



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE  
ALIMENTARI

**VALUTAZIONE DELLA *SHELF-LIFE* DI FORMAGGIO FRESCO  
“STRACCHINO”**

Relatore: Prof. Stefano Zardetto

Laureanda: Anna Bolzon

Matricola n. 1131350

ANNO ACCADEMICO

2016-2017







# INDICE

<b>RIASSUNTO.....</b>	<b>pag. 7</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>pag. 8</b>
<b>1.INTRODUZIONE.....</b>	<b>pag. 9</b>
1.1 Stracchino: prodotto e processo di produzione.....	pag. 11
1.2 Microbiologia dello stracchino.....	pag. 13
1.3 <i>Shelf-life</i> .....	pag. 16
1.3.1 Studio della <i>shelf-life</i> e cinetica.....	pag. 17
1.4 Utilizzo dell'analisi sensoriale nello studio di <i>shelf-life</i> .....	pag. 20
1.5 Microbiologia predittiva.....	pag. 21
1.6 <i>Shelf-life</i> a temperatura non costante.....	pag. 24
<b>2.MATERIALI E METODI.....</b>	<b>pag. 27</b>
2.1 Piano sperimentale.....	pag. 27
2.2 Materiali e attrezzature.....	pag. 29
2.3 Preparazione dei terreni di coltura e piastre.....	pag. 30
2.4 Preparazione delle diluizioni decimali e semina.....	pag. 31
2.5 Analisi sensoriale.....	pag. 33
<b>3.RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>pag. 35</b>
3.1 Muffe e lieviti, enterobatteri, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in stracchino.....	pag. 35
3.2 Analisi sensoriale.....	pag. 40

**4. CONCLUSIONI..... pag. 46**

**5.BIBLIOGRAFIA..... pag. 48**

**6. RINGRAZIAMENTI..... pag. 50**

## RIASSUNTO

In questo lavoro è stata determinata la data di scadenza di uno stracchino industriale con uno studio di *shelf-life* con prove microbiologiche e sensoriali.

Le prove microbiologiche sono state condotte a tre diverse temperature (3°C, 7°C, 12°C) su tre diversi lotti di stracchino confezionato e sono stati analizzati muffe e lieviti, enterobatteri e *Pseudomonas aeruginosa*.

Inoltre è stata condotta un'analisi sensoriale di tipo edonistico con un panel di sei giudici per determinare quando l'alimento non risulta più accettabile durante la *shelf-life*.

I risultati delle analisi hanno dimostrato che le degradazioni principali dell'alimento avvengono a causa di muffe e lieviti. Infatti, questi microrganismi, modificano il sapore, l'odore, il colore e la consistenza dello stracchino, fino a renderlo inaccettabile al consumo.

La modellazione dei dati è stata fatta con software che utilizzano modelli di microbiologia predittiva, ovvero come modello primario quello di *Baranyi and Roberts* e come modello secondario quello di Arrhenius.

Grazie a questo studio è ora possibile stimare la *shelf-life* dello stracchino conservato a temperatura costante o la *shelf-life* dello stracchino considerando l'impatto della catena di distribuzione.

## **ABSTRACT**

*In this work, the date of expiry of an industrial stracchino cheese was determined with a shelf-life study supported by microbiological and sensory evidence. Microbiological tests were carried out at three different temperatures (3°C, 7°C, 12°C) on three different batches of packaged stracchino and molds and yeasts, enterobacteria and *Pseudomonas aeruginosa* were analyzed.*

*Additionally, a hedonistic sensory analysis with a panel of six judges was conducted, in order to determine when the food is no longer acceptable during shelf-life. The results of the analyzes have shown that major food degradations occur due to molds and yeasts. In fact, these microorganisms change the taste, smell, color and texture of the stracchino, making it unacceptable to consumption.*

*Data modeling was done with software that use predictive microbiology models, that is, as a primary model that of Baranyi and Roberts and as a secondary model that of Arrhenius.*

*Thanks to this study, it is now possible to estimate the shelf-life of stracchino stored at a constant temperature or the shelf-life of stracchino considering the impact of the distribution chain.*

## 1. INTRODUZIONE

I consumatori al giorno d'oggi chiedono alimenti di qualità e si aspettano che questa sia mantenuta per tutto il periodo che intercorre tra la produzione e il consumo dell'alimento.

Quindi gli alimenti non devono solo essere sicuri ma devono anche mantenere il più possibile nel tempo le loro caratteristiche sensoriali ottimali.

Vengono perciò condotti degli studi di *shelf-life*, ovvero studi sulla "vita" dell'alimento per capire quando questo non risulta più sicuro e/o accettabile.

La *shelf-life*, tradotto letteralmente "vita da scaffale", è definita come quel periodo in cui un alimento è sicuro dal punto di vista microbiologico e mantiene intatte le sue caratteristiche organolettiche, se conservato in condizioni adeguate.

Stabilire la *shelf-life* degli alimenti non è semplice poiché questa è legata sia al singolo alimento che allo stabilimento di produzione ed è influenzata da diversi fattori quali la qualità microbiologica delle materie prime, qualità intrinseche dell'alimento, le condizioni di processo, il tipo di confezionamento, nonché le condizioni di conservazione.

Generalmente nei prodotti freschi, con *shelf-life* breve, la crescita microbica incide maggiormente sulla scadenza dell'alimento, mentre nei prodotti a lunga conservazione è il cambiamento delle caratteristiche chimiche a diminuire la qualità del prodotto.

L'analisi della crescita microbica, che prende in considerazione microrganismi patogeni e alteranti, rivela quasi sempre una chiara situazione dello stato dell'alimento, si riesce a definirlo accettabile o non accettabile facendo riferimento alla legislazione: per esempio il Regolamento CE 2073/2005 riporta i limiti microbiologici dei microrganismi nei diversi prodotti alimentari.

Lo studio delle caratteristiche chimiche e sensoriali risulta invece più complicato dato che è difficile stabilire dove porre il limite tra alimento accettabile e non accettabile, soprattutto quando si effettua un'analisi sensoriale, dove tale limite è spesso soggettivo.

Gli studi di *shelf-life* permettono di stabilire la data di scadenza o il termine minimo di conservazione degli alimenti, diciture obbligatorie secondo il regolamento CE 1169/2011.

La data di scadenza riguarda alimenti altamente deperibili dal punto di vista microbiologico e che, perciò, possono costituire un pericolo per la salute umana.

Questa va obbligatoriamente posta in etichetta riportando giorno e mese di scadenza, inoltre va sempre definita la temperatura di conservazione del prodotto a cui fa riferimento. Il termine minimo di conservazione riguarda alimenti a lunga conservazione che non costituiscono un pericolo microbiologico. Questo va indicato con la dicitura “da consumarsi preferibilmente il..” e a seguire il giorno, oppure “da consumarsi preferibilmente entro fine..” e a seguire il mese.

In questo lavoro è stato fatto uno studio di *shelf-life* del formaggio fresco stracchino per il caseificio **Frescolat** s.r.l. di Caerano San Marco (TV). Sono state condotte analisi microbiologiche e sensoriali nel laboratorio interno dell’azienda.

I limiti microbiologici di questo prodotto si possono trovare sia nel regolamento CE 2073/2005, dove sono posti i limiti per formaggi freschi di microrganismi come *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, stafilococchi coagulasi-positivi, *E. coli*, ma anche in linee guida che si possono trovare in bibliografia pubblicate da ASL (azienda sanitaria locale) o IZS (istituti zooprofilattici sperimentali).

Inizialmente sono state consultate delle analisi microbiologiche preliminari del prodotto condotte da un laboratorio accreditato. Da queste si è potuto vedere come determinati microrganismi sono problematici per la *shelf-life* del prodotto; quindi per lo studio si è deciso di ricercare muffe e lieviti, enterobatteri e *Pseudomonas aeruginosa*.

Le analisi microbiologiche sono state accompagnate da analisi sensoriali per capire come cambia il prodotto nel tempo dal punto di vista del sapore, odore, consistenza e colore.

## 1.1 Stracchino: prodotto e processo di produzione

Lo stracchino è un formaggio italiano a pasta molle, a rapida maturazione, prodotto a partire da latte vaccino intero. Gli ingredienti di questo prodotto sono latte, caglio, fermenti lattici vivi e sale. Il latte è considerato un allergene e quindi va evidenziato in etichetta (Reg. CE 1169/2011).

Il pH dello stracchino è circa 5.2/5.3 e l'attività dell'acqua è circa 0,98. Presenta un colore bianco lievemente paglierino, una consistenza tenera e un sapore dolce con lievi sfumature acidule.

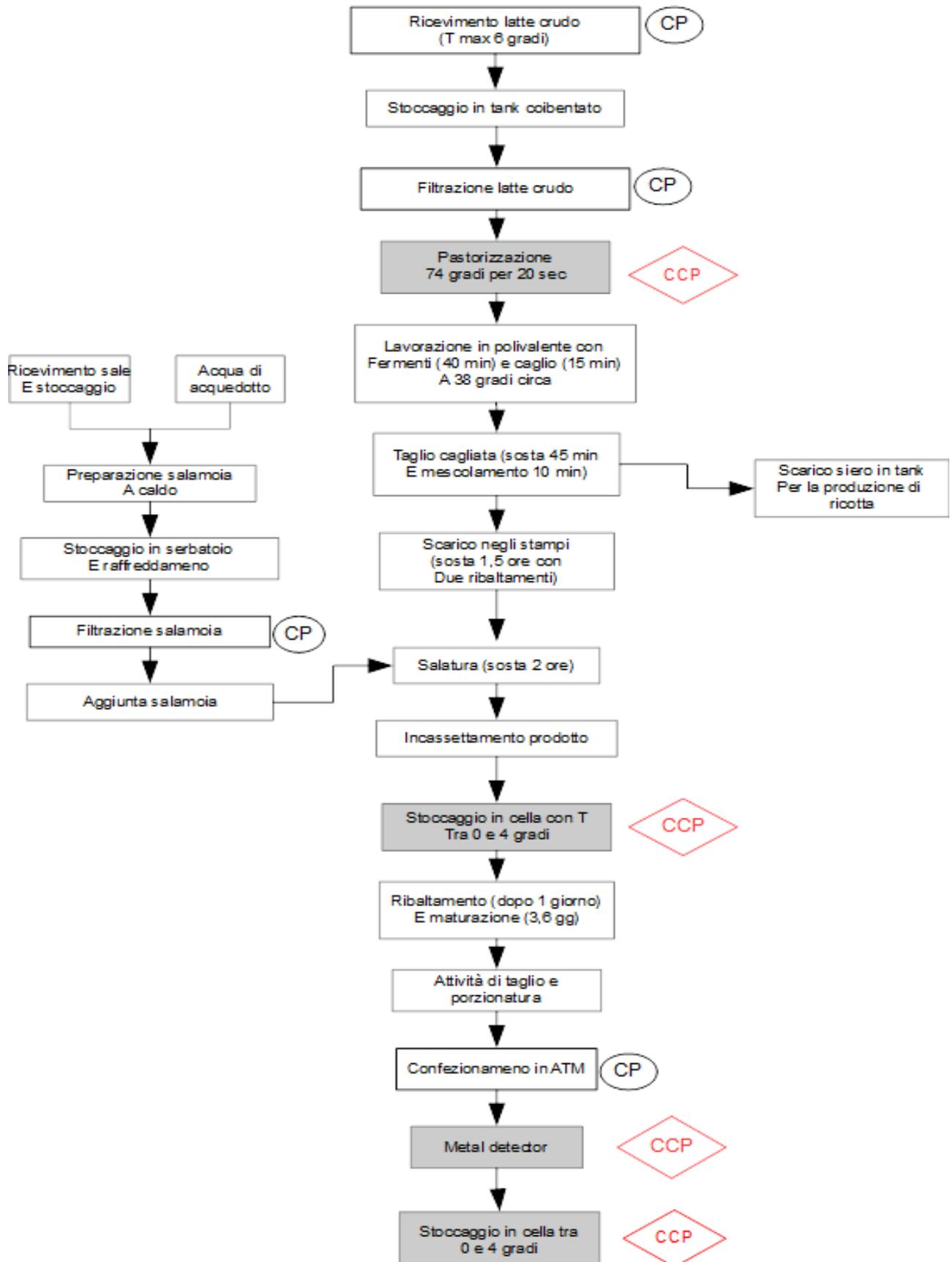
Lo stracchino prodotto da Frescolat è uno stracchino prodotto artigianalmente da latte fresco pastorizzato. Il latte crudo viene ricevuto giornalmente in azienda e scaricato in tank coibentati; dopodiché viene pastorizzato a 74 gradi per 20 secondi.

