

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN  
SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI**

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
CAMPUS DI CESENA  
SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA  
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN  
SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

TITOLO DELLA TESI

***UTILIZZO DI ANTIMICROBICI NATURALI PER IL  
MIGLIORAMENTO DELLA SHELF-LIFE DI PRODOTTI DI  
IV GAMMA A BASE MELA***

Tesi in

Microbiologia avanzata e predittiva (C.I)

Relatore

Prof.ssa Rosalba Lanciotti

Correlatori:

Dott.ssa Francesca Patrignani  
Dott. Lorenzo Siroli

Presentata da

Gian Marco Spada

Sessione II

Anno Accademico 2012/2013



*“Tutta la vita umana non è se non una commedia,  
in cui ognuno recita con una maschera diversa,  
e continua nella parte,  
finché il gran direttore di scena  
gli fa lasciare il palcoscenico.”*

*Erasmus da Rotterdam*

*“Fa’ in modo che invece che compassione, ti portino rispetto”*

*Madre Teresa di Calcutta*



## **INDICE**

<b>1. I PRODOTTI DI IV GAMMA</b>	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Introduzione</i></b>	<b>1</b>
<b>1.2 <i>Caratteristiche dei prodotti di IV gamma</i></b>	<b>2</b>
<b>1.3 <i>Il processo produttivo: potenziale impatto sulla qualità</i></b>	<b>4</b>
1.3.1 <i>Scelta della materia prima</i>	5
1.3.2 <i>Stoccaggio</i>	5
1.3.3 <i>Cernita e mondatura</i>	5
1.3.4 <i>Pelatura e denocciolatura</i>	6
1.3.5 <i>Lavaggio</i>	6
1.3.6 <i>Asciugatura</i>	11
1.3.7 <i>Taglio</i>	11
1.3.8 <i>Confezionamento</i>	13
1.3.9 <i>Distribuzione e commercializzazione</i>	14
<b>2. LA MICROFLORA DEI PRODOTTI DI IV GAMMA</b>	<b>17</b>
<b>2.1 <i>Introduzione</i></b>	<b>17</b>
<b>2.2 <i>Aspetti igienico-sanitari</i></b>	<b>18</b>
<b>2.3 <i>Principali patogeni associati alla materia prima</i></b>	<b>19</b>
2.3.1 <i>I coliformi</i>	20
2.3.2 <i>Gli sporigeni</i>	21
2.3.3 <i>I patogeni</i>	22
<b>3. CONSERVAZIONE DEI PRODOTTI DI IV GAMMA</b>	<b>29</b>
<b>3.1 <i>Introduzione</i></b>	<b>29</b>
<b>3.2 <i>Conservanti chimici e naturali</i></b>	<b>30</b>
<b>3.3 <i>Imballaggi funzionali</i></b>	<b>31</b>

3.4	<i>Confezionamento in atmosfera modificata di frutta e vegetali</i>	34
3.5	<i>Hurdle-technology per la conservazione alimentare</i>	35
4.	<b>OLI ESSENZIALI</b>	39
4.1	<i>Introduzione</i>	39
4.2	<i>Caratteristiche chimico-fisiche degli oli essenziali</i>	40
4.3	<i>Meccanismo di formazione dei composti volatili</i>	42
4.4	<i>Composizione chimica degli oli essenziali</i>	43
4.5	<i>Attività antibatterica degli oli essenziali</i>	45
5.	<b>OBIETTIVI</b>	51
6.	<b>MATERIALI E METODI</b>	57
6.1	<i>Oli essenziali e molecole antimicrobiche impiegate</i>	58
6.2	<i>Determinazione della concentrazione minima inibente (MIC) e della concentrazione minima battericida (MBC) dell'olio essenziale di cedro e dei composti antimicrobici naturali</i>	58
6.3	<i>Caratterizzazione gas-cromatografica dell'olio di cedro</i>	59
6.4	<i>Preparazione dei prodotti di IV gamma a base mela in atmosfera ordinaria</i>	60
6.5	<i>Analisi microbiologiche</i>	63
6.6	<i>Analisi del colore</i>	63
6.7	<i>Analisi della texture</i>	64
6.8	<i>Analisi dello spazio di testa dei prodotti a base mela confezionati in atmosfera ordinaria mediante GC/MS-SPME</i>	65
6.9	<i>Analisi mediante naso elettronico</i>	65
6.10	<i>Ottimizzazione del processo produttivo</i>	68

6.11	<i>Determinazione della CO<sub>2</sub> nello spazio di testa</i>	69
6.12	<i>Analisi statistica</i>	69
7.	<b>RISULTATI</b>	71
7.1	<i>Caratterizzazione dell'olio essenziale di cedro mediante gas-cromatografia abbinata alla tecnica SPME (Solid Phase Micro Extraction)</i>	73
7.2	<i>Valutazione della concentrazione minima inibente (MIC) e della concentrazione minima battericida (MBC) delle molecole antimicrobiche testate</i>	75
7.3	<i>Effetto dell'olio essenziale di cedro e delle sostanze antimicrobiche saggate sulla shelf-life di prodotti di IV gamma a base mela</i>	80
7.4	<i>Evoluzione della CO<sub>2</sub> nello spazio di testa durante la conservazione</i>	84
7.5	<i>Effetto dell'olio essenziale di cedro e delle sostanze antimicrobiche saggate sul colore dei prodotti di IV gamma a base mela</i>	85
7.6	<i>Effetto dell'olio essenziale di cedro e delle sostanze antimicrobiche saggate sulla texture dei prodotti di IV gamma a base mela</i>	89
7.7	<i>Effetto dell'olio essenziale di cedro e degli antimicrobici naturali testati sul profilo in molecole volatili rilevati mediante GC/SPME e naso elettronico</i>	90
7.8	<i>Ottimizzazione del processo produttivo dei prodotti di quarta gamma</i>	96
7.9	<i>Evoluzione dei lieviti e batteri lattici autoctoni nei prodotti di IV gamma a base mela conservati in atmosfera modificata</i>	97

7.10	<i>Effetto dell'olio essenziale di cedro e delle sostanze antimicrobiche saggate sul colore dei prodotti di IV gamma a base mela conservati in atmosfera modificata</i>	98
8.	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>105</b>
9.	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>109</b>
	<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>124</b>



# 1. I PRODOTTI DI IV GAMMA

## 1.1 Introduzione

Il settore ortofrutticolo, in Italia ed in Europa, ha conosciuto negli ultimi anni una fase di graduale trasformazione riguardante l'intera filiera produttiva.

Da un punto di vista commerciale i prodotti orticoli, possono essere così classificati:

- I gamma: Ortaggi sfusi
- II gamma: Ortaggi in barattolo, conserve
- III gamma: Ortaggi surgelati e congelati
- IV gamma: Ortaggi preparati, freschi e confezionati
- V gamma: Ortaggi precotti, grigliati o scottati al vapore senza conservanti o condimenti.

I prodotti di IV gamma rappresentano, attualmente, uno dei più promettenti ed innovativi comparti del settore ortofrutticolo, mostrando un tasso di crescita medio annuo, dal 2001 ad oggi, del 18,6% ed una quota di mercato pari all'8% rispetto al totale del comparto ortofrutticolo (Mioni, 2005).

I prodotti di quarta gamma sono definiti, secondo le norme della Comunità Europea, prodotti minimamente trasformati, cioè soggetti a interventi tecnologici ridotti, utilizzabili per il consumo diretto senza ulteriori manipolazioni, o con manipolazioni minime. Sono utilizzabili al 100% e vengono confezionati per offrire ai consumatori alta convenienza, alto valore nutrizionale ed organolettico (Corbo *et al.*, 2010).

Tuttavia, tali prodotti sono spesso caratterizzati da una vita commerciale piuttosto breve. Infatti, le operazioni preliminari a cui le materie prime vengono sottoposte provocano alcuni danni meccanici e fisiologici responsabili dell'induzione e/o accelerazione di reazioni chimiche ed enzimatiche. In seguito a tali reazioni, si manifestano nei prodotti fenomeni indesiderati, quali perdita di consistenza dei tessuti, imbrunimento enzimatico, attacco microbico favorito dalla percolazione dei liquidi cellulari e processi di ossidazione causati dalla presenza di ossigeno.

Negli ultimi due decenni, i tecnologi e i microbiologi alimentari hanno tentato di sviluppare nuove tecnologie per migliorare la qualità e la gamma di questi prodotti, , nel rispetto delle aspettative dei consumatori che, nel contempo, sono diventati sempre più critici nei confronti degli additivi impiegati per preservare la sicurezza alimentare o migliorare le caratteristiche quali il colore e il sapore (Corbo *et al.*, 2009).

## ***1.2 Caratteristiche dei prodotti di IV gamma***

Come precedentemente accennato, questi prodotti presentano caratteristiche paragonabili a quelle del prodotto fresco: elevato valore nutrizionale, con caratteristiche organolettiche spesso esaltate e di conseguenza una gradita immagine di freschezza e genuinità. Prerogativa essenziale di questi frutti e ortaggi trasformati, è quella di evitare all'utilizzatore le operazioni di lavaggio, mondatura e taglio, offrendo così un elevato contenuto di servizio e praticità d'uso. I vegetali di IV gamma si distinguono però dai prodotti freschi per diversi aspetti:

