

gere una concentrazione batterica di 10^7 UFC/g. Questa variava tra 10 giorni, se calcolata prendendo in considerazione i coliformi totali e 12 giorni circa considerando i batteri psicrotrofi.

Caratterizzazione degli isolati

Nella materia prima e dai campioni dopo il confezionamento e durante la conservazione refrigerata, sono state isolate numerose colonie di batteri psicrotrofi. Tali colonie sono state analizzate per rilevare caratteri quali: forma della cellula, colorazione di Gram, metabolismo ossidativo o fermentativo del glucosio, catalasi, ossidasi e mobilità. Sulla base dei risultati ottenuti è stato possibile identificare i diversi isolati a livello di famiglia o a livello di genere.

Nella tab. 5 sono riportate le frequenze dei diversi gruppi microbici isolati dalla materia prima e dai prodotti subito dopo il confezionamento e durante la conservazione. È possibile osservare che, relativamente ai microrganismi isolati dai campioni della linea I, le frequenze relative di *Acinetobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Vibrionaceae* ed *Enterobacteriaceae* rimanevano praticamente costanti nel breve intervallo di tempo in cui i campioni sono stati analizzati. La frequenza delle *Pseudomonadaceae* passava, invece, da 30% nel campione analizzato subito dopo il confezionamento al 40% dopo 5 giorni di conservazione a +4°C. Mentre la frequenza di *Moraxella* spp. e di *Janthinobacterium lividum* decresceva fino ad azzerarsi verosimilmente a causa del trattamento con acqua clorata della materia prima.

Un andamento analogo si evidenzia per i gruppi batterici identificati nei prodotti della linea II ad eccezione di *Janthinobacterium lividum* la cui frequenza, anziché decrescere, aumentava nel tempo e delle *Vibrionaceae* che al 5° giorno di conservazione non erano più rilevabili.

La frequenza dei gruppi microbici isolati dai prodotti della linea III si differenzia notevolmente rispetto a quelli dei batteri identificati dalle linee prece

Tabella 5 - Evoluzione nel tempo dei batteri psicrotrofi isolati da finocchi di IV gamma (linea I).

Tempo (giorni)	*Acinetobacter* spp.	*Moraxella* spp.	*Pseudomonadaceae*	*Vibrionaceae*	*Enterobacteriaceae*	*Flavobacterium* spp.	*Janthinobacterium lividum*
0[a]	20%	15%	31%	10%	12%	10%	2%
0[b]	14%	12%	30%	15%	14%	15%	-
3	27%	-	38%	11%	12%	12%	-
5	20%	-	40%	10%	13%	17%	-

[a] Materia prima;
[b] Prodotto finito.

Tabella 6 - Evoluzione nel tempo dei batteri psicrotrofi isolati da finocchi di IV gamma (linea II).

Tempo (giorni)	*Acinetobacter* spp.	*Moraxella* spp.	*Pseudomonadaceae*	*Vibrionaceae*	*Enterobacteriaceae*	*Flavobacterium* spp.	*Janthinobacterium lividum*
0[a]	20%	15%	31%	10%	12%	10%	2%
0[b]	23%	10%	30%	11%	8%	18%	-
3	12%	-	36%	13%	10%	26%	3%
5	25%	-	32%	-	13%	25%	5%

[a] Materia prima;
[b] Prodotto finito.

Tabella 7 - Evoluzione nel tempo dei batteri psicrotrofi isolati da finocchi di IV gamma (linea III).

Tempo (giorni)	*Acinetobacter* spp.	*Moraxella* spp.	*Pseudomonadaceae*	*Vibrionaceae*	*Enterobacteriaceae*	*Flavobacterium* spp.	*Janthinobacterium lividum*
0[a]	20%	15%	31%	10%	12%	10%	2%
0[b]	20%	13%	28%	15%	15%	9%	-
3	15%	-	13%	34%	32%	6%	-
5	-	-	-	48%	52%	-	-
10	-	-	-	51%	49%	-	-
15	-	-	-	53%	47%	-	-
21	-	-	-	53%	47%	-	-

[a] Materia prima;
[b] Prodotto finito.

denti: infatti il confezionamento sottovuoto selezionava, nel tempo, una microflora anaerobia facoltativa; di conseguenza, la frequenza delle *Vibrionaceae* e delle *Enterobacteriaceae* aumentava nel corso della conservazione passando dal 15%, per entrambe nel prodotto immediatamente dopo il confezionamento, al 53% ed al 47% rispettivamente al 21° giorno, mentre le *Pseudomonadaceae*, *Acinetobacter* spp. e *Flavobacterium* spp. non erano più rilevabili dopo il 3° giorno di conservazione. Tali organismi sono, infatti, strettamente aerobi e non possono sviluppare in assenza di ossigeno.

CONCLUSIONE

I prodotti della IV gamma, attualmente in commercio, sono caratterizzati da una vita commerciale non superiore a 7 giorni a causa del carico microbico della materia prima e per l'elevata disponibilità di nutrienti (11).

Il finocchio, in particolare, costituisce un vegetale di difficile lavorazione industriale e le operazioni eseguite durante il ciclo di lavorazione ed il confezionamento non consentono la conservazione per un tempo superiore ai 5 giorni. Quindi, al fine di ridurre i processi di imbrunimento enzimatico e di prolungare la shelf-life di questa "sensibile" materia prima sono necessari specifici interventi tecnologici.

Un trattamento con una concentrazione di acido citrico pari allo 0,1% per un tempo di contatto di 15 minuti è risultato in grado di minimizzare i processi di imbrunimento che nel prodotto in atmosfera ordinaria provocavano visibili alterazioni dopo soli 4-5 giorni.

Il confezionamento sotto-vuoto, d'altra parte, agisce in modo selettivo sulla microflora presente; infatti se da un lato inibisce le muffe ed i batteri psicrotrofi di alterazione, quali le *Pseudomonadaceae*, che rivestono grande importanza nella microbiologia degli alimenti in seguito alla loro capacità di provocare alterazioni in alimenti refrigerati, dall'altro favorisce lo sviluppo di microrganismi appartenenti alla famiglia delle *Vibrionaceae* e delle *Enterobacteriaceae*. I microrganismi appartenenti a queste famiglie comprendono anche specie patogene per l'uomo, frequentemente presenti nelle acque di scarico, risulta perciò fondamentale che la materia prima sia caratterizzata da standard qualitativi elevati e che il ciclo di lavorazione industriale sia realizzato seguendo le norme di buona fabbricazione per ridurre al minimo la frequenza di contaminazione da parte di questi microrganismi.

In conclusione, se un'accurata selezione della materia prima ed il rispetto di rigorose norme igieniche lungo tutta

(segue a pag. 350)