Poi viene lavorato in polivalente con fermenti lattici vivi e caglio a 38 gradi per circa un'ora fino alla formazione della cagliata. Successivamente la cagliata viene tagliata e scaricata in stampi dove viene lasciata sostare circa due ore per favorire lo spurgo del siero. In questi stampi avviene anche la salatura, ovvero si aggiunge la salamoia con concentrazione di sale al 2% e si lascia sostare il prodotto per circa due ore. Dopodiché il prodotto viene stoccato in cella refrigerata (0-4°C) e si lascia maturare per tre giorni, poi viene porzionato a mano da operatori e confezionato in packaging di polietilene e atmosfera modificata con 80 % di azoto e 20% di anidride carbonica. Infine, una volta controllato il prodotto con il metal detector, viene stoccato in cella frigorifera fino alla vendita.

Per quanto riguarda il processo di produzione i punti critici di controllo riguardano la pastorizzazione e la refrigerazione del prodotto che controllano il pericolo microbiologico e, inoltre, il passaggio con il metal detector che controlla il pericolo fisico.

Lo stracchino è un prodotto che viene spesso manipolato dagli operatori, quindi è fondamentale l'istruzione di quest'ultimi all'igiene mani per evitare contaminazioni, in particolare bisogna porre attenzione alla contaminazione di stafilococchi, ovvero microrganismi presenti normalmente nelle mani, cuoio capelluto, gola, naso degli operatori. Inoltre è importante una buona sanificazione degli impianti e dei locali per poter produrre uno stracchino con bassa carica microbica iniziale e per evitare contaminazioni del prodotto dopo la pastorizzazione.

### Diagramma di flusso produzione di stracchino



## 1.2 Microbiologia dello stracchino

Per la produzione dello stracchino il latte crudo viene pastorizzato e ciò permette l'eliminazione di tutte le cellule vegetative presenti nel latte, compresi i patogeni. Dalla pastorizzazione in poi bisogna dunque porre attenzione a tutte le operazioni del processo di produzione per evitare contaminazioni microbiologiche.

Per i criteri microbiologici degli alimenti si fa riferimento al regolamento comunitario 2073/2005 che pone i limiti di determinati microrganismi per potersi orientare sull'accettabilità dei prodotti.

Lo stracchino viene prodotto aggiungendo al latte già pastorizzato un innesto di fermenti lattici che, acidificando rapidamente il latte, promuovono la formazione della cagliata. I batteri lattici sono una famiglia di microrganismi anaerobi ossigeno-tolleranti che fermentano gli zuccheri e producono acido lattico, se fermenti omofermentanti, oppure producono acido lattico, acido acetico e anidride carbonica se fermenti eterofermentanti. Questi microrganismi sono generalmente mesofili quindi, a temperatura di refrigerazione, non crescono bene. Possono creare problemi di acidità quando l'alimento viene conservato a temperature non di refrigerazione, e quindi da 5°C in su.

Lo stracchino è un prodotto che viene manipolato dagli operatori più volte durante il processo produttivo, dunque è fondamentale istruire il personale all'igiene mani e ad un comportamento igienico adeguato durante la lavorazione dell'alimento. I microrganismi indicatori dell'igiene di processo sono enterobatteri e stafilococchi, e la loro presenza può rendere il prodotto non sicuro e ne diminuiscono la *shelf-life*.

Le *enterobacteriaceae* sono una famiglia di microrganismi ubiquitari presenti anche nella flora intestinale umana, sono bacilli Gram negativi, aerobi facoltativi, mesofili. Alcune specie sono responsabili di gastroenteriti, in particolare *E. coli* e *Salmonella* spp, infatti per questi due microrganismi il regolamento 2073/2005 pone il limite nello stracchino di meno di 100 UFC/g per il primo, mentre per la *Salmonella* assenza in 25 grammi di prodotto.

Gli stafilococchi sono batteri Gram positivi, aerobi facoltativi, presenti nella flora batterica dell'uomo e di animali ma possono anche trovarsi come commensali sulla pelle, in particolare abitano mani, cuoio capelluto, gola, naso. Alcune specie di Stafilococco possono

produrre delle tossine associate a specifiche malattie, in particolare *S. aureus* può produrre enterotossine che causano gravi gastroenteriti. Perciò il regolamento comunitario 2073/2005 pone il limite di meno di 10 UFC/g per stafilococchi coagulasi positivi.

Inoltre lo stracchino è un alimento favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*, un patogeno che può causare batteriemia e meningite, e il limite di legge prevede l'assenza di questo microrganismo in 25 grammi di prodotto.

Un altro problema microbiologico che riguarda i prodotti lattiero caseari è dato da microrganismi del genere *Pseudomonas*, e ci si è accorti del problema soprattutto dopo lo "scandalo delle mozzarelle blu" dell'estate del 2010. Questi microrganismi sono ubiquitari, Gram negativi mobili, aerobi e psicrotrofi. Possono essere patogeni e, inoltre, specie come *aeruginosa* e *fluorescens* rilasciano dei pigmenti che danno colorazione blu/verde/viola al prodotto.

Questi microrganismi non sopravvivono alla pastorizzazione perciò è essenziale lavorare in condizioni igieniche ottimali per evitare contaminazioni di *Pseudomonas* durante il processo produttivo.

Il regolamento comunitario non pone un limite per questi microrganismi ma sono presenti delle linee guida in bibliografia che pongono il limite accettabile a meno di 100.000 UFC/g, perché, se queste flore microbiche superano le  $10^5$  o  $10^6$  UFC/g, allora si sviluppano facilmente odori sgradevoli, sapore amaro oppure l'alimento si tinge di colori innaturali (V. Giaccone, 2010).

Incidono molto sulla *shelf-life* dello stracchino muffe e lieviti (Sarais I. et al., 1995).

Le muffe sono funghi pluricellulari macroscopici mentre i lieviti sono funghi unicellulari microscopici e sono generalmente quest'ultimi che proliferano maggiormente nello stracchino e ne cambiano le caratteristiche sensoriali.

Il metabolismo dei lieviti può formare peptidi amari nel prodotto, inoltre, un'elevata carica di lieviti, cambia la consistenza e il colore dello stracchino. Quindi uno stracchino con un'elevata carica di lieviti perde la sua consistenza diventando molle e gelatinoso, perde il colore bianco paglierino diventando giallognolo e assume un sapore dal retrogusto amaro.

Per evitare un'elevata concentrazione di miceti in questo prodotto è necessario cercare di sanificare nel migliore dei modi i locali di lavoro e controllare periodicamente la qualità dell'aria, soprattutto nelle celle di maturazione. Il limite di questi contaminanti non è stabilito per legge ma si può fare riferimento all'esperienza o a linee guida presenti in bibliografia: generalmente il limite per le muffe è meno di 100 UFC/g, mentre per i lieviti meno di 10.000 UFC/g.

**Tab.1 Caratteristiche microbiologiche stracchino.**

<b>Parametro</b>	<b>Valore limite alla scadenza</b>
<i>Carica microbica mesofila</i>	<1.000.000 UFC/g
<i>Coliformi totali</i>	<1.000 UFC/g
<i>Pseudomonas spp</i>	<100.000 UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	<100 UFC/g (*)
<i>Stafilococchi coagulasi positivi</i>	<10 UFC/g (*)
<i>Salmonella spp</i>	Assente in 25g (*)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Assente in 25g (*)
<i>Muffe</i>	<100 UFC/g
<i>Lieviti</i>	<10.000 UFC/g
(*)In conformità al Reg. CE 2073/2005	

Uno studio effettuato da Prencipe V. et al. (2010), mostra comunque che i livelli di contaminazione igienico-sanitario di questo prodotto sono bassi.

Su 432 stracchini analizzati nessuno è risultato positivo per *Salmonella* e *Escherichia coli* O157. Inoltre, su 437 campioni analizzati per *Listeria monocytogenes*, solo uno è risultato positivo.

### 1.3 Shelf-life

Il codex alimentarius definisce la *shelf-life* come il periodo durante il quale il prodotto mantiene la sua sicurezza microbiologica e la sua "*suitability*" ad una specifica temperatura di stoccaggio.

La determinazione della *shelf-life* è importante per stabilire la data di scadenza o il termine minimo di conservazione dell'alimento, diciture obbligatorie secondo il Regolamento CE 1169/2011.

Il termine minimo di conservazione (TMC) o la data di scadenza devono essere definiti dal produttore, salvo nei casi in cui non sia stabilita per legge. Un esempio si ha nel Decreto 24 luglio 2003: determinazione della scadenza del latte fresco pastorizzato e del latte fresco pastorizzato di alta qualità. Generalmente la legge non stabilisce il TMC o la data di scadenza, ma le caratteristiche da mantenere per tutta la durata commerciale del prodotto: ad esempio per lo yogurt la legge richiede che alla data di scadenza siano presenti un certo numero di microrganismi vivi.

Le industrie alimentari sono quindi chiamate a determinare il periodo di tempo entro il quale l'alimento si mantiene ancora "accettabile", in quanto il decadimento qualitativo nel tempo di un prodotto alimentare confezionato è un evento inevitabile ed è condizionato dall'ambiente in cui il prodotto si trova.

Inoltre se si deve considerare il tempo che corrisponde ad una tollerabile diminuzione di qualità, è necessario, prima di tutto, sapere che cosa si intende per qualità del prodotto; conoscere quale qualità/attributo dell'alimento si intende conservare più a lungo o quale si deteriora più rapidamente.

Vanno, quindi, identificate le caratteristiche che si deteriorano più rapidamente o che è necessario conservare più a lungo, ad esempio le caratteristiche igienico sanitarie, i parametri previsti da limiti di legge, il valore nutrizionale, gli aspetti sensoriali (consistenza, sapore, colore). Tali caratteristiche possono essere modificate da processi degradativi di tipo chimico (ossidazioni, imbrunimenti, ecc.), fisico (rottura di emulsioni, deformazioni meccaniche, ecc.), microbiologico (sviluppo di contaminanti microbici, ecc.) o una loro combinazione e su queste dovrà essere basato lo studio della *shelf-life*.

Per ognuna di queste caratteristiche devono quindi essere definiti dei valori soglia che non devono essere superati ovvero i limiti di tollerabilità rispetto ai quali si deve considerare il prodotto non più commercializzabile.

Per una corretta definizione della *shelf-life* va considerato non solo il processo produttivo del prodotto, che ha un impatto sulla microflora, ma anche la sua composizione, cioè considerando anche le materie prime, e anche il packaging che può avere un ruolo fondamentale nella conservazione.

Gli studi di *shelf-life* sono richiesti dalla normativa alimentare, il ministero della salute ha stabilito che è compito dell'operatore del settore alimentare applicare le procedure di autocontrollo, stabilire la durata e rispettare i criteri microbiologici stabiliti dal regolamento 2073/2005 CE del prodotto avvalendosi di studi sulla conservabilità (Ministero della Salute DGSAN 0033185-P-19/11/2009).