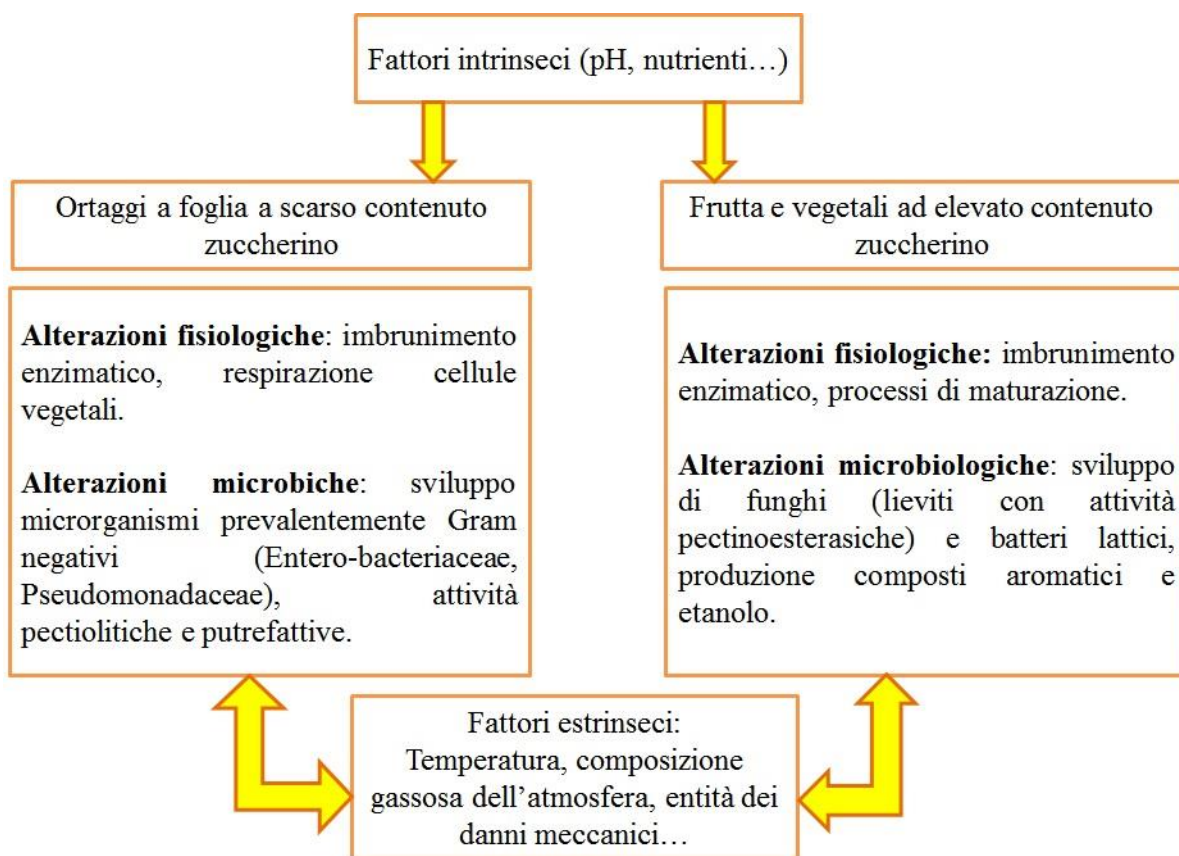
1. devono essere costantemente conservati a basse temperature (0;-4° C);
2. sono stoccati in contenitori dotati di specifiche caratteristiche negli scambi gassosi;
3. presentano una *shelf-life* tra i 7 e i 20 giorni;
4. presentano caratteristiche microbiologiche definite per legge.

La *shelf-life* è garantita dalla combinazione di più fattori di stabilità. Il controllo dei fenomeni indesiderati di deterioramento della qualità dei prodotti di IV gamma, che determinano la fine della vita del prodotto, è ottenuto mediante combinazione di due o più interventi tecnologici, realizzati in modo non drastico (*mild*), per non causare al prodotto danni provocati da processi tecnologici troppo spinti. Tra le tecniche tradizionalmente utilizzate si ricordano i trattamenti di immersione (*dipping*) in soluzioni di sostanze ad azione anti-imbrunimento o protettive, l'utilizzo di atmosfere modificate e la refrigerazione in fase di stoccaggio. Questi fattori sono in grado di

apportare degli “hurdles” sia allo sviluppo microbico, sia all’attività degli enzimi responsabili dell’imbrunimento dei tessuti vegetali (Roccoli *et al.*, 2003).

Per questi prodotti, è imperativo mantenere sempre la catena del freddo. Studi effettuati in Francia hanno, dimostrato che le diverse fasi di preparazione degli ortaggi causano un aumento della respirazione e dunque del metabolismo, che comporta un più alto consumo d’ossigeno. In tali condizioni il rispetto della catena del freddo è fondamentale per garantire la *shelf-life* del prodotto, dalla raccolta, lavorazione, trasporto e commercializzazione (Lunati, 1994).

Le principali alterazioni che possono subire i prodotti di IV gamma sono riportati in figura 1.1:

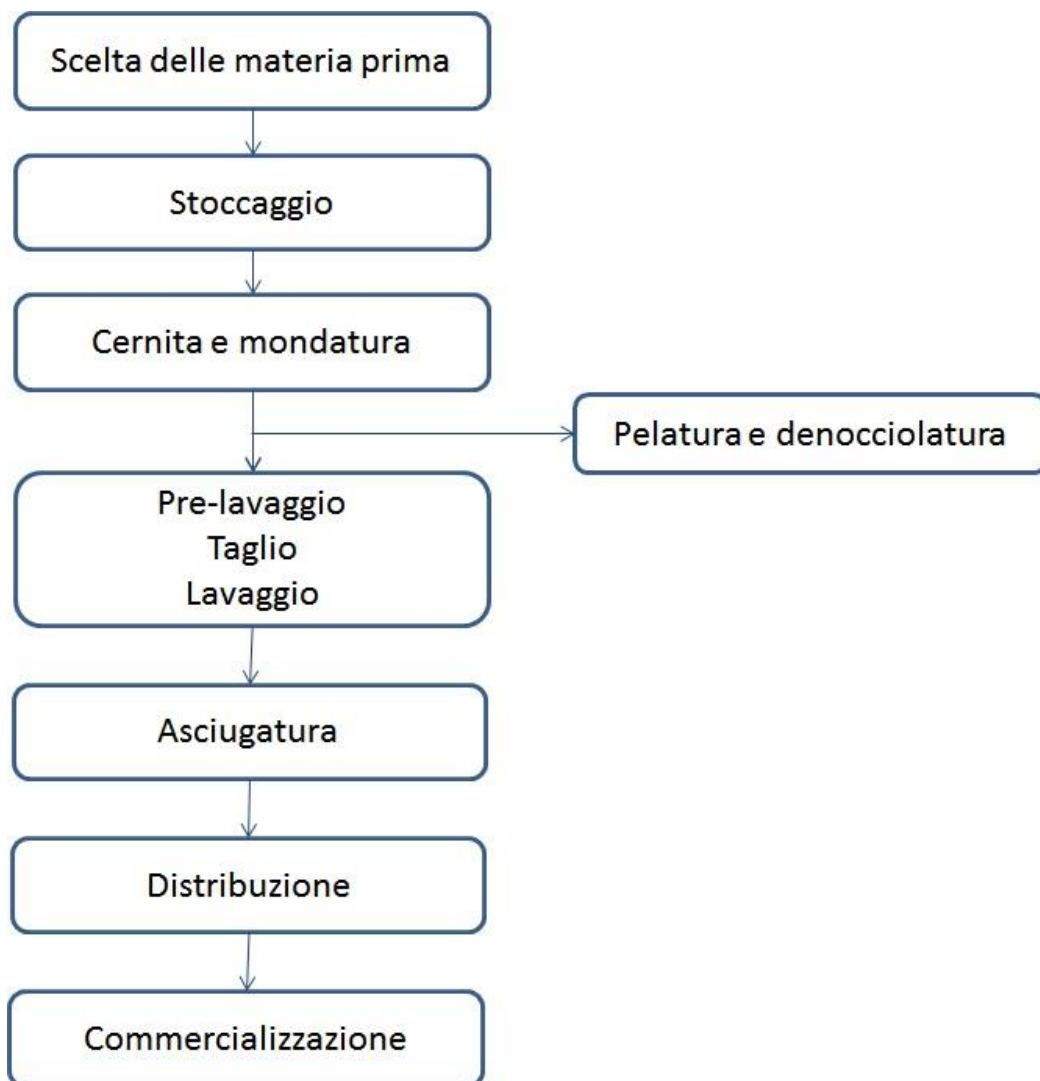


**Figura 1.1** - Principali alterazioni dei prodotti di IV gamma.

### ***1.3 Il processo produttivo: potenziale impatto sulla qualità***

E' ben noto che i trattamenti subiti da frutta e vegetali favoriscono un più rapido deterioramento fisiologico, cambiamenti biochimici e degradazione microbica che, a loro volta, possono determinare un deterioramento del colore, della consistenza e del sapore, anche quando le operazioni di trasformazione sono blande.

Prima di essere confezionati per il consumo, i prodotti di IV gamma sono sottoposti ad una o più operazioni unitarie, come riportato in figura 1.2, che comprendono il lavaggio/sanificazione, pelatura, taglio e/o affettatura, triturazione, ecc. Tutti questi step potrebbero avere un effetto sui nutrienti e sulla qualità del prodotto preparato.



**Figura 1.2** - Flow-sheet di produzione dei vegetali di IV gamma.

### *1.3.1 Scelta della materia prima*

La scelta della materia prima prevede che i vegetali rispondano a specifici requisiti, in termini di consistenza; residuo secco; grado rifrattometrico; acidità; zucchero; colore e sapore. In particolare, lo stadio di maturazione del vegetale influenza le caratteristiche sensoriali del prodotto finito. Vegetali in avanzato stadio di maturazione sono più sensibili ai danni da taglio e pertanto non idonei alla trasformazione.

La materia prima rappresenta la prima e più importante fonte di contaminazione dei vegetali trasformati. I microrganismi possono derivare dal suolo, dalle acque di irrigazione, dalle acque di lavaggio, dai concimi biologici eventualmente impiegati, e dagli operatori. Svariati sono i microrganismi patogeni isolati dai vegetali freschi (*Salmonella* ssp, *Shigella* ssp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*). Dati epidemiologici disponibili mostrano che le malattie associate al consumo di vegetali e frutta sono prevalentemente malattie a trasmissione oro-fecale (Beuchat, 2002).

### *1.3.2 Stoccaggio*

La materia prima, pervenuta nel luogo di trasformazione (preferibilmente entro 2 ore dalla raccolta), deve essere mantenuta in celle di refrigerazione (0 – 4° C), per un tempo massimo di 4 giorni, al fine di prevenirne il deterioramento.

### *1.3.3 Cernita e mondatura*

La cernita/mondatura consiste nell'allontanamento manuale delle porzioni più esterne o deteriorate del prodotto. Deve essere eseguita nel più breve tempo possibile, per evitare che porzioni danneggiate del vegetale rimangano per lungo tempo a contatto con la matrice da trasformare, compromettendone la qualità.

#### *1.3.4 Pelatura e denocciolatura*

Consente la rimozione delle parti non edibili del vegetale ed è prevista nel caso della frutta e di alcuni vegetali. La palatura è condotta con diverse tecniche: meccaniche, chimiche (con acido citrico) e fisiche (mediante l'applicazione di vapore ad alta pressione). Particolare attenzione è necessaria per le operazioni meccaniche che determinano la rottura di molte cellule e la liberazione dei liquidi intracellulari e, al tempo stesso, la superficie dei prodotti risulta maggiormente esposta all'aria e alle possibili contaminazioni di batteri, lieviti e muffe (Corbo *et al.*, 2010). Il danno operato da questi trattamenti meccanici è fortemente influenzato dallo stato di maturità del frutto: studi effettuati su questo fenomeno dimostrano che più un prodotto è maturo e più è suscettibile (Gorny *et al.*, 2000). La pelatura manuale, tuttavia, eseguita mediante l'impiego di coltelli affilati, resta il metodo ideale soprattutto per il mantenimento delle caratteristiche sensoriali del prodotto.

La denocciolatura è fondamentale per esempio nel caso delle mele, e deve essere eseguita molto delicatamente in quanto i tessuti prossimi al nocciolo sono più suscettibili all'imbrunimento, rispetto alle altre parti del frutto.

L'operazione di pelatura e denocciolatura provoca una condizione di stress sui tessuti vegetali che rispondono con un aumento del tasso respiratorio e con la produzione di etilene.

#### *1.3.5 Lavaggio*

Con il termine lavaggio si intende una serie di procedure, quali il prelavaggio dei vegetali interi, il lavaggio dei vegetali tagliati ed il risciacquo.

Il prelavaggio, generalmente effettuato con acqua corrente, è realizzato per la preliminare pulizia dei vegetali freschi e ha lo scopo di allontanare i residui di pesticidi, di rimuovere terriccio e detriti, di ridurre, per effetto meccanico e dilavante dell'acqua, la carica microbica nonché di abbassare la temperatura del prodotto.

Il lavaggio dei vegetali tagliati, invece, ha lo scopo di allontanare i fluidi cellulari che contengono enzimi e composti fenolici, rilasciati durante il taglio, entrambi

responsabili dell'imbrunimento, e le sostanze nutritive che favoriscono la crescita dei microrganismi. In questo caso il lavaggio viene comunemente effettuato per immersione in soluzioni acquose fredde (circa 10° C) di ipoclorito, contenenti 50-200ppm di cloro libero. I tempi di immersione, a livello industriale, sono inferiori a 5 minuti (Abadias *et al.*, 2011)

L'effetto del lavaggio con cloro comporta una riduzione della carica batterica mesofila non più alta di tre unità logaritmiche e non assicura la rimozione dei patogeni; questo si ritiene sia dovuto alla capacità dei batteri di aderire e/o infiltrarsi nei tessuti vegetali all'interno dei quali formano nicchie microbiche difficilmente raggiungibili dai principi attivi sanitizzanti impiegati. L'infiltrazione dei patogeni nel tessuto vegetale dipende dalla differenza di temperatura tra il vegetale e l'acqua e avviene quando la pressione dell'acqua, sulla superficie del prodotto, supera la pressione e la natura idrofobica della superficie del vegetale. Il fenomeno risulta favorito dalla presenza di detergenti che provocano la riduzione della tensione superficiale dell'acqua a contatto con le cellule ferite o con i pori dei tessuti (Cocolin e Comi, 2007).

Le attuali tecnologie di lavaggio non sono in grado di garantire la sicurezza microbiologica dei prodotti di IV gamma senza compromettere la caratteristica principale di "prodotto fresco minimamente processato". Sebbene il lavaggio sia indicato come l'unico momento del processo produttivo in grado di ridurre la popolazione microbica presente, se mal condotto, può essere causa di ingenti danni. I frequenti aumenti della carica mesofila aerobica totale, successivi al lavaggio, sono spesso da attribuire alle condizioni microbiologiche non idonee dell'acqua impiegata, soprattutto, quando questa viene sottoposta a riciclaggio.

Il risciacquo è generalmente effettuato in acqua corrente alla temperatura di 4° C per almeno 2 minuti e anche in questo caso la qualità dell'acqua impiegata deve essere attentamente valutata per evitare contaminazioni pericolose.

Recentemente, i problemi relativi alla sicurezza igienica dei prodotti di IV gamma sono stati verificati da Gil *et al.* (2009). La maggior parte della letteratura disponibile su questo argomento indica che il lavaggio con o senza disinfettanti, è in grado di ridurre la naturale popolazione microbica da 2 a 3 cicli logaritmici (Allende *et al.*, 2008, Gómez-López *et al.*, 2007). È stato infatti osservato che, nonostante le

differenze iniziali, le cariche batteriche totali durante la conservazione erano simili in prodotti lavati con acqua corrente o contenente soluzione igienizzante.

Recentemente la sicurezza dell'impiego di acqua clorata è stata messa in discussione, soprattutto in relazione alla formazione di sottoprodotti tossici per l'uomo. Queste considerazioni hanno portato negli ultimi anni alla valutazione di possibili alternative, riportate nella tabella tratta da FDA/CFSAN e descritte in letteratura da Abadias *et al.*, (2011).

<b><i>Ipoclorito (NaClO)</i></b>	
Vantaggi	- Usato da tempo.
Limiti	- Potenziali effetti negativi sulla salute dell'uomo dei suoi sottoprodotti clorinati. - Corrosivo per gli impianti. - Sensibile alle temperature, alla luce, all'aria, ai metalli e al materiale organico. - pH dipendente. - Non efficace su spore batteriche e oocisti di protozoi.
Uso	- Usato a concentrazioni di 50-200 ppm per 1-2 minuti di contatto. - La sua efficacia è stata testata sulla maggior parte dei prodotti.
Commenti	- Elevate concentrazioni (> 500 ppm) possono essere inefficaci su alcuni patogeni. - Alle concentrazioni comunemente impiegate si ottengono riduzioni di 3 cicli log UFC/g.
<b><i>Clorito di sodio (NaClO<sub>2</sub>)</i></b>	
Vantaggi	- Maggior efficacia a bassi pH, rispetto all'ipoclorito.
Limiti	- Poche informazioni sulla formazione di sottoprodotti. - Poche pubblicazioni sull'argomento.
Uso	- Il suo impiego è stato studiato su prodotti a base di carne e pesce. - Usato tra 500-1200 ppm.
Commenti	- Sono richiesti ulteriori studi sui suoi effetti sugli alimenti.
<b><i>Biossido di cloro (ClO<sub>2</sub>)</i></b>	
Vantaggi	- Minor reattività con le sostanze organiche, rispetto all'ipoclorito. - Meno sottoprodotti clorinati. - Miglior attività antimicrobica a pH neutro.
Limiti	- Troppo stabile. - Non permesso per i prodotti di IV gamma.
Uso	- Ammesso al di sopra di 5 ppm solo su vegetali e frutta interi. - Ammesso fino a 1 ppm su patate sbucciate.
Commenti	- Il trattamento deve essere seguito da risciacquo, da scottatura, da cottura etc. - L'impiego allo stato gassoso richiede ulteriori studi. - Efficacia contrastante su alcuni patogeni. - Provata efficacia su funghi e oocisti di <i>Cryptosporidium</i> .



<b>Bromo</b>	
Vantaggi	- Possibile sinergia con i composti a base di cloro.
Limiti	- Mancanza di conoscenze sulla formazione di sottoprodotti potenzialmente pericolosi per la salute dell'uomo.
Uso	- Non comunemente utilizzato come sanitizzante.
Commenti	- Maggiormente efficace contro <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> che contro <i>Pseudomonasaeruginosa</i> . - Meno efficace dell'ipoclorito su spore di <i>Bacillus cereus</i> .
<b>Iodio</b>	
Vantaggi	- Meno corrosivo a bassa temperatura rispetto all'ipoclorito. - Largo spettro d'azione. - Ioduri meno volatili dello iodio.
Limiti	- Colora impianti, guanti e pelle. - Forma un composto blu per reazione con l'amido. - Corrosivo a temperature > 50° C.
Uso	- Comunemente usato per sanitizzare superfici e impianti. - Non direttamente usato sul prodotto.
Commenti	- Efficace su spore batteriche. - Possibile impiego sul vegetale intero prima della sbucciatura. - Il suo uso non è ancora legalmente approvato.
<b>Trisodio fosfato (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	
Vantaggi	- Meno corrosivo di molti altri composti. - Efficace su <i>E. coli</i> O157:H7.
Limiti	- pH troppo alcalino (12-12), elevato impatto ambientale, <i>Listeria</i> mostra resistenza.
Uso	- Occasionalmente usato per trattare arance fresche. - Ammesso solo su pollo.
Commenti	- A concentrazioni tra 1 e 15% riduce i patogeni fino a 6 cicli log.
<b>Composti di ammonio quaternario (quats)</b>	
Vantaggi	- Inodori, incolori. - Stabili ad elevate temperature. - Non corrosivi. - Buona capacità penetrante. - Relativamente stabili a detergenti organici.
Limiti	- Limitata efficacia a pH <6. - Non compatibili con saponi e detergenti anionici. - Costosi.
Uso	- Comunemente usati per sanitizzare superfici e impianti. - Non direttamente usati sui prodotti.
Commenti	- Efficaci su funghi e batteri gram-positivi. - Mostrano efficacia nella riduzione di <i>Xantomonas campestris</i> in arance. - Riducono del 95% la popolazione microbica sulla frutta. - Possibile impiego sul vegetale intero prima della sbucciatura. - Il loro uso non è ancora disciplinato.
<b>Acidi organici (Acido citrico – Acido ascorbico)</b>	
Vantaggi	- Economicamente convenienti in funzione del tipo di acidi e dell'uso.
Limiti	- Efficaci solo a bassi pH. - Efficacia antimicrobica legata al tipo di acido e ai ceppi microbici.