### **1.3.1 Studio della *shelf-life* e cinetica**

La *shelf-life* di un alimento può essere influenzata da molti fattori che possono essere suddivisi in fattori intrinseci ed estrinseci. I fattori intrinseci sono influenzati da variabili come il tipo di materia prima, la formulazione del prodotto e la sua struttura; questi fattori si riferiscono al prodotto finale e includono per esempio attività dell'acqua (*aw*), pH, potenziale di ossidoriduzione (*Eh*), nutrienti, microflora naturale, enzimi.

I fattori estrinseci, invece, sono influenzati dal processo di produzione e dalla post produzione e comprendono per esempio profili tempo-temperatura durante il processo, umidità relativa durante il processo, lo stoccaggio e la distribuzione, esposizione alla luce durante il processo, lo stoccaggio e la distribuzione, presenza di microrganismi nell'ambiente durante il processo, lo stoccaggio e la distribuzione, composizione dell'atmosfera nell'imballaggio e sua evoluzione nel corso dello stoccaggio e distribuzione, manipolazione da parte del consumatore.

I fattori estrinseci ed intrinseci influenzano la variazione nel tempo di uno specifico attributo di qualità del prodotto fino al raggiungimento di valori critici che causeranno la fine della commerciabilità del prodotto stesso; risulta essenziale per una corretta determinazione della *shelf-life*, quantificare quindi il livello minimo di qualità accettabile per l'attributo di qualità considerato durante lo studio. Questi livelli sono anche definiti "*Indices of failure*", vengono

classificati in attributi di natura chimica, fisica, microbiologica e sensoriale e possono essere monitorati e valutati con prove sensoriali o strumentali (colore, consistenza). Durante la vita commerciale di un prodotto questi indici possono diminuire come ad esempio il contenuto di una vitamina o aumentare come la produzione di una sostanza indesiderata e quindi determinare un decadimento qualitativo del prodotto.

Per la maggior parte dei prodotti confezionati il decadimento qualitativo del prodotto nel tempo può essere rappresentato dalla seguente equazione:

$$\pm \frac{dA}{dt} = kA^n$$

Dove:

A = grandezza che esprime l'indice di qualità;

t = tempo;

k = costante di velocità specifica della variazione di A;

n = numero  $\geq 0$  che esprime l'ordine di reazione.

Se A diminuisce al diminuire della qualità l'equazione ha segno negativo altrimenti se aumenta è positivo. In base all'esponente n il quale può essere 0, 1, 2 avremo una cinetica differente ossia di ordine zero, di primo ordine o di secondo passando da una relazione lineare a curve sempre più accentuate.

La tabella di seguito riporta le equazioni delle cinetiche di ordine zero, primo e secondo, e le equazioni integrate utili per ricavare le formule necessarie a trovare il tempo di *shelf-life*.

**Tab. 2 Leggi cinetiche.**

Legge cinetica	Forma integrata	<i>Shelf-life</i>
$n=0 \quad \frac{dA}{dt} = k$	$A = A_0 + kt$	$t = \frac{A - A_0}{k}$
$n=1 \quad \frac{dA}{dt} = kA$	$\ln A = \ln A_0 + kt$	$t = \frac{\ln A - \ln A_0}{k}$
$n=2 \quad \frac{dA}{dt} = kA^2$	$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} + kt$	$t = \frac{\frac{1}{A} - \frac{1}{A_0}}{k}$

La cinetica di ordine zero, la quale è indipendente dalla concentrazione dei reagenti, descrive i processi degradativi come ossidazione dei grassi, degradazioni enzimatiche, imbrunimento non enzimatico.

La cinetica di primo ordine descrive numerose reazioni chimiche e molti fenomeni complessi come irrancidimento dei grassi, proliferazione microbica, mortalità dei microrganismi nei trattamenti termici, produzione di composti volatili, perdita di valore biologico nelle proteine.

Infine un esempio di cinetica di secondo ordine è la distruzione della vitamina C.

## 1.4 Utilizzo dell'analisi sensoriale nello studio di *shelf-life*

L'analisi sensoriale è il fattore chiave per determinare la *shelf-life* di molti prodotti.

Alimenti microbiologicamente stabili, come biscotti o cracker, devono la loro *shelf-life* al cambiamento delle caratteristiche organolettiche. Anche cibi freschi, come lo stracchino, possono essere microbiologicamente stabili vicino alla data di scadenza ma non accettabili dal punto di vista sensoriale.

Per questo motivo l'analisi sensoriale è fondamentale negli studi di *shelf-life*, proprio perché permette di definire l'accettabilità del prodotto dal punto di vista della texture, del sapore, dell'odore e di altri parametri organolettici.

Ci sono diversi metodi sensoriali utilizzati ma in particolare si dividono in: analisi sensoriale di tipo analitico e analisi sensoriale di tipo edonistico/affettiva.

Nell'analisi sensoriale di tipo analitico è presente un panel di esperti addestrato a descrivere o discriminare prodotti, prescindendo dalle proprie opinioni personali; l'analisi sensoriale di tipo affettivo invece prevede un panel formato da consumatori che esprime il proprio parere sull'accettabilità di uno o più prodotti.

Nelle prove di *shelf-life* si ricorre generalmente ad un test di tipo edonistico, cioè viene fatto assaggiare il prodotto ad un panel di consumatori non addestrati, ma abituali del prodotto da valutare, e viene chiesto di esprimere un punteggio per le diverse caratteristiche del prodotto: per esempio si può esprimere un punteggio da zero a quattro per le caratteristiche sapore, odore, consistenza, dove zero equivale a sapore sgradevole e quattro a sapore molto gradevole.

Questo tipo di analisi sensoriale è utilizzata per le prove di *shelf-life* perché l'obiettivo è quello di capire quando il prodotto risulta non più accettabile per il consumatore dal punto di vista organolettico. Si può quindi stimare la data di scadenza o termine minimo di conservazione dell'alimento considerando sia il risultato delle analisi microbiologiche sia il risultato dell'analisi sensoriale. Inoltre i test di tipo discriminanti effettuati da panel addestrati non sono adeguati per questo tipo di studi poiché potrebbero giudicare sgradevoli delle caratteristiche specifiche del prodotto che i consumatori, in quanto non addestrati, non contemplano.

## 1.5 Microbiologia predittiva

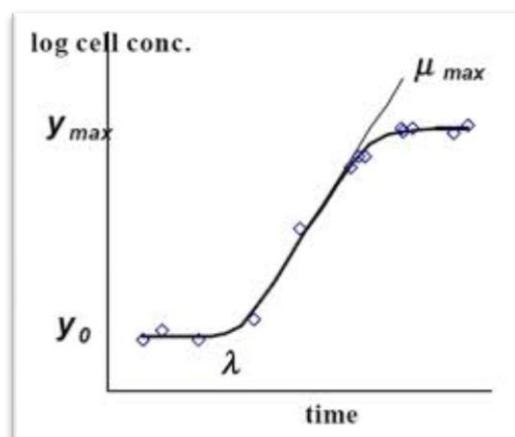
Per determinare la *shelf-life* dello stracchino sono stati utilizzati modelli di microbiologia predittiva.

La microbiologia predittiva PFM (*Predictive Food Microbiology*) è una branca della microbiologia degli alimenti che studia il comportamento dei microrganismi (crescita, produzione di metaboliti e morte dei microrganismi) in condizioni ambientali diverse, importanti per la conservazione e per la sicurezza igienica degli alimenti, avvalendosi di modelli matematici, al fine di rendere più semplici le procedure per la determinazione del rischio alimentare.

I modelli matematici impiegati nella microbiologia predittiva sono suddivisi in tre tipi:

- primario
- secondario
- terziario

I **modelli primari** utilizzano espressioni matematiche per descrivere l'inattivazione, la crescita o la sopravvivenza della popolazione microbica in funzione del tempo in determinate condizioni ambientali e colturali. Il parametro principale dei modelli primari è la velocità di crescita specifica ( $\mu$ ) che può essere descritta come il numero di divisioni cellulari per unità di tempo e viene rappresentata graficamente con una sigmoide.



Uno dei modelli primari maggiormente utilizzati per lo studio della crescita microbica in funzione del tempo è il modello di **Baranyi and Roberts**. La funzione di Baranyi è quella che descrive il comportamento dei microrganismi in funzione del tempo in substrati non costanti.

$$y=y_0+\mu^*A-\ln\left[1+\frac{\exp(\mu^*A)-1}{10^{y_{\max}-y_0}}\right]$$

**(y)** rappresenta il logaritmo naturale della conta microbica

**(μ)** rappresenta la velocità massima di accrescimento

**(A)** è una funzione di adattamento che esprime l'avvicinamento delle cellule alla condizione nella quale si sviluppano alla velocità  $\mu_{\max}$ .

I **modelli secondari** descrivono i parametri dei modelli primari in funzioni delle condizioni ambientali in cui si trovano i microrganismi, vengono presi in considerazione fattori quali temperatura e atmosfera modificata, pH, aw, conservanti, competizione batterica e metaboliti prodotti.

I modelli secondari quindi studiano come varia il parametro principale ( $\mu$ ) dei modelli primari in funzione di molteplici fattori esterni, questi essendo in numero variabile vengono studiati utilizzando modelli matematici che sono polinomi multivariati (Ross T. and McMeekin T. A., 2003).

Il substrato alimentare è complesso e le variabili che influenzano l'andamento possono essere decine; generalmente nei modelli se ne considerano al massimo 4, che sono le tre variabili ambientali principali e l'aggiunta di un ulteriore parametro che può essere la presenza di acidi organici, conservanti, CO<sub>2</sub>.

Uno dei modelli secondari maggiormente utilizzato in microbiologia predittiva è il modello cinetico lineare di Arrhenius e descrive la velocità di crescita microbica in relazione ad alcuni parametri ambientali come la temperatura. L'effetto della temperatura sulla velocità di crescita è descritto da questa equazione:

$$\mu = A \cdot \exp(-E_{\mu}/RT)$$

$\mu$  è la velocità specifica di crescita espressa in  $\log(\text{CFU/g})\text{d}^{-1}$ ; **A** è il fattore pre-esponenziale o fattore di Arrhenius, è una costante che esprime la dipendenza della

costante cinetica  $K$  dalla temperatura espressa in  $\log(\text{UFC/g})\text{d}^{-1}$ ;  $E_{\mu}$  è l'energia di attivazione espressa in KJoule/mol;  $R$  è la costante dei gas ed è uguale a 8.31 Joule/Kmol;  $T$  è la temperatura assoluta espressa in Kelvin.

I **modelli terziari** combinano uno o più modelli primari e secondari, per generare un sistema in grado di predire il comportamento di specifici microorganismi, quando sottoposti a differenti condizioni ambientali.

La grande mole di dati generati da ricercatori e scienziati di tutto il mondo nel campo della microbiologia predittiva sono raccolti e gestiti da ComBase, un database pubblico realizzato e supportato da un consorzio di enti di ricerca, università di vari paesi, organizzazioni governative e centri di ricerca aziendale.

Gli strumenti di calcolo che vengono utilizzati in questa branca della microbiologia sono rappresentati da specifici software matematici e statistici disponibili online: un esempio è ComBase predictor, presente sul sito ComBase, costituito da modelli di crescita, di inattivazione termica, e di sopravvivenza per diversi microorganismi in funzione dei 3 principali fattori di crescita (pH,  $a_w$  e temperatura) e di fattori secondari come conservanti e  $\text{CO}_2$ . Esistono anche software per la modellazione microbica che sono specifici per lo studio di determinati microorganismi o alimenti (*Perfringens Predictor* e *Seafood spoilage and safety predictor*).

## 1.6 Shelf-life a temperatura non costante

Tra i fattori estrinseci che influenzano la velocità del decadimento qualitativo del prodotto, la temperatura di conservazione svolge un ruolo rilevante; essa, infatti, rappresenta uno dei principali ostacoli allo sviluppo microbico e influenza quindi la stabilità e la qualità del cibo.