Uso	<ul style="list-style-type: none"> <li>- L'acidificazione è comunemente usata per conservare gli alimenti.</li> <li>- Commercialmente usati sotto-forma di spray sulle carcasse di carne.</li> <li>- Acido fosforico e suoi composti anionici impiegati sugli agrumi a 200 ppm.</li> </ul>
Commenti	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Succo di limone e aceto sono largamente impiegati come acidificanti casalinghi.</li> <li>- <i>Salmonella</i>, <i>Campylobacter</i>, <i>Yersinia</i>, <i>Shigella</i>, <i>Listeria</i> sono inibiti.</li> <li>- Possibile impiego (200 ppm) sul vegetale intero prima della sbucciatura.</li> </ul>
<b>Perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</b>	
Vantaggi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Effetti sulle spore batteriche.</li> <li>- Rapida degradazione in prodotti non tossici.</li> </ul>
Limiti	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alterazione del colore (imbrunimento o decolorazione).</li> </ul>
Uso	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Limitato uso per superfici a contatto con gli alimenti e durante il confezionamento.</li> </ul>
Commenti	<ul style="list-style-type: none"> <li>- In combinazione con acido acetico presenta efficacia nella riduzione di patogeni.</li> <li>- Vapori di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> riducono la popolazione microbica sulla superficie di molti frutti, anche se i dati sono piuttosto contrastanti.</li> </ul>
<b>Ozono</b>	
Vantaggi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Efficace a basse concentrazioni e per brevi tempi di contatto.</li> <li>- Largo spettro d'azione-</li> <li>- Buona capacità penetrante.</li> <li>- Efficacia documentata contro i protozoi-</li> <li>- Rapida decomposizione in prodotti non tossici-</li> </ul>
Limiti	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Possibili alterazioni fisiologiche dei tessuti vegetali-</li> <li>- Corrosivo per gli impianti-</li> <li>- Possibili alterazione dell'odore e del colore-</li> <li>- Instabile per elevata reattività-</li> <li>- Possibile tossicità per gli operatori del settore-</li> </ul>
Uso	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Comunemente usato per il trattamento delle acque-</li> </ul>
Commenti	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Attivo contro batteri, funghi e protozoi-</li> <li>- 20 ppm di ozono nelle acque di lavaggio possono ridurre la presenza di patogeni come <i>Yersinia enterocolitica</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Salmonella typhimurium</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>.</li> <li>- Buoni risultati su mele, uva, arance, pere e fragole.</li> <li>- Possibile impiego anche durante la conservazione.</li> </ul>
<b>Radiazioni</b>	
Vantaggi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Non sono trattamenti chimici.</li> <li>- Possono essere applicate dopo il confezionamento.</li> <li>- Aumento della <i>shelf-life</i>.</li> </ul>
Limiti	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Generalmente non accettati dal consumatore.</li> <li>- Possibili alterazioni sensoriali.</li> </ul>
Uso	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Da 1 a 10kGy usati per ridurre i patogeni negli alimenti.</li> <li>- &lt; 1kGy ammessi per inibire la germinazione dei tuberi, dei bulbi e delle radici, e per eliminare insetti.</li> </ul>
Commenti	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Efficacia variabile nel post-raccolta per fragole e frutti di bosco.</li> <li>- Poche informazioni sono disponibili sulla efficacia nei riguardi dei patogeni.</li> </ul>
<b>Biocontrollo</b>	

Vantaggi	- Non è un trattamento chimico.
Limiti	- Limitato spettro d'azione. - Reticenza del consumatore ad assumere microrganismi vivi.
Uso	- Sulle mele nel post-raccolta per i patogeni vegetali. - Come popolazione competitiva su carni di pollo per prevenire la colonizzazione intestinale di patogeni. - Colture starter ampiamente usate per la produzione di carne fermentata e prodotti lattiero caseari.
Commenti	- Ricerche ancora limitate sull'uso del biocontrollo contro i patogeni umani.

### 2.3.6 Asciugatura

Viene eseguita allo scopo di rimuovere l'acqua di lavaggio e i residui di cloro dalla superficie dei vegetali. I metodi più impiegati sono il drenaggio, l'asciugatura con aria o con mezzi assorbenti e la centrifugazione. La scelta delle condizioni di asciugatura deve essere effettuata tenendo conto che apportare ulteriori danni ai tessuti vegetali può compromettere la *shelf-life* del prodotto finito più della persistenza di residui di acqua.

### 2.3.7 Taglio

Rappresenta la fase più delicata dell'intero processo produttivo e deve essere realizzato in modo tale da apportare il minor danno possibile ai tessuti ed in condizioni da prevenire/ridurre le contaminazioni dirette o indirette. Si è sperimentalmente osservato che, passando un coltello su una superficie contaminata, si ha la contaminazione di tutta la superficie del prodotto successivamente esposta al taglio (Lin e Wei, 1997). Da ciò emerge quanto sia fondamentale lavare il vegetale intero prima del taglio ed effettuare un'attenta pulizia degli utensili, in quanto possono rappresentare veri e propri focolai di contaminazione microbica.

Gli effetti del taglio sui vegetali sono numerosi. La rottura della struttura cellulare determina: aumento dell'attività respiratoria del vegetale; improvvisa biosintesi di etilene (etilene da ferita); produzione di composti fenolici e fuoriuscita di fluidi intracellulari (enzimi, metaboliti, sostanze di riserva), che favoriscono la

proliferazione microbica. Lo stress da taglio comporta, inoltre, un accelerato consumo di zuccheri e acidi organici. Gli effetti del taglio sui vegetali possono riassumersi in :

- perdita di peso;
- rammollimento dei tessuti: da attribuire all'azione di enzimi pectinolitici e proteolitici endogeni o esogeni. Fenomeni di rammollimento possono essere anche dovuti a cambiamenti fisici e chimici;
- alterazione del colore: sono le alterazioni più evidenti sui vegetali di IV gamma. Riguardano l'imbrunimento, la perdita di clorofilla e la decolorazione. L'imbrunimento in pere, mele e lattuga è dovuto all'azione della polifenol-ossidasi (PPO) che agisce ossidando i fenoli, prodotti dall'enzima fenilalanina-ammino-liasi (PAL) in composti bruni. In altri casi il cambiamento del colore è da attribuire agli enzimi perossidasi (POD). L'imbrunimento enzimatico è associato alla presenza di quattro fattori: l'ossigeno, l'enzima ossidativo, il rame (o altro metallo) ed un substrato idoneo. L'imbrunimento può essere controllato con la refrigerazione, il confezionamento in atmosfera modificata e il trattamento con acidi (ascorbico e citrico); rallentano il fenomeno anche l'aggiunta di aminoacidi contenenti gruppi -SH e peptidi che inibiscono l'azione della PPO.

La perdita di clorofilla si osserva per molti vegetali in cui i processi di maturazione portano ad una diminuzione dei pigmenti verdi a favore di quelli gialli, fenomeno accelerato dalla presenza di etilene. In generale l'applicazione di atmosfere modificate (elevate concentrazioni di CO<sub>2</sub>) e della refrigerazione rappresentano un ostacolo a tale fenomeno.

- modificazione del flavour: sono da attribuire all'azione della lipo-ossidasi che catalizza reazioni di perossidazione, causando la formazione di cattivi odori dovuti allo sviluppo di aldeidi e chetoni o alla formazione di sostanze amare (Ahvenainen, 1996; Lanciotti *et al.*, 2004).

### 1.3.8 Confezionamento

La conservazione dei vegetali di IV gamma rappresenta una grande sfida per l'industria alimentare, in quanto i vegetali confezionati mantengono un metabolismo attivo che, se non adeguatamente controllato, diviene la causa più importante del deterioramento. Per i prodotti alimentari il confezionamento ha la funzione di contenere l'alimento, proteggendolo da contaminazioni di tipo biologico, chimico e fisico e di trasmettere al consumatore le informazioni sul prodotto.

Per i prodotti di IV gamma, la confezione rappresenta anche una barriera che limita la disidratazione ed i fenomeni di appassimento e che contribuisce ad ottimizzare la composizione gassosa nello spazio di testa.

La tecnologia maggiormente impiegata è l'utilizzo di atmosfera modificata, che prevede l'impiego di diverse concentrazioni di O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. Questa tecnica consente di aumentare la *shelf-life* ma può aumentare anche la probabilità di sviluppo di alcuni patogeni non rendendo sicuro il prodotto per il consumatore (Francis *et al.*, 2001). Deve inoltre essere evitato l'instaurarsi di ambienti asfittici (O<sub>2</sub> < 2% e CO<sub>2</sub> > 20%) poiché il passaggio del metabolismo microbico da aerobico a fermentativo può comportare sintesi di etanolo, acetaldeide, anidride carbonica e altri composti chimici causa di *off-flavours*, *off-odors* e decolorazioni (Nguyen e Carlin, 1994).

Differenti sono le composizioni della miscela gassosa ottimali per i singoli prodotti; in genere per la scelta delle migliori condizioni di confezionamento è indispensabile conoscere preventivamente:

- la deperibilità del prodotto;
- il comportamento della popolazione microbica nell'atmosfera prescelta;
- la permeabilità dei materiali di confezionamento ai gas impiegati;
- l'ermeticità della confezione;
- l'efficacia delle operazioni di confezionamento;
- la temperatura di conservazione;
- la modalità di valutazione della reale composizione dell'atmosfera presente nella confezione.

I gas d'imballaggio, il cui utilizzo è normato dalla Direttiva europea sugli additivi, sono azoto, ossigeno ed anidride carbonica ma, potenzialmente, anche argon, elio e protossido di azoto.

I principali effetti dell'anidride carbonica sugli alimenti sono:

1. inibizione della respirazione dei vegetali;
2. acidificazione dei liquidi tissutali;
3. inibizione degli ormoni vegetali della crescita;
4. inibizione dell'idrolisi delle pectine (evitando la fluidificazione);
5. rallentamento della maturazione dei vegetali;
6. riduzione dei danni da freddo dei tessuti vegetali.

Gli effetti principali dell'ossigeno sugli alimenti sono:

1. attivazione delle ossidazioni enzimatiche e chimiche;
2. ossigenazione della mioglobina con miglioramento del colore;
3. attivazione della degradazione del beta-carotene;
4. è il substrato della respirazione di cellule vegetali e microbiche.

L'uso di atmosfere modificate non deve essere considerato come un mezzo di risanamento o di miglioramento qualitativo di un prodotto alimentare scadente ma, piuttosto, come un'operazione tecnologica di supporto che solo unitamente o in sinergia con altri interventi (quali la refrigerazione, il controllo igienico, ecc.) può raggiungere gli effetti desiderati.