Risulta quindi importante la scelta del valore di temperatura a cui effettuare le prove di *shelf-life* del prodotto per una corretta validazione del tempo di conservabilità dell'alimento. Per rendere lo studio di *shelf-life* il più realistico possibile conviene realizzare le prove considerando tutti i cambiamenti termici a cui è sottoposto il prodotto dallo stoccaggio in azienda al consumo. Per i prodotti refrigerati, come lo stracchino, è importante considerare che la catena del freddo non viene rispettata durante tutta la filiera ed è quindi importante valutare le temperature a cui il prodotto è prevedibilmente sottoposto. Anche se non vi sono molti dati disponibili in bibliografia in merito ai profili termici temperatura-tempo a cui i prodotti refrigerati sono sottoposti successivamente alla fase di produzione, la **tabella 3** riporta uno scenario realistico di distribuzione che prevede le quattro fasi di stoccaggio in azienda e trasporto, esposizione nel punto vendita, trasporto da parte del consumatore e stoccaggio nel frigorifero domestico.

**Tab. 3** Fasi temperatura-tempo a cui i prodotti refrigerati sono sottoposti durante la loro *shelf-life*.

Fase	Tempo	Temperatura (°C)	Riferimenti bibliografici
Temperatura 1 stoccaggio/trasporto presso il produttore	25% della <i>shelf-life</i>	0÷5	Valutazione delle temperature medie del produttore
Temperatura 2 esposizione nel punto vendita	60% della <i>shelf-life</i>	4÷7	80% dei prodotti venduti entro il 60% della <i>shelf-life</i> (Nauta et al., 2003). Studio effettuato in UK e Danimarca ha messo in evidenza che solo il 41-45% dei prodotti è mantenuto <5° C.
Temperatura 3 trasporto da parte del consumatore	43±18 min.	10÷25	Evans et al., (1991).
Temperatura 4 stoccaggio nel frigorifero domestico	1÷5 giorni	6÷10	Evans et al., (1991). Flynn et al., (1992). Laguerre et al., (2002). Kennedy et al., (2005).

Come si può vedere, con la sola esclusione della prima fase (temperatura 1) gestita dal produttore e che generalmente rappresenta il 25% della *shelf-life* totale dell'alimento (le catene di distribuzione non accettano generalmente prodotti con una *shelf-life* residua inferiore al 75%), la temperatura risulta sempre superiore al valore di 4°C, spesso utilizzato nelle prove di conservazione per i prodotti refrigerati dai laboratori di analisi.

Dati ottenuti dal monitoraggio effettuato durante l'esposizione nei punti vendita mettono in rilievo che la temperatura è compresa nell'intervallo tra 4 e 7°C arrivando in alcuni casi anche a valori prossimi ai 10°C. Inoltre, la temperatura dipende anche dalla disposizione dei prodotti all'interno del banco frigo, infatti la temperatura risulta maggiore nella zona che si trova sotto l'illuminazione e minore nella zona più bassa in prossimità della parete del banco frigo. Ovviamente, notevole importanza riveste anche la gestione del carico nel banco frigo, poiché un eccessivo carico del bancone non permette al prodotto, soprattutto al cuore, di raggiungere la corretta temperatura di conservazione +4°C (Rovere et al., 2009).

La fase che vede l'acquisto dell'alimento, il trasporto e lo stoccaggio nel frigorifero da parte del consumatore, è caratterizzata dall'esposizione dell'alimento a elevate temperature.

Come messo in evidenza da uno studio bibliografico (Jevšnik et al., 2008), solo il 50% dei consumatori utilizza un sistema adeguato per il trasporto dei prodotti refrigerati e un'ora di trasporto a temperatura ambiente consente di incrementare la temperatura del prodotto fino a 15-30°C (James & Evans, 1992). I consumatori purtroppo, hanno una scarsa conoscenza della "catena del freddo" e del proprio ruolo e attribuiscono la responsabilità della corretta conservazione esclusivamente ad altre parti della filiera (Ovca & Jevšnik, 2009). Dalla tabella, infatti, si può vedere come sia il trasporto, sia la conservazione del prodotto in frigorifero, sia caratterizzata da temperature che non rispettano quelle della catena del freddo. Uno studio americano (Kennedy et al., 2005) ha messo in evidenza che in cento frigoriferi domestici monitorati per mezzo di un registratore il 71% aveva una temperatura media superiore a 5 °C, circa il 25% aveva una temperatura media compresa nell'intervallo 6 e 7°C e, complessivamente, le temperature rilevate variavano nell'intervallo -1.7 °C a 11.8 °C.

Con queste premesse è quindi importante calcolare la *shelf-life* del prodotto cercando di considerare la sua storia termica, e ciò è possibile utilizzando l'equazione di Arrhenius.

Con il modello lineare, valido per intervalli di temperatura relativamente ristretti (massimo di 30 °C), è possibile ricavare dal coefficiente angolare della retta ottenuta diagrammando il

logaritmo della *shelf-life* ( $\theta$ ) rispetto alla temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) il valore del Q10 un quoziente che indica come la reazione proceda più velocemente ad una temperatura ( $T_2$ ) che non ad una temperatura più bassa di  $10^{\circ}\text{C}$  ( $T_1$ ).

$$\theta_s = \theta_0 e^{-b(T_s - T_0)}$$

Utilizzando l'equazione di Arrhenius è possibile calcolare, la "temperatura effettiva" ( $T_{\text{eff}}$ ) definita come il "valore di una singola temperatura derivata che, se mantenuta durante un tempo definito, procura il medesimo effetto termico all'alimento che si avrebbe con una sequenza di temperature più basse o più alte per un periodo di tempo equivalente". In questo modo risulta possibile ricondurre le fluttuazioni di temperatura-tempo presenti in un dato profilo termico ad un unico valore di temperatura, facilitando l'esecuzione delle prove di conservabilità. Introducendo questo concetto, che rappresenta l'effetto complessivo di un trattamento non isotermico con un valor costante nell'equazione generale che descrive l'andamento della funzione qualità ( $f_q(A)$ ) con la variazione della temperatura nel tempo, si ottiene la seguente espressione:

$$f_q(A) = \int_0^{t_{\text{tot}}} k[T(t)] dt = k_{\text{eff}} t_{\text{tot}}$$

dove  $K_{\text{eff}}$  è il valore della velocità con cui la reazione di degradazione dell'alimento procede alla temperatura effettiva. Se la funzione  $T(t)$  viene suddivisa in piccoli intervalli temporali con  $T$  costante e con  $\sum t_i = t_{\text{tot}}$  otteniamo la seguente espressione:

$$k_{\text{rif}} \sum_i \left( \exp \left[ -\frac{E_a}{R} \left( \frac{1}{T_i} - \frac{1}{T_{\text{ref}}} \right) \right] t_i \right) = k_{\text{eff}} t_{\text{tot}}$$

che consente di calcolare il valore di  $K_{\text{eff}}$  e, di conseguenza, la temperatura effettiva dal modello di Arrhenius (Steele, 2004).

Possiamo conservare l'alimento con una sequenza di temperature variabili ( $T$ ) per il tempo ( $t$ ) complessivo ( $t_{\text{tot}}$ ), oppure, trasformare tale profilo termico in una conservazione per il tempo complessivo ( $t_{\text{tot}}$ ) ad una temperatura costante, detta temperatura effettiva ( $T_{\text{eff}}$ ), o, infine, conservare il prodotto per un tempo equivalente ( $t_{\text{eq}}$ ) ad una temperatura costante, detta temperatura equivalente ( $T_{\text{eq}}$ ).

## 2.MATERIALI E METODI

### 2.1 Piano sperimentale

Per iniziare uno studio di *shelf-life* è fondamentale cercare di capire quali sono i fattori microbiologici, chimici, fisici che contribuiscono maggiormente al decadimento dell'alimento.

Per capire quali microrganismi potessero essere più problematici per lo stracchino sono state consultate delle analisi condotte sull'alimento fresco e al momento della scadenza ed è stato stabilito di ricercare per lo studio muffe e lieviti, enterobatteri e *Pseudomonas aeruginosa*.

All'analisi microbiologica del prodotto è stata associata l'analisi sensoriale, con un panel di personale non addestrato, in modo da condurre un test edonistico.

Il panel doveva dare un punteggio da zero a quattro, dove zero è pessimo e quattro è ottimo, a determinate caratteristiche dello stracchino quali aspetto generale, colore, odore, sapore e consistenza.

Una volta stabilite le analisi microbiologiche da effettuare e come organizzare l'analisi sensoriale è stato deciso di condurre lo studio a tre diverse temperature (3°C,7°C,12°C) per capire come la temperatura potesse influire sulla crescita dei diversi microrganismi e sui parametri chimico-fisici dell'alimento.

Per motivi strumentali non è stato analizzato lo stesso lotto alle tre diverse temperature ma sono stati analizzati tre diversi lotti: è importante tener conto di questo aspetto quando si analizzano i risultati dato che ogni lotto differisce

Fig.1 Lotto di stracchini.

leggermente dagli altri dal punto di vista microbiologico ed organolettico.

Ad ogni temperatura sono stati fatti cinque prelievi in doppio del campione e, inoltre, ad ogni prelievo è stato utilizzato un terzo campione per l'analisi sensoriale: quindi prima di ogni studio venivano confezionati venti stracchini di 100 grammi l'uno e venivano posti nel frigorifero del laboratorio impostato alla temperatura stabilita (figura 1).



Alla temperatura di 3°C sono stati fatti cinque prelievi nei giorni di *shelf-life* zero, sei, sedici, venti e ventisette: i prelievi a questa temperatura risultano abbastanza distanti l'uno dall'altro poiché la crescita microbica e il cambiamento delle caratteristiche chimico-fisiche dell'alimento avvengono lentamente a temperatura di refrigerazione.

Alla temperatura di 7°C sono stati effettuati cinque prelievi nei giorni di *shelf-life* zero, quattro, undici, quattordici e diciotto.

Alla temperatura di 12°C sono stati effettuati cinque prelievi nei giorni di *shelf-life* zero, quattro, sette, undici e quindici: in questo caso i prelievi risultano più vicini tra loro perché, a questa temperatura, la crescita microbica è più veloce e le reazioni chimico-fisiche avvengono più velocemente nell'alimento.

Nella tabella 4 è riportato il piano di campionamento appena descritto.

**Tab.4 Schema di campionamento della prova di shelf-life per lo stracchino.**

T °C	Tempo (gg)																										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	27				
3						X										X					X			X			
7	X			X							X			X				X									
12				X			X				X				X												

## 2.2 Materiali e attrezzature

Per condurre le analisi microbiologiche sono stati utilizzati i seguenti materiali per la preparazione dei terreni: bottiglie, becher, provette costruite in materiale chimicamente inerte ed in grado di sopportare ripetute sterilizzazioni; piastre di Petri, in plastica monouso, sterili, del diametro di 90 mm; pipette graduate sterili in plastica monouso di capacità 1 mL, graduate con divisione 0,1 mL; anse da spatolamento in plastica, sterili; pipette graduate in vetro; ancorette magnetiche. Inoltre per la preparazione del campione sono stati utilizzati sacchetti sterili per il campionamento e spatole di acciaio.

Fig.2 Autoclave.



Fig.3 Incubatore.



Le attrezzature che sono state utilizzate per condurre lo studio di *shelf-life* sono: autoclave per la sterilizzazione a calore umido (per la vetreria e terreni di coltura) capace di operare a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; bilancia tecnica; bagnomaria, in grado di operare a  $45\text{-}65^{\circ}\text{C}$ ; agitatore automatico (Stomacher); agitatore (Vortex); cappa a flusso laminare; piastra scaldante e agitante; due incubatori; frigorifero capace di operare tra  $+3^{\circ}\text{C}$  e  $+50^{\circ}\text{C}$ ; pHmetro e soluzioni per la calibrazione dello strumento.

## 2.3 Preparazione dei terreni di coltura e piastre

I microrganismi che sono stati ricercati nello stracchino sono muffe e lieviti, enterobatteri e *Pseudomonas aeruginosa*.

Il terreno per l'isolamento e l'enumerazione di muffe e lieviti che è stato utilizzato è il *Rose Bengal Agar*. La preparazione di questo prevede di pesare e sciogliere 36,6 grammi di terreno su un litro di acqua demineralizzata in un becher e poi la soluzione viene agitata e riscaldata nell'agitatore magnetico fino ad ebollizione. Dopodiché il terreno viene versato su una bottiglia di vetro e posta in autoclave per la sterilizzazione a 121°C per 15 minuti. Una volta sterilizzato, il terreno viene lasciato raffreddare nel bagnomaria impostato a 50°C, e poi versato nelle piastre di Petri in quantità di circa 25 mL. Quest'ultima operazione viene effettuata sotto cappa a flusso laminare e le piastre rimangono senza coperchio fino a che il terreno non si è raffreddato e solidificato completamente, ciò per evitare la formazione di condensa all'interno delle piastre. Quando le piastre sono pronte la semina del campione avviene per spatolamento.

Fig. 4 Piastre con terreno per muffe e lieviti (rosa) e per *Pseudomonas* (giallo)

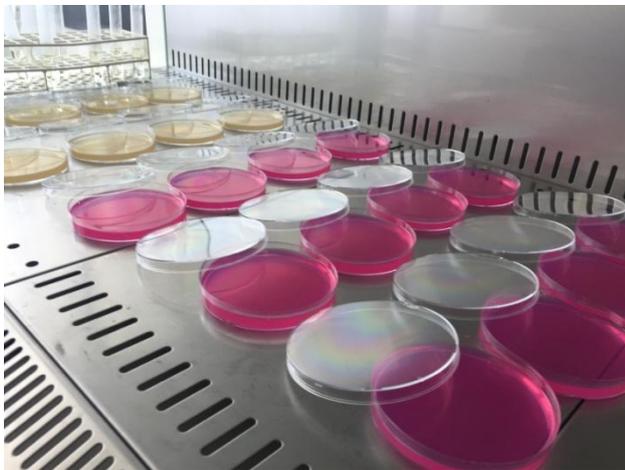
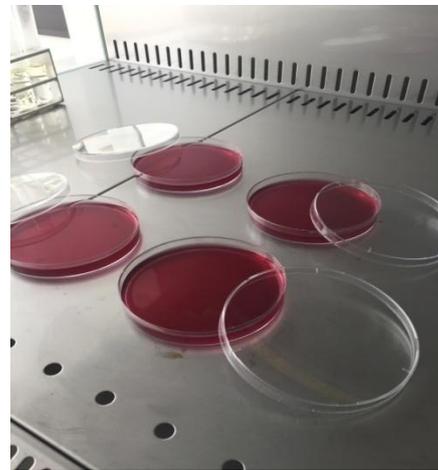


Fig.5 Piastre con terreno per enterobatteri.



Per l'isolamento e l'enumerazione delle *Enterobacteriaceae* è stato utilizzato il terreno *Violet Red Bile Glucose Agar*. Questo viene preparato pesando e sciogliendo 41,5 grammi di terreno su un litro di acqua mineralizzata all'interno di un becher, poi la soluzione viene posta ad agitare e riscaldare fino ad ebollizione. Il terreno viene versato in una bottiglia di vetro e posto in autoclave per essere sterilizzato. Dopodiché viene messo nel bagnomaria a raffreddare fino a 50°C. La semina viene fatta per inclusione quindi il terreno viene versato

nelle piastre di Petri solo dopo che è stato versato 1mL di sospensione batterica e poi lasciato raffreddare (ISO 21520-2, 2004).

Per l'isolamento e l'enumerazione di *Pseudomonas aeruginosa* è stato utilizzato il terreno *Pseudomonas CN Agar Base*. Questo viene preparato pesando e sciogliendo 50,6 grammi di terreno su un litro di acqua demineralizzata all'interno di un becher che viene poi messo ad agitare e a scaldare fino ad ebollizione. In seguito il terreno viene versato in una bottiglia di vetro e sterilizzato in autoclave. Poi viene posto nel bagnomaria a raffreddare fino a 50°C e viene aggiunta una soluzione di supplemento selettivo per *P. aeruginosa* nel terreno. Il supplemento selettivo (Penicillina G e Natamicina) viene ricostituito con 1 mL di acqua distillata sterile. Dopodiché il terreno viene versato nelle piastre Petri e una volta solidificato viene fatta la semina per spatolamento (ISO/TS 11059, 2009).

Ad ogni prelievo, inoltre, è stato misurato il **pH** dell'alimento con un pHmetro. Prima di ogni misurazione lo strumento veniva calibrato con le soluzioni a pH 4 e pH 7.

Per la misurazione il bulbo dell'elettrodo veniva immerso per almeno 4 cm all'interno del campione e dopo circa 30 secondi compariva il risultato.

## **2.4 Preparazione delle diluizioni decimali e semina**

Al momento dell'analisi microbiologica lo stracchino è stato prelevato dal frigo, aperto e, con la spatola di acciaio sterilizzata in autoclave, mescolato ed omogeneizzato il più possibile. Sono stati poi pesati 10 grammi di prodotto all'interno di un sacchetto sterile e aggiunti 90 mL di soluzione peptonata in modo da avere la soluzione madre con diluizione di  $10^{-1}$ . Il sacchetto viene poi messo all'interno dell'agitatore meccanico (Stomacher) per essere ben mescolato e omogeneizzato. L'agitazione viene fatta due volte per un periodo di 30 secondi in modo da evitare il surriscaldamento del campione. Dopodiché, sotto cappa a flusso laminare, si procede con le altre diluizioni trasferendo 1 mL di campione diluito in un tubo contenente 9 mL di soluzione peptonata sterile per formare la diluizione di  $10^{-2}$ , e si mescola con il Vortex. Trasferendo 1 mL di quest'ultima diluizione in un altro tubo contenente 9 mL di soluzione peptonata si ottiene una diluizione del campione di  $10^{-3}$ , e così via (ISO 8261, 2001).

Quando lo stracchino si trova all'inizio della *shelf-life* vengono seminate sulle piastre le diluizioni più basse poiché ci si aspetta una carica microbica bassa, mentre, con l'avvicinarsi alla scadenza del prodotto, si seminano le diluizioni più alte per poter contare le colonie nelle piastre poiché ci si aspetta una carica microbica maggiore.

Per la ricerca di **muffe e lieviti** viene trasferito 0,1 mL di ogni diluizione su due piastre Petri con terreno solidificato, poi con un'ansa sterile si spatola il liquido in modo da renderlo omogeneo sul terreno. Le piastre, una volta fatta la semina, vengono chiuse con parafilm, etichettate con il giorno, numero del campione, diluizioni, e poste in incubatore a 25°C per tre giorni. Le colonie che si formano sono tonde e di colore bianco/grigio.

Per la ricerca degli **enterobatteri** viene trasferito 1 mL di ogni diluizione su due piastre Petri, poi viene versato il terreno sterile in quantità di circa 15 ml, si mescola la piastra con movimenti rotatori e si lascia solidificare il terreno. Dopo circa 15 minuti si aggiungono altri 10 mL di terreno e si lascia solidificare. Poi le piastre vengono chiuse con parafilm, etichettate e messe ad incubare a 37°C per 24 ore. Le colonie che si formano sono tonde e di colore rosa.

Per la ricerca di ***Pseudomonas aeruginosa*** viene trasferito 0,1 mL di ogni diluizione su due piastre Petri e si spatola il liquido con un'ansa sterile. Dopodiché le piastre vengono chiuse, etichettate e messe ad incubare a 25°C per 24 ore. Le colonie che si formano sono tonde e di colore verde.

Una volta seminate le piastre e lasciate incubare al tempo e alla temperatura adeguati, sono state contate le colonie cresciute.

Per determinare la carica microbica totale è stato considerato un numero di colonie compreso tra 30 e 300 ed è stato moltiplicato per il fattore di diluizione. Per esempio se sono cresciute 140 colonie in una piastra con diluizione  $10^{-3}$ , allora l'operazione è:

$$140 \times 10^3 = 1,4 \times 10^5 \text{ UFC/ml}$$

Sono stati analizzati ad ogni prelievo 2 campioni in doppio e per ottenere il risultato è stata fatta la media dei quattro valori ottenuti ed è stata considerata la deviazione standard.

Fig.6 Colonie di muffe e lieviti.



La figura 6 rappresenta colonie di muffe e lieviti cresciute in piastre seminate a tre diverse diluizioni. La diluizione di  $10^{-3}$  presenta tre colonie, la diluizione di  $10^{-2}$  presenta dieci colonie, mentre la diluizione di  $10^{-1}$  presenta 73 colonie. Per determinare la carica microbica su grammo è stata considerata la piastra con diluizione di  $10^{-1}$  poiché contiene un numero di colonie compreso tra 30 e 300 (ISO 7218, 2007).

## 2.5 Analisi sensoriale

Ad ogni prelievo dello stracchino per le analisi microbiologiche è stata anche condotta l'analisi sensoriale.

Il panel scelto per l'analisi era formato da 6 persone interne all'azienda, non addestrate, ma consumatori del prodotto. Prima di cominciare lo studio di *shelf-life* è stata fatta una breve introduzione al panel riguardante l'analisi sensoriale: è stato spiegato agli operatori che l'analisi era importante per capire quando lo stracchino poteva essere considerato accettabile o meno, inoltre è stato richiesto di compilare le schede sensoriali in modo autonomo, senza parlare o commentare per non influenzare le risposte.

Il panel doveva dare un punteggio da 0, pessimo, a 4, ottimo, per l'aspetto generale, il colore, l'odore, il sapore e la consistenza dello stracchino. Il panel non era al corrente del giorno di *shelf-life* a cui si trovava l'alimento.

Per l'assaggio del prodotto una confezione di stracchino veniva aperta, suddivisa in sei parti e distribuita al panel in piatti bianchi di plastica. Ogni giudice aveva una scheda dove poteva

segnare il proprio giudizio per le diverse caratteristiche del prodotto. Inoltre sono state fatte ulteriori annotazioni su determinate caratteristiche del prodotto come sapore e consistenza: per esempio, se il sapore risultava sgradevole, veniva annotato che il prodotto risultava troppo amaro.

La scheda distribuita al panel per l'analisi sensoriale era così composta:

## ANALISI SENSORIALE STRACCHINO VACCINO

**Data:**

**Temperatura:**

**Giorno di SL:**

**Nome operatore:**

<b>CARATTERISTICA</b>	<b>Punteggio 4 =ottimo</b>	<b>Punteggio 3 =buono</b>	<b>Punteggio 2 =medio</b>	<b>Punteggio 1 =mediocre</b>	<b>Punteggio 0 =scadente</b>
Aspetto generale					
Colore					
Odore					
Sapore					
Consistenza					

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1 Muffe e lieviti, enterobatteri, *Pseudomonas aeruginosa* in stracchino

Per quanto riguarda il parametro “muffe e lieviti” i risultati ottenuti alle tre temperature sono riportati nella tabella 5. Le piastre hanno mostrato prevalenza di colonie di lieviti, ovvero colonie bianche senza la presenza di micelio. Questo dimostra che nello stracchino è maggiore la concentrazione di lieviti, ciò in accordo anche con l’articolo di Sarais et al. (1996).

**Tab.5 Risultati analisi microbiologiche muffe e lieviti in log ± DEV. ST**

3°C		7°C		12°C	
Tempo (gg)	Log UFC/g	Tempo (gg)	Log UFC/g	Tempo (gg)	Log UFC/g
0	1,8 ± 0,20	0	2,0 ± 0,12	0	2,0 ± 0,03
6	2,0 ± 0,08	4	3,0 ± 0,04	4	3,0 ± 0,04
16	2,8 ± 0,15	11	4,5 ± 0,04	7	4,9 ± 0,10
20	4,0 ± 0,09	14	4,9 ± 0,03	11	5,0 ± 0,07
27	4,8 ± 0,01	18	5,0 ± 0,04	15	5,1 ± 0,14

Le analisi microbiologiche sono state condotte in doppio su due campioni e risultato finale è espresso come la media delle quattro misurazione effettuate con il valore di deviazione standard ottenuto.