### *1.3.9 Distribuzione e commercializzazione*

La distribuzione e la commercializzazione rappresentano le fasi del processo produttivo in cui la garanzia del mantenimento della catena del freddo risulta più difficoltosa. Spesso, infatti, durante la vendita al dettaglio si verificano abusi termici a causa di prolungate soste sui piazzali, malfunzionamento degli impianti di

refrigerazione dei mezzi di trasporto ed errori nell'esposizione delle confezioni sui banchi di vendita.





## 2. LA MICROFLORA DEI PRODOTTI DI IV GAMMA

### 2.1 Introduzione

I prodotti vegetali freschi pronti al consumo sono alimenti biologicamente dinamici, per la loro attività metabolica e per la microflora associata, e pertanto piuttosto fragili in termini di integrità e igiene. L'intensità dei processi degenerativi dipende sia da fattori biologici che dalle condizioni ambientali.

Le insalate di IV gamma rientrano nella definizione di “prodotti potenzialmente pericolosi” in quanto hanno un valore di  $a_w$  superiore a 0,85 e un pH compreso tra 3 e 6,5: condizioni che, in alcuni casi, consentono lo sviluppo di microrganismi patogeni.

I vegetali crudi quando entrano nella catena produttiva risultano già fortemente contaminati. Analisi condotte in differenti stadi dell'intero processo mostrano che il prodotto finito è generalmente meno contaminato della materia prima. Ciononostante, alcuni trattamenti possono causare un aumento del carico dei batteri mesofili: le operazioni di taglio, ad esempio, possono portare ad un aumento del carico da  $10^3$  fino a  $10^6$  UFC/g per diversi tipi di vegetali e da  $10^4$  fino a  $10^6$  UFC/g per insalate a base di lattuga e cicoria. Anche i batteri patogeni possono aumentare nel corso del ciclo produttivo; ad esempio, *Listeria monocytogenes* è stata isolata nel 19% dei campioni di insalata fresca minimamente trattata, mentre solo l'1,8% dei singoli ingredienti risultavano contaminati (Velani e Roberts; 1991).

A livello europeo è risultato che su 811 campioni di insalate di IV gamma il 4,2 % era contaminato da *Listeria* (dal report sulle zoonosi, 2010).

Della flora batterica, normalmente presente, fanno parte molti batteri appartenenti, per la maggior parte, ai generi *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, oltre che lieviti e muffe. Molti di questi posseggono spiccate capacità di crescita a temperature di refrigerazione (Morgante *et al.* 2008). Come conseguenza diretta dei fenomeni catabolici dei tessuti vegetali che si verificano anche dopo il confezionamento, si assiste ad un aumento della concentrazione di  $CO_2$  all'interno del contenitore, che

riesce a rallentare ed in alcuni casi ad inibire lo sviluppo della flora microbica presente realizzando, di fatto, una condizione di atmosfera modificata.

## **2.2 Aspetti igienico-sanitari**

Gli aspetti igienico-sanitari dei prodotti di IV gamma sono disciplinati da diversi regolamenti.

Il **Reg. CE n. 2073/2005**, che emana i criteri microbiologici in base al quale si definisce l'accettabilità di un prodotto, di una partita di prodotti alimentari o di un processo, in base all'assenza, alla presenza o al numero di microrganismi e/o in base alla quantità delle relative tossine/metaboliti, per unità di massa, volume, area o partita. Per microrganismi si intendono i batteri, i virus, i lieviti, le muffe, le alghe, i protozoi parassiti, i parassiti microscopici, le loro tossine e i loro metaboliti. Lo stesso regolamento definisce come conformità ai criteri microbiologici l'ottenimento di risultati soddisfacenti o accettabili (specificati nell'allegato I, successivamente modificato dal Reg. CE 1441/2007) nei controlli volti ad accertare la conformità ai valori fissati per i criteri mediante il prelievo di campioni, l'effettuazione di analisi e l'attuazione di misure correttive, conformemente alla legislazione in materia di prodotti alimentari e alle istruzioni dell'autorità competente.

Di seguito sono specificati criteri microbiologici specifici di sicurezza alimentare e di igiene di processo per gli alimenti vegetali freschi pronti.

Come criteri di sicurezza alimentare:

1. *Listeria monocytogenes*: deve essere assente in 25g di prodotto per prodotti che devono ancora uscire dal sistema di controllo diretto del produttore;
2. *Salmonella*: deve essere assente in 25 g di prodotto per i prodotti non scaduti.

Come criteri di igiene di processo, che valutano la qualità dei processi produttivi:

3. per *Escherichia coli* i limiti sono da un minimo (m) di 100 a un massimo (M) di 1000 UFC/g durante il processo di lavorazione. Sono definite tre categorie: idoneo se 5 unità su 5 sono sotto il limite inferiore, accettabile se 2 unità su 5

sono tra  $m$  ed  $M$ , e inaccettabile se meno di 2 unità su 5 sono sotto il limite inferiore e più di una è sopra il limite superiore.

*Il Reg CE n. 852/2004* sull'igiene dei prodotti alimentari, che sostituisce la direttiva *93/43/CEE* sull'igiene dei prodotti alimentari al fine di attuare una politica globale ed integrata applicabile a tutti i prodotti alimentari, dall'azienda agricola fino al consumatore. Questo regolamento mira a garantire l'igiene dei prodotti alimentari in tutte le fasi del processo di produzione, dalla produzione primaria fino alla vendita al consumatore finale.

### ***2.3 Principali patogeni associati alla materia prima***

I pericoli che si possono riscontrare nella materia prima dei prodotti di IV gamma, sono per lo più legati alle condizioni di coltivazione, in quanto su questi prodotti non è possibile eliminare del tutto la carica microbica pur mantenendo integro il prodotto.

Sono infatti la localizzazione e la modalità di coltivazione che condizionano il prodotto sia sulla pianta che dopo la raccolta. Zone sfavorevoli non consentono di raggiungere caratteristiche di sviluppo e organolettiche ottimali nel prodotto, e per di più favoriscono la suscettibilità della coltura a fisiopatologie, attacchi di patogeni e parassiti, aumentando così i rischi di residui chimici di sintesi nel prodotto.

Inoltre, la localizzazione può essere fonte di eccessive impurità fisiche, chimiche e microbiologiche. Dalla prossimità di aziende zootecniche può dipendere una carica troppo elevata di microrganismi potenzialmente patogeni per l'uomo. Le deiezioni animali costituiscono una fonte di tali microrganismi, quindi, per prodotti destinati alla IV gamma, non dovrebbero essere utilizzati concimi di origine animale. Un altro serbatoio per la contaminazione da microrganismi può essere l'acqua usata per l'irrigazione.

La distribuzione superficiale dei microrganismi è molto variabile e spesso correlata alla specifica anatomia del vegetale. Per esempio, nei vegetali a foglia, i siti di

sviluppo dei microrganismi sono le venature, gli stomi e le giunzioni delle pareti cellulari. Nonostante la superficie integra di frutti e vegetali conferisca protezione all'ingresso dei microrganismi all'interno dei tessuti, stomi e lenticelle costituiscono naturali vie di accesso che, insieme alle ferite e alle abrasioni, provocate durante la manipolazione, possono favorire il fenomeno dell'infiltrazione.

I principali microrganismi patogeni che si possono ritrovare nei prodotti di IV gamma *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Yersinia enterocolitica*.

### 2.3.1 I coliformi

L'appartenenza a questa famiglia da parte di generi differenti, più che sulle caratteristiche sistematiche dei diversi microrganismi, si è basata storicamente sul metodo utilizzato per il loro rilevamento che sfrutta la loro capacità di fermentare il lattosio con produzione di gas e acido alla temperatura di 35-37° C in 48 ore. I coliformi totali sono batteri a forma di bastoncello, *Gram*-negativi, aerobi ed anaerobi facoltativi, non sporigeni, ed alcuni di questi sono dotati di pili e flagelli. Sono considerati classici indicatori di contaminazione nelle acque. Pur essendo presenti nel materiale fecale di origine umana con una densità media di 10<sup>9</sup> UFC/g, sono considerati ubiquitari. Proprio a causa della loro costante presenza nell'ambiente, la loro validità come indicatori è stata più volte messa in dubbio. Le più recenti indicazioni, in fase comunque di ulteriore evoluzione, tendono a distinguere i microrganismi appartenenti al gruppo in due principali categorie che, in base alle specie, e non più al genere, differenziano coliformi di origine fecale e coliformi di origine acquatica e tellurica, naturalmente presenti nelle acque al di là di qualsiasi contaminazione. La prima categoria, ben conosciuta, è quella dei coliformi di riconosciuta origine fecale che comprende alcune specie dei generi: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, presenti nel materiale fecale dell'uomo e degli animali a sangue caldo e in acque e suoli contaminati; infatti pur essendo già presenti nel nostro intestino, se questi microrganismi venissero ingeriti, potrebbero causare serie patologie. La seconda categoria corrisponde a specie che, al contrario, sono

largamente distribuite nell'ambiente, dove possono anche moltiplicarsi, colonizzando suolo, acqua e vegetazione.

### 2.3.2 *Gli sporigeni*

Vengono raggruppati sotto questo nome tutti quei batteri che sono in grado di produrre un'endospora. Questa è una struttura molto particolare, prodotta da pochi generi, i due principali sono gli aerobi o anaerobi facoltativi del genere *Bacillus* e gli anaerobi obbligati del genere *Clostridium*.

L'endospora è una spora, o stadio di quiescenza tipica dei batteri, che si forma all'interno della cellula. La spora dormiente permette al batterio di sopravvivere a lunghi periodi di essiccazione e di elevata temperatura. Rispetto ad altri batteri, questi sono più resistenti non solo alla siccità e al calore ma anche ai raggi ultravioletti e alla disinfezione.

I batteri formanti endospora, hanno due fasi di crescita, la crescita vegetativa, che è la normale fase di crescita e riproduzione, e la sporulazione. I batteri sporigeni si trovano prevalentemente nei suoli, nei sedimenti acquatici e nei fanghi.

Il genere *Bacillus* contiene sia batteri aerobi che anaerobi facoltativi. Le tante specie di questo genere producono catalasi, il che spiega la loro sopravvivenza in presenza di ossigeno. Le varie specie di questo genere sono classificate in base alla loro morfologia cellulare, usando in particolare la forma delle endospore e la loro localizzazione. Le specie più conosciute sono: *B. subtilis* aerobio obbligato piccolo, *B. cereus* piuttosto grande ed è tra i più comuni batteri del suolo, *B. anthracis* che è l'agente casuale dell'antrace in uomini e animali, e che a differenza di *B. cereus* non è mobile.