Sono stati analizzati tre lotti diversi e, come si può vedere dai valori riportati in tabella tutte le aliquote analizzate a tempo zero presentavano circa un valore iniziale di microrganismi pari a 2 logUFC/g. Il valore ottenuto è in accordo con quanto riportato da Sarais et al. (1996) la quale riporta nello studio da loro effettuato concentrazioni iniziali pari a 1,58 logUFC/g.

I dati inoltre, mettono in evidenza come la temperatura influisca sulla crescita microbica per il parametro oggetto di studio, infatti al ventisettesimo giorno di *shelf-life* a 3°C la carica risulta di circa 4,8 logUFC/g mentre al quindicesimo giorno di *shelf-life* a 12°C la carica di muffe e lieviti è più di 5 logUFC/g, quindi maggior carica in minor tempo a causa della temperatura di conservazione più elevata. Anche questi valori sono in accordo con quanto riportato da Sarais et al. la quale riporta che, in campioni conservati a 4°C, la popolazione di

lieviti aumentava in circa 28 giorni fino a raggiungere valori medi compresi tra 2 e 5 unità log in campioni conservati sottovuoto.

Per quanto riguarda il parametro “**enterobatteri**” i risultati ottenuti dalle analisi microbiologiche sono riportati in tabella 6.

Anche in questo caso, come per muffe e lieviti, sono stati analizzati due campioni di stracchino in doppio, quindi i risultati sono espressi come la media dei valori ottenuti riportando inoltre, la deviazione standard ottenuta.

**Tab.6 Risultati analisi microbiologiche enterobatteri in log ± DEV. ST**

3°C		7°C		12°C	
Tempo (gg)	Log UFC/g	Tempo (gg)	Log UFC/g	Tempo (gg)	Log UFC/g
0	1,7 ± 0,08	0	1,7 ± 0,05	0	1,6 ± 0,05
6	1,8 ± 0,05	4	1,9 ± 0,08	4	1,8 ± 0,20
16	2,0 ± 0,11	11	2,0 ± 0,06	7	1,9 ± 0,16
20	2,1 ± 0,10	14	2,1 ± 0,10	11	2,2 ± 0,17
27	2,2 ± 0,06	18	2,2 ± 0,06	15	2,3 ± 0,20

Dalla tabella 6 si può notare che la carica iniziale di enterobatteri nei lotti di stracchino è di circa 1,7 logUFC/g e che arriva ad un massimo di 2,3 logUFC/g negli ultimi prelievi.

Quindi la contaminazione da enterobatteri è bassa nel prodotto e inoltre questi microrganismi non raggiungono elevate cariche probabilmente a causa dell’acidificazione del prodotto durante la *shelf-life*, infatti il pH basso limita la crescita di questi microrganismi.

Per quanto riguarda il parametro “***Pseudomonas aeruginosa***” non è stata rilevata in nessuno dei lotti analizzati.

L’assenza del microrganismo è stata confermata sia nei campioni analizzati internamente presso il laboratorio aziendale che nei campioni analizzati presso un laboratorio accreditato esterno.

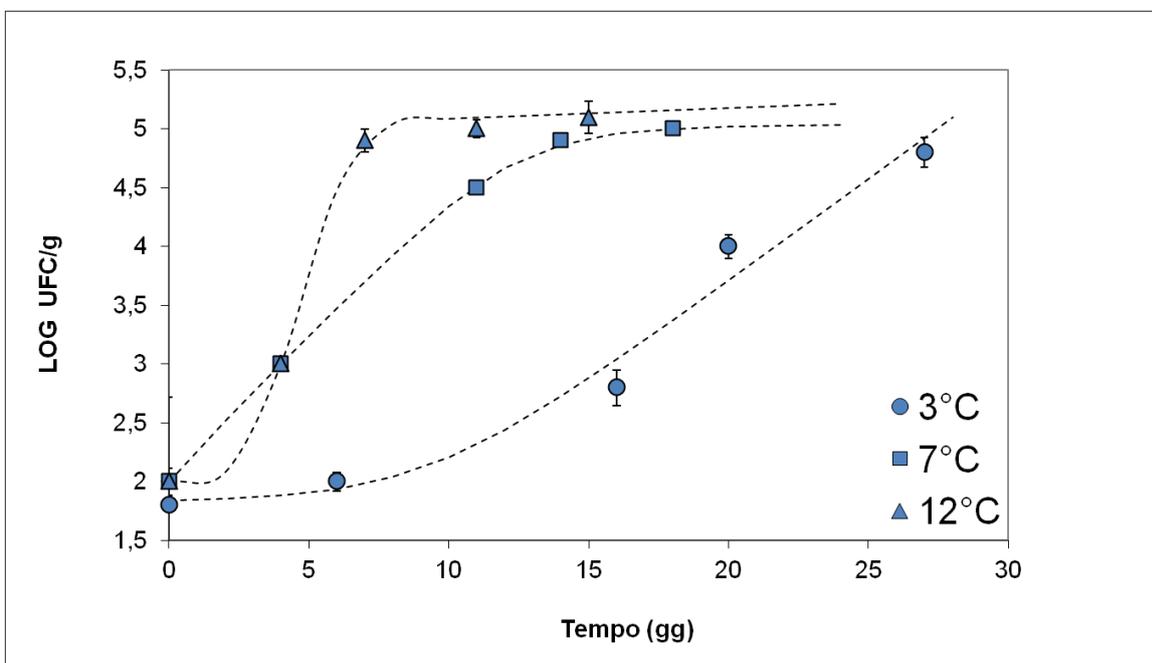
I campioni degli studi a 3, 7, 12°C venivano spediti al laboratorio esterno a fine *shelf-life* e veniva richiesto di ricercare *Pseudomonas spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, enterobatteri, muffe e lieviti.

Anche nelle analisi accreditate *Pseudomonas aeruginosa* non è stata rilevata nello stracchino.

L'assenza di questo microrganismo conferma la bontà delle attività svolte dall'azienda, la quale, a conoscenza delle problematiche dovute ad un'elevata carica di *Pseudomonas*, attua un piano di sanificazione tale da evitare una contaminazione del prodotto dopo la pastorizzazione.

I dati ottenuti, relativamente al parametro muffe e lieviti, sono stati modellati utilizzando un software di microbiologia predittiva "Microfit" che utilizza il modello primario di Baranyi and Roberts.

Fig.7 Curve di crescita di muffe e lieviti alle tre diverse temperature.



Nel grafico in **figura 7** sono riportati i risultati della modellazione confrontandoli con valori di crescita logaritmica della popolazione microbica in funzione del tempo di conservazione alle tre temperature utilizzate (3°C, 7°C e 12°C). L'andamento rilevato è quello tipico di una crescita microbica, con una fase di latenza, seguita da una fase lineare e quindi da una stazionaria (asintoto superiore); solo le curve di crescita dei campioni conservati a 3° C sono caratterizzati da una fase di latenza più lunga, non hanno raggiunto la fase stazionaria entro le 25 ore di sperimentazione.

Come si può notare come a 3°C la crescita è molto più lenta, difatti la fase di latenza dura quasi cinque giorni e a venti giorni di *shelf-life* non raggiungono ancora la fase stazionaria. Alla temperatura di 7°C invece crescono più velocemente ma la fase di latenza non è presente, questo probabilmente perché i microrganismi non necessitano di un periodo di adattamento nell'alimento. A 12°C la velocità di crescita microbica è ancora più veloce, e la fase stazionaria è raggiunta prima dei dieci giorni di *shelf-life*. Si possono notare delle differenze nelle curve di crescita, in particolare per la fase di latenza, perché le analisi sono state condotte su tre lotti diversi di stracchino.

In tabella 7 sono riportati i valori ottenuti dalla modellazione matematica dei dati sperimentali utilizzando il modello di Baranyi and Roberts. L'elevato valore di  $r^2$  compreso tra 0,96 e 0,99 fornisce un buon grado di accostamento tra i valori osservati e i corrispondenti valori stimati dal modello confermando quanto riportato in bibliografia dove questo modello è stato utilizzato con successo per descrivere la crescita dei lieviti in diverse matrici alimentari.

**Tab. 7 Parametri di crescita muffe e lieviti alle 3 diverse temperature dello studio** ( $\mu$  (log UFC/g h<sup>-1</sup>) tasso di crescita specifico; tlag (gg) tempo di latenza; t<sub>d</sub> (h) tempo di duplicazione; N<sub>0</sub> numero di cellule iniziali; N<sub>max</sub> numero di cellule finali).

Temperatura(°C)	$\mu$ (log UFC/g gg <sup>-1</sup> )	tlag (gg)	t <sub>d</sub> (h)	N <sub>0</sub> (log UFC/g)	N <sub>max</sub> (log UFC/g)
3	0,4	9,27	1,7	1,8 ± 0,20	11,64
7	0,55	-0,23	1,3	2,0 ± 0,12	5,04
12	1,9	2,84	0,4	2,0 ± 0,03	5,05

Considerando i valori della tabella 7, vediamo come alla temperatura di 12°C da un N<sub>0</sub> di 2,00 logUFC/g con tempo di duplicazione di 0,4 h e una velocità di crescita  $\mu$  (h<sup>-1</sup>) di 1,9 si raggiunge il numero massimo di cellule di 5,05 logUFC/g, a 7°C dallo stesso N<sub>0</sub> si ha un N<sub>max</sub> di 0,55 con un tempo di duplicazione di 1,3 h e un valore di  $\mu$  (h<sup>-1</sup>) uguale a 0,55.

Come si può vedere la velocità massima di accrescimento aumenta con la temperatura da 0,4 (log UFC/g h<sup>-1</sup>) a 1,9 (log UFC/g h<sup>-1</sup>). Anche il tempo di latenza è influenzato dalla temperatura di conservazione con una diminuzione significativa di 6-7 ore tra i campioni conservati a 3°C e 12°C. La fase di latenza alla temperatura di 7°C è risultata negativa.

Valori negativi indicano l'assenza di un tempo di adattamento per la crescita microbica in queste condizioni (Tyrer H. et al., 2004).

I valori relativi alla velocità massima di sviluppo ( $\mu$ ;  $\text{mm h}^{-1}$ ) ottenuti dal modello sono stati poi utilizzati per lo studio della variazione della crescita in funzione della temperatura utilizzando l'equazione di Arrhenius.

In **tabella 8** sono riportati i risultati ottenuti con per muffe e lieviti e enterobatteri nonché i valori statistici di  $r^2$  e R.

**Tab. 8 Parametri equazione di Arrhenius.**

Microrganismo	LnA (logUFC/g)d <sup>-1</sup>	Ea (kJ/mol)	r <sup>2</sup>	R (%)
Muffe e lieviti	49,05	112,60	0,92	93
Enterobatteri	21,22	53,27	0,98	99

Come si può vedere il coefficiente di correlazione  $r^2$  è compreso tra 0.92 e 0.98. Applicando l'equazione di Arrhenius si è proceduto quindi al calcolo dell'energia di attivazione ottenendo valori compresi tra 53 e 112 kJ/mol. Si nota che l'energia di attivazione (Ea) di muffe e lieviti è quasi il doppio di quella degli enterobatteri perciò la crescita di muffe e lieviti è maggiormente influenzata dall'aumento di temperatura. Infatti l'energia di attivazione è un parametro che descrive l'influenza della temperatura T sulla costante cinetica K, perciò essendo l'Ea di muffe e lieviti più elevata dell'Ea degli enterobatteri, la velocità della crescita di muffe e lieviti aumenta maggiormente all'aumentare della temperatura.