Il genere *Clostridium* invece contiene solo batteri anaerobi, tra i quali alcune specie ambientali importanti e patogeni per l'uomo. Le specie di *Clostridium* sono raggruppate in alcuni sottogruppi principali a seconda delle loro capacità fermentative. Alcuni fermentanti gli aminoacidi sono causa di malattia, e fra questi troviamo *C. tetani*, agente eziologico del tetano, e *C. botulinum*, responsabile del botulismo. *C.*

*botulinum* è un altro batterio patogeno del suolo. La tossina botulinica è un'esotossina proteica che viene liberata dal batterio durante la crescita. Questa tossina compromette il rilascio di acetilcolina dalle giunzioni dei nervi motori, causando così la paralisi di tutti i muscoli.

### 2.3.3 I patogeni

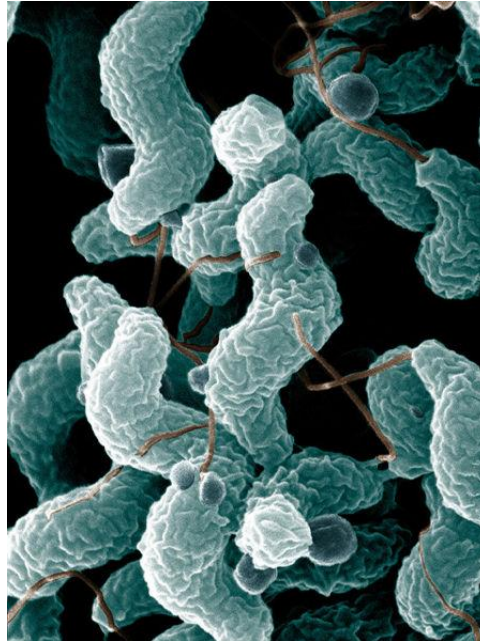
Questi microrganismi sono chiamati patogeni perché se presenti negli alimenti che introduciamo con la dieta provocano malattie, infezioni e tossinfezioni. Il livello del danno che deriva da un'infezione dipende dalla patogenicità dell'invasore e dalla relativa resistenza dell'ospite.

Ciascun patogeno infatti è caratterizzato da: infettività, che è la capacità di penetrare attecchire e moltiplicarsi nell'ospite; patogenicità, che è la capacità di un microrganismo di causare un danno; carica infettante, cioè il numero minimo di patogeni necessario per dare inizio all'infezione, e infine, contagiosità, che si valuta calcolando quanti individui sani si infettano in presenza di un malato (Kramer e Cantoni, 2011).

I patogeni che interessano maggiormente in quanto considerati patogeni alimentari per la loro possibile presenza negli alimenti sono *Campylobacter*, *Escherichia coli* O:157, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* e *Yersinia enterocolitica*.

- **Campylobacter** è un batterio microaerofilo (2-10% di CO<sub>2</sub> e 3-5% di O<sub>2</sub>) con forma ricurva ad "S" o spiralato, mobile tramite uno o due flagelli polari, Gram-negativo, fa parte dei *Proteobacteria*. È l'agente eziologico di una malattia diarroica acuta detta campylobacteriosi. Fa parte della microflora normale del tratto intestinale degli animali selvatici e domestici. Producono citotossine, sono entero-invasivi, ed è sufficiente una piccola carica infettante per provocare gastroenterite con sangue nelle feci e febbre. La trasmissione all'uomo avviene per via oro-fecale, attraverso l'ingestione di cibo e acque contaminate. Grazie alla sua morfologia spiraliforme e la presenza di flagelli,

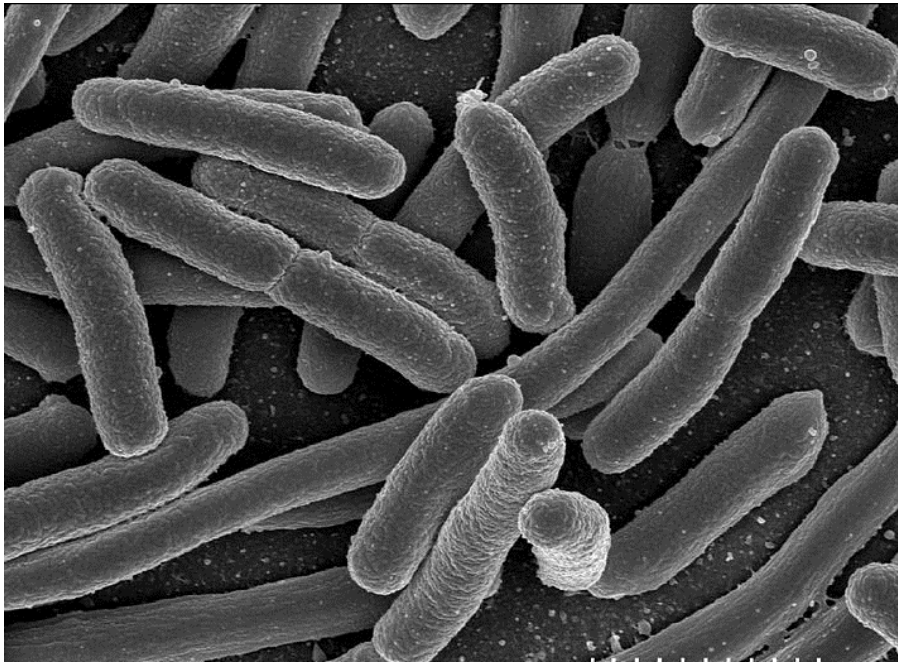
riesce a muoversi attraverso il muco e aderire, grazie alle adesine poste sui flagelli, alle cellule epiteliali intestinali, penetra poi negli enterociti e forma dei vacuoli. A questo punto l'organismo reagisce all'invasione e alla produzione di enterotossine attivando le cellule di difesa immunitaria .



**Figura 2.1** - Cellule di *Campylobacter jejuni* al microscopio elettronico. Si notano la caratteristica forma a spirale e le strutture collegate.

- ***Escherichia coli*** è un microrganismo a forma di bastoncello, anaerobio facoltativo, non sporigeno, *Gram*-negativo, che cresce alla temperatura di 44.5° C, è residente nell'apparato digerente di uomo e animali a sangue caldo. Esistono però ceppi che provocano una malattia diarroica, riscontrata prevalentemente i soggetti che viaggiano, è infatti chiamata “diarrea del viaggiatore”. È possibile contrarre questa patologia a causa dell'ingestione di cibi o acque contaminate, come per *Campylobacter*, ed è infatti considerato un indicatore di contaminazione fecale. I ceppi patogeni di *E. coli* possiedono fattori di virulenza trasportati dai plasmidi, uno di questi è l'antigene di superficie K che permette l'attacco e la penetrazione degli enterociti. Quindi, aderiscono alla mucosa intestinale attraverso pili e fimbrie, producono un enterotossina e scatenano la malattia.

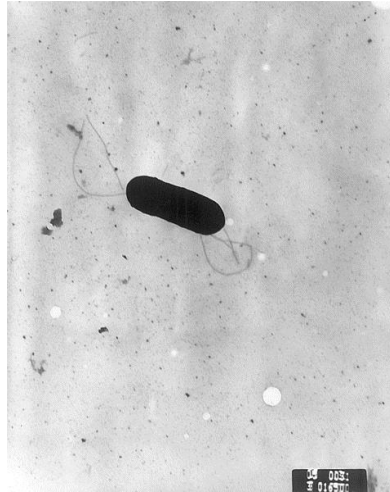




**Figura 2.2** - Cellule di *E. coli* al microscopio elettronico a scansione.

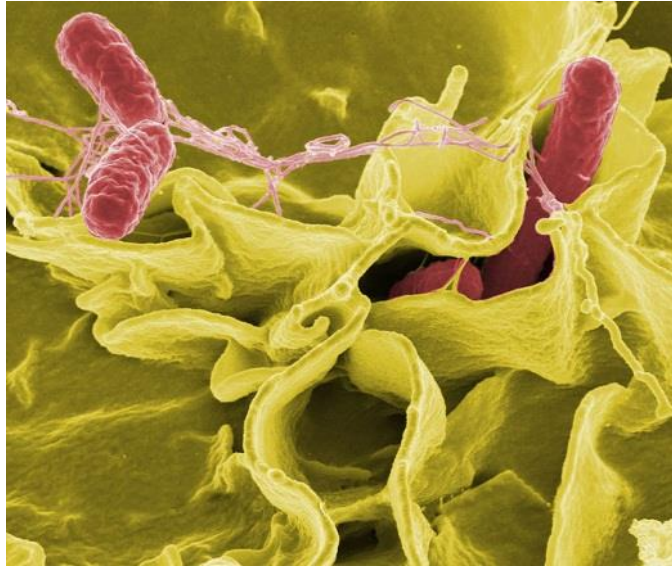
- *Listeria monocytogenes* è un bastoncello tozzo, *Gram*-positivo, non sporigeno, anaerobio facoltativo mobile a 28° C per la presenza di flagelli peritrichi (da 1 a 5), catalasi positivo ma ossidasi negativo. Il microrganismo cresce in un range di temperatura molto largo (tra i + 3° C e i 45° C) con un optimum tra i 30° e i 38° C. Esso si mantiene vitale anche a 0° C e fino a temperature prossime a quelle usate per la pastorizzazione. È un patogeno soprattutto degli animali e viene trasmesso all'uomo tramite l'ingestione di cibi e bevande contaminate. Possiede un antigene lipopolisaccaridico complesso sulla superficie, e questo una volta entrato nell'enterocita, e lisato il vacuolo con il quale era penetrato all'interno della cellula, svolge la stessa funzione della tossina di un batterio *Gram*-negativo. Può infettare donne gravide e attraversare la barriera placentare ed infettare il feto.