Questi valori quindi rivelano che la *shelf-life* dello stracchino dipende dalla crescita di muffe e lieviti che a sua volta dipende dalla temperatura di conservazione. Per questo motivo per lo studio della *shelf-life* del prodotto è stata utilizzato come parametro microbiologico le "muffe e lieviti" in abbinata ai risultati ottenuti dall'analisi sensoriale.

### 3.2 Analisi sensoriale

I risultati dell'analisi condotta a 3°C sono riportati nelle **tabella 9**.

**Tab.9 Valori medi analisi sensoriale a 3°C (n=6 ± DEV.ST).**

Tempo (gg)	Aspetto generale	Colore	Odore	Sapore	Consistenza
0	4,0 ± 0,00	4,0 ± 0,00	4,0 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
6	3,8 ± 0,41	3,8 ± 0,41	3,8 ± 0,41	3,8 ± 0,41	3,8 ± 0,41
16	3,3 ± 0,51	3,5 ± 0,54	3,5 ± 0,54	2,8 ± 0,41	2,6 ± 0,51
20	2,5 ± 0,54	3,1 ± 0,51	3,0 ± 0,00	2,5 ± 0,41	2,00 ± 0,89
27	1,5 ± 0,54	1,5 ± 0,54	1,3 ± 0,51	1,2 ± 0,41	0,5 ± 0,54

La **tabella 9** mostra come cambiano alcuni aspetti organolettici del prodotto mantenuto a 3°C durante la *shelf-life*. Fino al ventesimo giorno il prodotto risulta accettabile, ovvero i punteggi rimangono al di sopra al valore di 2 (=medio), poi i giudizi lo descrivono mediocre o scadente. Il panel ha evidenziato che al ventesimo giorno il sapore dello stracchino risultava amaro e la consistenza molle, mentre al ventisettesimo giorno il sapore risultava molto amaro e la consistenza molto molle e bavosa.

I risultati dell'analisi sensoriale condotta a 7°C sono riportati in **tabella 10**.

**Tab.10 Valori medi analisi sensoriale a 7°C (n=6 ± DEV.ST).**

Tempo (gg)	Aspetto generale	Colore	Odore	Sapore	Consistenza
0	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
4	3,8 ± 0,41	3,8 ± 0,41	3,8 ± 0,41	3,6 ± 0,51	3,8 ± 0,41
11	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	2,8 ± 0,41	2,8 ± 0,41	2,8 ± 0,41
14	2,8 ± 0,41	2,8 ± 0,41	2,6 ± 0,51	2,5 ± 0,83	2,2 ± 0,41
18	2,00 ± 0,63	1,8 ± 0,41	1,5 ± 0,83	1,3 ± 0,51	1,0 ± 0,00

Nel quattordicesimo giorno di *shelf-life* si poteva già constatare un cambiamento nella consistenza del prodotto e soprattutto, al diciottesimo giorno, lo stracchino presentava una consistenza molto molle.

In **tabella 11** sono riportati i risultati dell'analisi sensoriale condotta per lo stracchino mantenuto a 12°C.

**Tab. 11 Valori medi analisi sensoriale a 12°C (n=6 ± DEV.ST).**

Tempo (gg)	Aspetto generale	Colore	Odore	Sapore	Consistenza
0	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	3,8 ± 0,41	4,00 ± 0,00
4	3,3 ± 0,51	3,6 ± 0,51	3,8 ± 0,41	3,3 ± 0,51	3,5 ± 0,54
7	2,5 ± 0,83	3,00 ± 0,00	2,3 ± 0,41	2,6 ± 0,51	2,00 ± 0,89
11	2,3 ± 0,51	2,8 ± 0,41	2,2 ± 0,41	2,3 ± 0,41	2,00 ± 0,00
15	2,00 ± 0,89	1,8 ± 0,75	1,2 ± 0,41	1,00 ± 0,63	1,3 ± 0,51

Questo lotto di stracchino rispetto agli altri presentava un sapore troppo salato a causa di una salatura eccessiva durante la produzione: ciò ha leggermente influito il panel sul giudizio da dare alla caratteristica sapore. Per questo motivo a *shelf-life* zero il prodotto non risulta di sapore ottimo per tutti gli operatori.

Al quindicesimo giorno di *shelf-life* lo stracchino risulta mediocre in tutte le sue caratteristiche: visivamente il prodotto appare leggermente più giallognolo e si nota una consistenza molle quasi bavosa, il sapore è leggermente acido e tendente all'amaro e l'odore non è quello di latte ma di formaggio leggermente stagionato.

Inoltre, sempre al quindicesimo giorno, la confezione dell'alimento risultava leggermente gonfia e questo è dovuto a causa di gas prodotti dal metabolismo di microrganismi.

Ad ogni prelievo inoltre è stato misurato il **pH** del campione.

Il pH del prodotto mantenuto a 3°C non varia di molto, infatti da pH 5.3 scende a pH 5.2 e a livello sensoriale non è stata percepita l'acidità.

Anche nel lotto mantenuto a 7°C il pH varia ma non di molto, ovvero da 5.3 scende a 5.2 e nemmeno in questo caso i giudici non hanno percepito acidità nello stracchino.

Con l'alimento mantenuto a 12°C invece si è visto come il pH sia cambiato repentinamente, infatti da pH 5.10 al tempo zero è variato fino a pH 4.88 al quindicesimo giorno di *shelf-life*. A livello sensoriale i giudici hanno rilevato l'acidità nell'alimento soprattutto nei giorni di *shelf-life* undici e quindici.

I dati relativi al parametro sensoriale "aspetto generale" effettuate nei campioni durante il periodo di conservazione sono riportati nel grafico sottostante (**figura 8**) insieme alle rette di modellazione dei dati ottenuti applicando una cinetica di ordine 0. Come si può vedere tale parametro è influenzato dalla temperatura di conservazione dei campioni con variazioni durante il periodo di conservazione maggiori nei campioni conservati a 12 °C.

La tabella sottostante riporta i risultati di tale elaborazione:

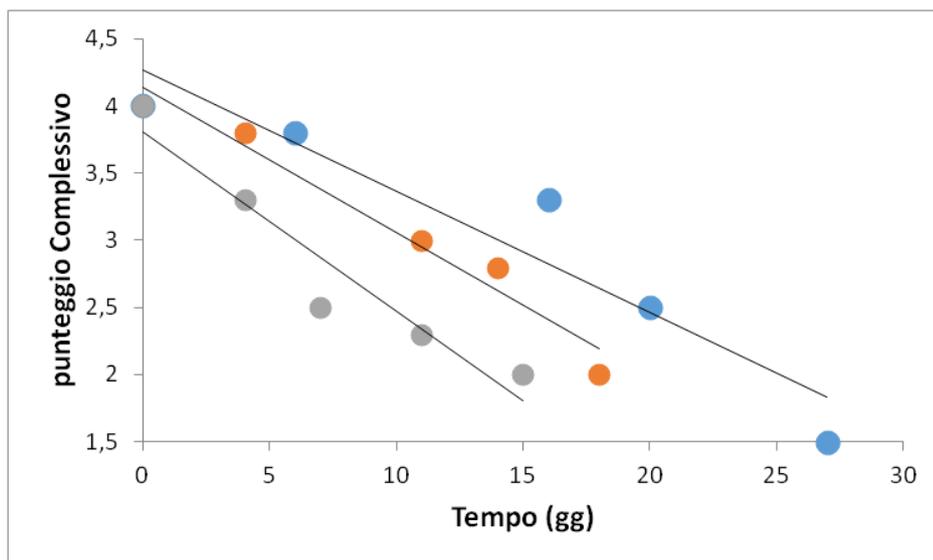
**Tab. 12 Dati statistici delle regressioni lineari del parametro sensoriale "aspetto generale" dei campioni conservati alle diverse temperature.**

Temperatura	r	R <sup>2</sup> (%)	p	Equazione della retta
3°C	0.94	90	<0.01	y=4.2645-0.090x
7°C	0.98	96	<0.05	y=4.1351-0.110x
12°C	0.96	92	<0.05	Y=3.8091-0.133x

Le tre k ottenute alle diverse temperature sono state messe in relazione con la temperatura di conservazione applicando l'equazione di Arrhenius.

La figura 8 riporta i risultati ottenuti, come si può vedere esiste una relazione lineare tra il logaritmo delle costanti di velocità della reazione e le temperature di conservazione secondo quanto stabilito dell'equazione di Arrhenius (r=0.99; R=99; p= <0.05).

Fig. 8 Parametro "Aspetto generale" alle tre temperature in funzione del tempo.



I risultati ottenuti mettono in evidenza come i parametri sensoriali considerati siano influenzati dalla temperatura di stoccaggio del prodotto. All'aumentare della temperatura infatti, il deperimento dei parametri organolettici risulta più veloce, inoltre la consistenza rappresenta uno dei parametri che cambia più velocemente. In accordo con i giudici, il punteggio limite, sotto al quale l'alimento non risulta più accettabile, è stato determinato ad un punteggio pari a 2,5.

I parametri organolettici che vengono maggiormente considerati per lo studio sono il sapore e la consistenza perché, all'aumentare della temperatura, cambiano più visibilmente.

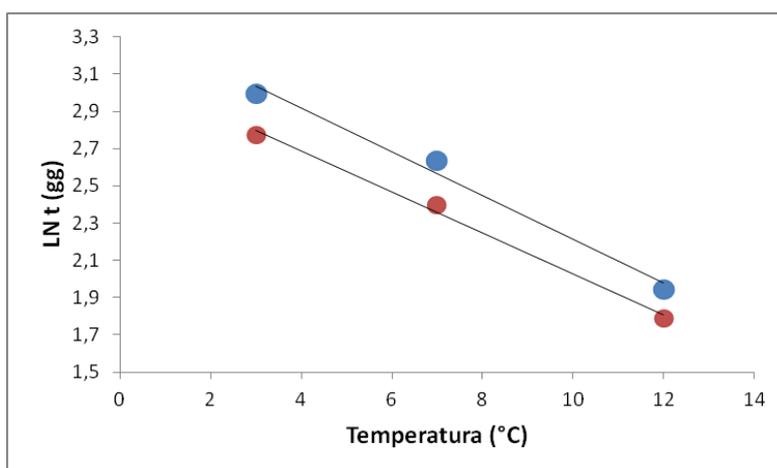
La modellazione dei risultati

Fig.9 Andamento aspetto generale e consistenza al variare della temperatura.

dell'analisi sensoriale ha permesso di elaborare il grafico "shelf-life plot" che mette in relazione l'andamento del sapore e della consistenza al variare della temperatura (figura 9).

Si sottolinea comunque che il parametro "aspetto generale"

mostra lo stesso andamento dei parametri considerati.



I punti blu riguardano l'andamento sapore dello stracchino mentre quelli rossi l'andamento della consistenza.

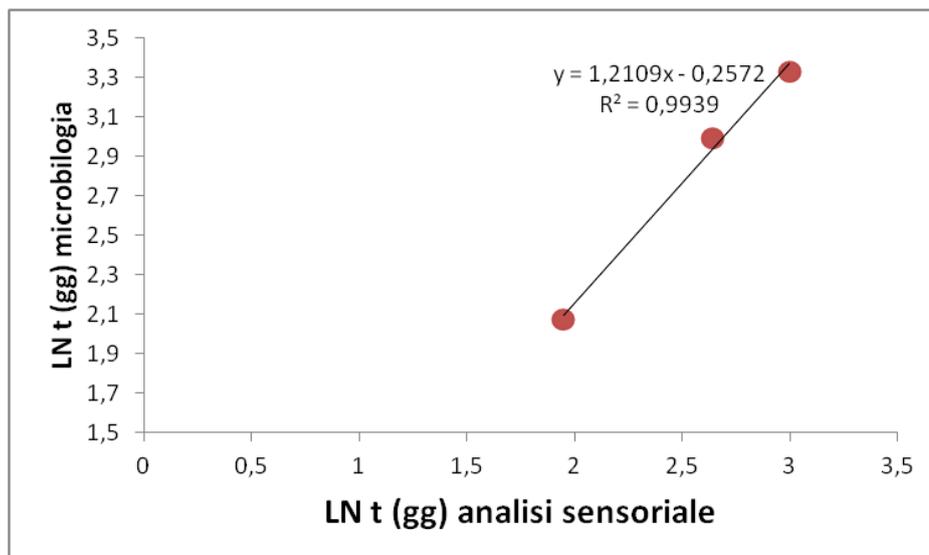
Come si può vedere la correlazione tra la temperatura e la *shelf-life* risulta in entrambi i casi statisticamente significativa con un indice di correlazione pari a 0,98 per il parametro "aspetto generale" e pari a 0,99 per il parametro "consistenza". Quindi il grafico ottenuto consente di calcolare la *shelf-life* del prodotto a qualsiasi altra temperatura compresa nell'intervallo oggetto di studio (3÷12°C).