**Figura 2.3**– Cellula di *Listeria monocytogenes* al microscopio elettronico. Si possono notare i flagelli peritrichi.

- ***Salmonella ssp.*** è un bacillo *Gram*-negativo, asporigeno, aerobio facoltativo. Fermenta il glucosio, producendo gas (acido solfidrico), riduce i nitrati. La maggior parte non fermenta il lattosio. Sono tutte mobili grazie alla presenza di flagelli peritrichi. La fonte di contaminazione del cibo sono le persone che maneggiano alimenti, come anche i portatori asintomatici, e data l'ampia distribuzione delle salmonelle praticamente quasi tutti gli alimenti sono a rischio di contaminazione. Una fonte di contaminazione possono essere anche le mani contaminate maneggiando animali infetti, ma anche l'acqua inquinata da rifiuti animali o umani. Uno dei fattori di invasività più interessanti è il TTSS, un complesso apparato multi-proteico comune a molti *Gram*-negativi, che consente di esportare nella cellula ospite proteina effettrici che facilitano il superamento da parte del batterio della barriera intestinale e lo proteggono dall'azione dei macrofagi. Una volta superata la barriera intestinale, *Salmonella* libera le endotossine che causano l'alterazione enzimatica cellulare. I sintomi di salmonellosi sono cefalee, crampi addominali e diarrea.



**Figura 2.4** - Cellule di *Salmonella typhimurium* al microscopio elettronico a scansione (in rosso) mentre sta invadendo colture di cellule umane.

- ***Yersinia enterocolitica*** è una specie di batterio cocco-bacillo *Gram*-negativo, che provoca una zoonosi sia nell'uomo che in alcune altre specie animali quali gatti, maiali e alcuni uccelli. È l'agente eziologico dell'enterocolite nell'uomo. Può essere isolato nelle acque di pozzo e nelle acque lacustri. Come per molte delle malattie precedentemente menzionate anch'essa si trasmette per via oro-fecale. Può essere veicolato tramite prodotti infetti congelati o refrigerati perché si sviluppa bene a 4° C. Questo batterio attacca ed invade le cellule epiteliali intestinali, e la sintomatologia è causata da febbre, diarrea e dolori addominali.



**Figura 2.5** - Cellule di *Yersinia enterocolitica* al microscopio elettronico.



### 3. CONSERVAZIONE DEI PRODOTTI DI IV GAMMA

#### 3.1 Introduzione

Come risposta alle sempre più numerose richieste da parte dei consumatori di ridurre o eliminare gli additivi di sintesi chimica, numerosi sforzi sono stati condotti per trovare alternative naturali per prevenire la crescita di batteri e funghi nei prodotti minimamente processati. Diversi composti naturali con capacità antimicrobica come fenoli, chitosano, aldeidi ed acidi organici sono stati testati per dimostrare l'efficacia di questi trattamenti antimicrobici alternativi (Lanciotti *et al.*, 2004).

Anche composti naturali come oli essenziali di coriandolo, menta, vanillina, prezzemolo e buccia di agrumi, composti carbonilici, o isotiocianati ottenuti da verdure crocifere sono stati studiati (Gonzalez-Aguilar *et al.*, 2010). La loro limitazione principale è dovuta a forti odori e al gusto che possono conferire al prodotto. L'uso di antimicrobici alternativi, utilizzati con tecniche di dipping, e l'impiego di rivestimenti edibili sono risultati utili nell'estendere la vita commerciale di frutta fresca tagliata. Buoni risultati sono stati ottenuti anche attraverso l'applicazione di confezionamento in atmosfera modificata (MAP) e metodi fisici come la luce ultravioletta (UV), trattamenti termici e irraggiamento (Abadias *et al.*, 2011).

La composizione e le proprietà chimico-fisiche della materia prima condizionano il carico microbiologico dei prodotti di IV gamma, ma i trattamenti a cui il prodotto viene sottoposto sono di fondamentale importanza, perché determinano la perdita di qualità durante la conservazione.

L'acido citrico è stato ampiamente accettato come efficace nella riduzione del pH superficiale di molti frutti tagliati.

### 3.2 Conservanti chimici e naturali

Alcuni composti chimici sono stati utilizzati per ridurre le popolazioni batteriche sulla frutta e risultano ancora essere i trattamenti più utilizzati, sia prima delle operazioni di produzione sia in fase di pre- e post-operazioni di taglio. In particolare, le sostanze chimiche a base di cloro, quali cloro liquido, ipoclorito e biossido di cloro, sono solitamente utilizzati a livelli di 50-200ppm di cloro libero e con tempi di contatto di meno di 5 minuti. I trattamenti con acqua clorata sono stati, e sono tradizionalmente applicati, per decontaminare i prodotti freschi, ma in alcuni paesi europei, tra cui Germania, Paesi Bassi, Svizzera e Belgio, l'uso di cloro in prodotti pronti all'uso è vietata, per via della loro potenziale tossicità (Ölmez *et al.* 2009). Infatti, il cloro reagendo con la materia organica naturale forma dei sottoprodotti alogenati cancerogeni (Gil *et al.*, 2009).

Recenti studi hanno anche dimostrato che queste sostanze chimiche sono in grado di rimuovere completamente o di inattivare i microrganismi presenti nei prodotti freschi. Accanto alle immersioni in acqua clorata, trattamenti a base di acqua trattata con calcio sono suggeriti per ridurre le popolazioni microbiche e prolungare la durata di conservazione di frutta, in particolare utilizzando lattato di calcio, composto ampiamente utilizzato per frutti delicati e mele (Anino *et al.*, 2006). Sono state studiate anche le proprietà antibatteriche del propionato di calcio, grazie alla sua capacità di disaccoppiare i processi microbici di trasporto; e trattamenti per immersione in acqua ossigenata (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Rico *et al.*, 2007).

I conservanti alimentari chimici sono responsabili di occasionali reazioni allergiche in soggetti sensibili, in tal modo l'interesse per composti antimicrobici naturali è notevolmente aumentata.

Una buona prova è fornita dallo studio di Roller e Seedhar (2002) che hanno evidenziato come il carvacrolo e l'acido cinnamico ritardassero il deterioramento microbico di prodotti minimamente processati a base di melone e kiwi. I frutti sono stati pelati, tagliati a spicchi e successivamente immersi per 1 minuto in soluzioni contenenti 1, 5, 10 o 15 mM di carvacrolo o 1 mM di acido cinnamico. L'immersione del kiwi in soluzioni contenenti concentrazioni di carvacrolo di 5-15 mM ha portato ad

una riduzione della carica microbica totale da 6,6 a meno di 2 log CFU/g dopo 21 giorni di conservazione a 4° C. Anche il trattamento con 1 mM di acido cinnamico ha ridotto la conta su entrambi i prodotti, estendendo notevolmente la loro durata di conservazione.

L'estensione della *shelf-life* di mele di IV gamma a due stadi di maturazione (parzialmente maturi e mature) impiegando sostanze naturali è stata valutata da Raybaudi-Massilia *et al.* (2007): questo studio ha dimostrato una riduzione del tasso di crescita ed un aumento della fase di latenza dei batteri mesofili e psicrofili, lieviti e muffe, e ha portato ad una estensione di vita del prodotto di 13 giorni.

Un approccio interessante e più recente è stato proposto da D'Amato *et al.* (2010) che hanno esaminato l'attività di alcuni composti naturali per prolungare la vita commerciale di macedonie conservate a 4, 8 e 12° C. In particolare si è studiato l'effetto del chitosano, di miele e succo di ananas (utilizzata come soluzione di riempimento) sulla crescita di batteri mesofili, psicrotrofi, lattici e lieviti. Il miele ha mostrato il massimo effetto antibatterico sui batteri mesofili e psicrotrofi. L'attività antimicrobica del chitosano ha avuto effetto sulla crescita di tutti i gruppi microbici considerati, in particolare, in condizioni di conservazione refrigerate.

Tra i numerosi approcci “naturali”, sono stati proposti, per ridurre la popolazione microbica, l'acido citrico e ascorbico. L'azione antimicrobica di tali acidi è dovuta alla riduzione del pH dell'ambiente, all'interruzione del trasporto di membrana e/o la permeabilità, l'accumulo di anioni, o alla riduzione del pH intracellulare dovuto alla dissociazione degli ioni idrogeno dall'acido. In particolare l'acido citrico ha dimostrato di essere efficace nel ridurre il pH superficiale della frutta tagliata (Soliva-Fortuny e Martín-Belloso, 2003).

### ***3.3 Imballaggi funzionali***

Tra le alternative proposte per aumentare la *shelf-life* dei prodotti di IV gamma sono state proposte soluzioni di packaging in cui si prevede l'impiego di un materiale, un contenitore o un accessorio di imballaggio in grado di svolgere una funzione attiva

ed aggiuntiva rispetto a quelle tradizionali di contenimento e generica protezione del prodotto. Tra le tecniche più recenti ed innovative si hanno gli imballaggi attivi e quelli intelligenti.

- ❖ **Active:** soluzioni di packaging che costantemente ed attivamente interagiscono con l'atmosfera interna di una confezione, variando la composizione qualitativa dello spazio di testa, e con il prodotto in essa contenuto, mediante rimozione e/o rilascio di componenti utili (antimicrobici, antiossidanti o altre sostanze) al mantenimento della qualità. Possono essere utilizzati materiali plastici modificati per inclusione nei polimeri di composti assorbenti ed attivi o inserimento nella confezione di bustine e sacchetti contenenti principi attivi.
  
- ❖ **Intelligent:** tecnica di packaging che prevede l'impiego di un indicatore, interno o esterno alla confezione, capace di registrare variazioni importanti ai fini della conservazione del prodotto e rappresentarne attivamente la storia e quindi il suo livello di qualità. Ha la funzione di interagire sia con l'ambiente della confezione, sia con il consumatore registrando variazioni importanti ai fini di una buona conservazione degli alimenti e segnalando l'avvenuto abuso al consumatore per mezzo di variazioni cromatiche evidenti. Le forme più diffuse sono rappresentate da indicatori di freschezza (TTI = time temperature integrators) da applicare sulla superficie esterna delle confezioni. Il controllo della "storia termica" dei prodotti processati al minimo può essere effettuato in condizioni reali. Tali indicatori manifestano variazioni cromatiche (per effetto di reazioni chimiche ed enzimatiche) proporzionali all'esposizione tempo-temperatura del prodotto e dunque alla sua perdita di freschezza.