Il valore di  $Q_{10}$  ottenuto dal coefficiente angolare della retta è compreso tra 2.9 e 3.2 con una energia di attivazione compresa tra 16.8 e 18 kcal/mol.

Il valore di energia di attivazione ottenuto è in accordo con quanto riportato da Hough et al., (2006). Questi autori in uno studio di *shelf-life* a diverse temperature su carne macinata refrigerata, per il parametro sensoriale "accettazione" hanno ottenuto un valore di energia di attivazione pari a 16 Kcal/mol.

I dati microbiologici e quelli sensoriali, una volta elaborati, sono stati messi in relazione con grafico che riporta nell'asse delle ascisse il logaritmo naturale dei giorni di analisi sensoriale, e nell'asse delle ordinate il logaritmo naturale dei giorni (figura 10).

Fig.10 Correlazione risultati microbiologia e analisi sensoriale



Il grafico nella figura 10 mostra come i risultati microbiologici sono correlati ai risultati dell'analisi sensoriale con un indice di correlazione pari a 0,99, quindi per calcolare la *shelf-*

*life* del prodotto è possibile fare riferimento solo alla microbiologia del prodotto o solo all'analisi sensoriale.

Si può quindi confermare la *shelf-life* di venti giorni a 3°C che l'azienda ha posto per lo stracchino facendo riferimento alla bibliografia e ai dati storici.

Con i dati ottenuti è quindi possibile calcolare non solo la *shelf-life* dello stracchino mantenuto a temperatura costante, ma anche la *shelf-life* considerando la storia termica del prodotto. Si può ad esempio calcolarla tenendo conto di tutte le variazioni termiche che subisce il prodotto dallo stoccaggio in azienda fino al consumo.

Si assume che il prodotto stia tre giorni a 3°C stoccato in azienda, che stia nove giorni a 6°C nel punto vendita, che venga poi trasportato dal consumatore per qualche ora a temperatura ambiente (22°C) e che stia stoccato nel frigo del consumatore a 10°C (**figura 11**).

Con l'equazione di Arrhenius è possibile calcolare l'effettivo giorno di *shelf-life* dello stracchino che risulta essere di 16 giorni, ovvero quattro giorni in meno della *shelf-life* del prodotto se fosse conservato a 0÷4°C.

**Fig. 11 Fasi tempo-temperatura stracchino.**

gg	T (°C)	Tempo (gg)	$\theta$	1/ $\theta$	$f_c=t/\theta$	$\Sigma f_c=\Sigma t/\theta$
1	3	0	20,8	0,048	0	0,00
2	3	1	20,8	0,048	0,048	0,05
3	3	1	20,8	0,048	0,048	0,10
4	6	1	14,6	0,068	0,068	0,16
5	6	1	14,6	0,068	0,068	0,23
6	6	1	14,6	0,068	0,068	0,30
7	6	1	14,6	0,068	0,068	0,37
8	6	1	14,6	0,068	0,068	0,44
9	6	1	14,6	0,068	0,068	0,51
10	6	1	14,6	0,068	0,068	0,58
11	6	1	14,6	0,068	0,068	0,64
12	6	1	14,6	0,068	0,068	0,71
13	22	0,08333333	2,2	0,455	0,038	0,75
14	10	1	9,1	0,11	0,11	0,86
15	10	1	9,1	0,11	0,11	0,97
16	10	1	9,1	0,11	0,11	1,08
17	10	1	9,1	0,11	0,11	1,19
18	6	1	9,1	0,11	0,11	1,25
19	6	1	9,1	0,11	0,11	1,31
20	6	1	9,1	0,11	0,11	1,36

## 4. CONCLUSIONI

Il lavoro descritto in questa tesi aveva l'obiettivo di valutare la *shelf-life* di un prodotto lattiero caseario altamente deperibile come lo stracchino. A tale scopo tre partite di stracchino industriale sono state conservate a tre diverse temperature valutando le variazioni microbiologiche e sensoriali durante lo stoccaggio. I dati ottenuti sono stati elaborati con lo scopo di valutare l'impatto delle diverse fasi di conservazione durante la distribuzione del prodotto, sulla *shelf-life* del prodotto stesso.

I dati ottenuti hanno messo in evidenza alcuni risultati interessanti che ci portano a trarre le seguenti conclusioni:

a) La conta dei lieviti rappresenta il parametro microbiologico più interessato ai cambiamenti durante la *shelf-life* del prodotto con una variazione che a 7°C è pari a circa 3 log;

b) L'analisi sensoriale rappresenta un parametro importante per la determinazione della *shelf-life*. Sapore e consistenza sono i parametri che, tra quelli considerati, rappresentano gli aspetti chiave per il giudizio di accettabilità da parte del consumatore, anche se l'andamento durante la *shelf-life* per entrambi i parametri è simile; infatti l'aspetto generale riflette i risultati ottenuti nei singoli parametri;

c) I parametri microbiologici e sensoriali sono risultati nella nostra sperimentazione correlati fra loro. Questo significa che l'azienda potrà utilizzare uno dei due parametri per eventuali altri studi *shelf-life*;

d) La *shelf-life* ottenuta (20 giorni a 3°C) conferma la data di scadenza fissata dall'azienda utilizzando i dati storici in suo possesso;

e) La valutazione dell'impatto della catena di distribuzione sulla *shelf-life* del prodotto ha messo in evidenza che gli innalzamenti termici a cui prevedibilmente il prodotto può essere sottoposto determinano una riduzione della *shelf-life* complessiva dello stracchino. Utilizzando i dati ottenuti sperimentalmente questa diminuzione è stata pari a 4 giorni.

Pur non consentendo di trarre delle conclusioni definitive il lavoro ha messo in evidenza la necessità di considerare la catena di distribuzione nella valutazione della *shelf-life* di un prodotto refrigerato come lo stracchino. I 4 giorni di differenza tra il calcolo a temperatura costante e il calcolo a temperatura variabile rappresentano un indicatore dell'importanza

della temperatura quando si effettuano degli studi di *shelf-life*. In tale differenza comunque l'azienda dovrebbe anche valutare la possibilità che tutti i consumatori utilizzino il prodotto dopo il sedicesimo giorno.

Si sottolinea comunque che i parametri utilizzati per la determinazione di questa *shelf-life* sono parametri qualitativi e non di sicurezza igienico-sanitaria del prodotto, comunque garantita fino al ventesimo giorno di *shelf-life*.

## 5. Bibliografia

- Evans J. A., Stanton J. I., Russell S. L. & James S. J. (1991). "Consumer handling of chilled foods: A survey of time and temperature conditions". MAFF Publications, London PB 0682.
- Flynn O. M.J., Blair I., McDowell D., (1992). "The efficiency and consumer operation of domestic refrigerators". *International Journal of Refrigeration*, 15, 307-312.
- Giaccone V., (2010). "Pseudomonas e prodotti lattiero-caseari". *Medicina Veterinaria Preventiva*, 32 supplemento.
- Hough, C., Garrita, L., Gomez, G.. (2006). "Sensory shelf-life predictions by survival analysis accelerated storage models". *Food Quality and Preference*, 17, 468-473.
- James S., Evans J., (1992). "Consumer handling of chilled foods: temperature performance". *Rev. Int. Froid*. 15, 299-306.
- Jevsnik, M., Hlebec, V., Raspor, P. (2008). "Consumers' awareness of food safety from shopping to eating". *Food Control*, 19, 737-745.
- Kennedy, J., Jackson, V., Blair, I., McDowell, I.S., Cowan, D.A., Bolton, D.J.. (2005). "Food safety knowledge of consumers and the microbiological and temperature status of their refrigerators". *Journal of Food Protection*, 68, 1421-1430.
- Laguerre O., Derens E., Palagos B., (2002). "Study of domestic refrigerator temperature and analysis of factors affecting temperature: a French survey". *International Journal of Refrigeration*, 22, 653-659.
- Ministero della Salute DGSAN 0033185-P (19/11/2009) "Shelf-life di prodotti alimentari-controlli ufficiali".
- Nauta M.J., Litman S., Barker G.C., Carlin F., (2003). "A retail and consumer phase model for exposure assessment of *Bacillus cereus*". *International Journal of Food Microbiology*, 83, 205-218.
- Ovca, A., Jevsnik, J. (2009). "Maintaining a cold chain from purchase to the home and at home: Consumer opinions". *Food Control*, 20, 167-172.
- Prencipe V., Migliorati G., Matteucci O., Calistri P., Di Giannatale E.. (2010). "Valutazione della qualità igienico sanitaria di alcuni tipi di formaggi prelevati in fase di vendita al dettaglio". *Veterinaria italiana*, 46 (2), 221-231.
- Regolamento (CE) n. 1169/2011 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 25 ottobre 2011 relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori.

Regolamento (CE) n. 2073/2005, DELLA COMMISSIONE del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.

Ross T. and McMeekin T. A. (2003). "Modeling Microbial Growth Within Food Safety Risk Assessment". *Risk Analysis*. 23, 179-197.

Rovere, P., Brutti, A., Franceschini, B., Trasatti, L., Pittia, P.(2009). " Applicazione del modello cinetico "Mean Kinetic Temperature" (MKT) alla valutazione della temperatura nella catena del freddo." *Industria Conserve*. 84, 153-165.

Sarais I., Piuksi D., Aquili V., Stecchini M. L.(1995). "The Behaviour of Yeast Population in Stracchino Cheese Packaged under Various Conditions". *Journal of Food Protection*, Vol. 59, No.5, 541-544.

Steele, R. (2004). "Understanding and measuring the shelf-life of food." *CRC Press Cambridge Uk*.

Tyrer H., Ainsworth P., İbanođlub S., Bozkurtb H.. (2004). "Modelling the growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Candida sake* in ready-to-eat meals". *Journal of Food Engineering*. 65, 137-143.

UNI EN ISO 21528-2:2004. Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae -- Part 2: Colony-count technique.

UNI EN ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examination.

UNI EN ISO 8261:2001. Milk and milk products -- General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination.

UNI EN ISO/TS 11059:2009. Milk and milk products – Method for the enumeration of *Pseudomonas spp.*

## 6. RINGRAZIAMENTI

*Desidero ringraziare il Professor Stefano Zardetto per avere accettato l'incarico di relatore per la mia tesi e per il tempo dedicatomi.*

*Inoltre vorrei ringraziare l'azienda Frescolat s.r.l per l'occasione offerta, ed in particolare Giorgio e Stefano Conte per il tempo dedicatomi e la disponibilità dimostrata durante il periodo che ho trascorso presso il laboratorio aziendale.*

*Ringrazio sentitamente i miei compagni di corso, per aver condiviso con me questo percorso universitario e per essermi stati vicini nei momenti di difficoltà.*

*Un grazie particolare a Luca per il sostegno dimostratomi e per aver sempre creduto in me in tutti questi anni di università.*

*Infine, un grazie affettuoso a mio fratello e ai miei genitori, poiché senza il loro aiuto e supporto non avrei potuto affrontare questo percorso di studi.*