I primi imballaggi attivi ad essere immessi sul mercato prevedevano l'inserimento di una bustina nella confezione: quelli con attività antimicrobica diretta includevano composti volatili come biossido di zolfo, etanolo, acidi organici e oli essenziali (Ozdemir e Floros, 2004). Recentemente, Ayala-Zavala *et al.* (2008) hanno



proposto una microcapsula contenente olio essenziale che si è rivelata utile per aumentare la durata di conservazione di prodotti di IV gamma.

Come già accennato, un altro tipo di imballaggio attivo è quello di utilizzare materiali plastici modificati in cui vengono inclusi polimeri con attività antimicrobica. In questo caso però, per avere un effetto sulla riduzione della crescita microbica, è richiesto un contatto prodotto-polimero.

Lanciotti *et al.* (1999) hanno dimostrato che l'inclusione di esanale a livelli non superiori a 100ppm nell'atmosfera di stoccaggio di mele fresche aveva un effetto significativo sulla loro qualità: infatti, l'esanale ha influenzato positivamente la conservabilità, studiata a 4 e 15° C, riducendo il tasso di crescita della popolazione microbica. La presenza di esanale a 4° C ha totalmente inibito i batteri mesofili e ha considerevolmente prolungato la fase di latenza dei batteri psicrotrofi. Anche a 15° C, questo composto ha fortemente ritardato la crescita di muffe, lieviti, batteri mesofili e psicrotrofi.

Inoltre, Leepipattanawit, Beaudry e Hernandez (1996) hanno evidenziato effetti positivi nella produzione di aroma, su fette di mela, dovuti all'inter-conversione dell'esanale in altri aromi volatili. I trattamenti con 2-nonanone a 130 e 300 ml/L di aria sono stati considerati fungistatici, inibendo completamente la crescita del *Penicillium expansum* in spicchi di mela, ma hanno determinato danni fisiologici sulla superficie.

L'inclusione di esanale in combinazione con *trans*-2-esenale nell'atmosfera di mele fresche affettate ha determinato una significativa estensione della durata di conservazione anche quando il prodotto è stato inoculato con 10<sup>3</sup> UFC/g di *Pichia subpelliculosa* e conservate con temperature di stoccaggio di abuso (Corbo *et al.* 2000). In aggiunta alla loro attività sulla conservabilità, l'utilizzo di esanale, *trans*-2-esenale ed esil-acetato, hanno avuto un effetto inibitorio nei confronti dei microrganismi patogeni come *E. coli*, *Salmonella enteritidis* e *Listeria monocytogenes* deliberatamente inoculati. Alle diverse concentrazioni di utilizzo (150, 150 e 20ppm rispettivamente per esanale, esil-acetato e *trans*-2-esenale), questi composti hanno mostrato un effetto battericida su *L. monocytogenes*, e hanno causato una significativa

estensione della fase di latenza di *E. coli* e *Salmonella enteritidis* inoculati a livelli di  $10^4$ - $10^5$  CFU/g.

### ***3.4 Confezionamento in atmosfera modificata di frutta e vegetali***

La refrigerazione rallenta il deterioramenti dei cibi conservati poiché rallenta la respirazione, ma, se l'atmosfera che circonda il prodotto è modificata in modo da ridurre la concentrazione di O<sub>2</sub>, la *shelf-life* è incrementata considerevolmente a causa di un'ulteriore riduzione nella velocità delle ossidazioni chimiche e nella crescita di microrganismi aerobi.

Le tecniche usate per ridurre la concentrazione di O<sub>2</sub> che circonda l'alimento in un imballaggio, sono note come confezionamento in atmosfera modificata o dall'inglese MAP (Modified Atmosphere Packaging).

Il deterioramento di frutta e vegetali avviene principalmente in seguito a processi di senescenza fisiologica e perdita di acqua; nei prodotti freschi "pronti all'uso" sono importanti, però, anche fattori quali l'imbrunimento enzimatico e la degradazione microbica. La velocità con la quale i prodotti conservati respirano è il principale fattore che determina il grado di invecchiamento fisiologico.

Gli effetti della riduzione di O<sub>2</sub> e dell'incremento della CO<sub>2</sub> nel prolungamento della *shelf-life* di frutta e vegetali, sono stati dimostrati da numerose ricerche e da applicazioni pratiche di conservazione in atmosfera controllata. I benefici del MAP derivano da una generale riduzione nella velocità dei processi metabolici, dal ritardo della maturazione, invecchiamento e conseguente perdita di accettabilità del prodotto da parte del consumatore.

Oltre alla riduzione della respirazione, gli effetti benefici derivanti dall'utilizzo della MAP sono dovuti anche ad una ridotta sintesi ed attività dell'etilene (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) che comporta un ritardo nella maturazione dei frutti e nell'indurimento di alcuni vegetali

Da non sottovalutare è il materiale che avvolge il prodotto, in quanto ha una funzione essenziale per il successo della MAP.

La sensibilità del prodotto ai diversi livelli dei gas impiegati deve essere considerata, al fine di evitare lo sviluppo di fermentazioni indesiderate e danno da CO<sub>2</sub>.

Il più frequente utilizzo del MAP nei prodotti freschi riflette la crescente domanda, da parte del consumatore, di alimenti caratterizzati da una più lunga *shelf-life* e da un minor uso di conservanti. I principali gas utilizzati sono ossigeno, azoto e biossido di carbonio; impiegati in differenti combinazioni e proporzioni a seconda del prodotto e delle necessità del produttore e consumatore.


### ***3.5 Hurdle-technology per la conservazione alimentare***


Il concetto di “tecnologia degli ostacoli” è stato introdotto da Leistner nel 1978 e ha dichiarato che la sicurezza microbica, la conservazione, la qualità sensoriale e nutrizionali degli alimenti si basano sull'applicazione di più fattori combinati che i microrganismi presenti non sono in grado di superare. Pertanto, la tecnologia degli ostacoli si riferisce alla combinazione di più metodi di conservazione e processi diversi per inibire la crescita microbica. Un'applicazione intelligente di questa tecnologia richiede una migliore comprensione del fenomeno: conoscere l'interazione dei diversi ostacoli negli alimenti e le risposte fisiologiche dei microrganismi durante la conservazione degli alimenti. L'utilizzo di un adeguato mix di ostacoli non solo è economicamente attraente, ma serve anche a migliorare non solo la stabilità microbica, ma anche le qualità sensoriali e nutrizionali di un alimento.

Questo approccio può portare ad una conservazione più efficace degli alimenti, grazie all'applicazione di trattamenti più soft che disturbano l'omeostasi e il metabolismo microbico ed evita reazioni di stress. In termini pratici, questo significa che è più efficace l'impiego di più fattori di conservazione “soft” rispetto ad un trattamento di intensità maggiore; questo perché l'uso combinato di diversi fattori di conservazione può produrre un effetto sinergico.

Gli ostacoli principali impiegati sono:

 temperatura;

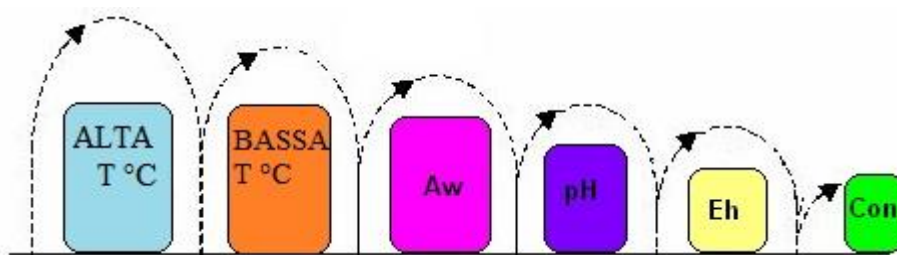
 aw;

 pH;

- ✚ Eh (potenziale redox);
- ✚ conservanti chimici;
- ✚ confezioni sottovuoto o in atmosfera modificata;
- ✚ raggi UV;
- ✚ HPP (High Pressure Processing) o UHP (Ultra High Pressure);
- ✚ microflora (batteri lattici in primis).

Nei paesi industrializzati, la tecnologia degli ostacoli è di grande interesse nell'industria alimentare per estendere la durata e la sicurezza degli alimenti minimamente processati; soprattutto quegli alimenti che hanno bassi valori di grasso e/o sale. Analogamente, viene applicato in alimenti fermentati o refrigerato in cui la bassa temperatura è spesso l'unico ostacolo da superare (ad esempio durante la distribuzione), che può portare alla alterazione e intossicazione dei cibi.

Questa tecnologia viene utilizzata sempre più per la fabbricazione di nuovi prodotti e per ridurre i costi (es. refrigerazione) e/o l'uso dei conservanti chimici (es. nitriti). La necessità di integrare nuove, e sempre più efficaci combinazioni ha stimolato l'interesse verso i conservanti naturali e biologici (Leistner, 1999), come LAB e loro composti antimicrobici.



**Figura 3.1** - Teoria degli ostacoli. Esempio di modello alimentare con 6 ostacoli: alta temperatura durante la lavorazione, bassa temperatura durante la conservazione, attività dell'acqua limitata, l'acidità (pH), potenziale redox (Eh) e conservanti (Con). I batteri lattici possono contribuire in due di questi ostacoli, una significativa diminuzione del pH e la produzione di composti antimicrobici (batteriocine).

Come si può evincere dalla tabella successiva si dispone di una vasta gamma di processi tecnologici e biotecnologici che, opportunamente accoppiati, incidendo contemporaneamente su diversi parametri, permettono di raggiungere gli obiettivi

prefissati. Ogni processo è correlato direttamente ad uno o più parametri mediante i quali esercita un'azione inibente specifica e agisce indirettamente su altri, rappresentando un freno aggiuntivo alla degradazione.

<b>PROCESSI</b>	<b>Temperatura</b>	<b>a<sub>w</sub></b>	<b>pH</b>	<b>Pot. Redox</b>	<b>Azione conservante</b>
Riscaldamento	<input type="checkbox"/>	●	●	●	●
Raffreddamento	<input type="checkbox"/>	●	●	●	●
Congelamento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		●	●
Essiccamento	●	<input type="checkbox"/>	●	●	●
Liofilizzazione	●	<input type="checkbox"/>	●	●	●
Salatura	●	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	●	<input type="checkbox"/>
Addizione di zuccheri	●	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	●	●
Fermentazione	●	●	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Affumicamento	●	●	●	●	<input type="checkbox"/>
Microonde	<input type="checkbox"/>	●	●	●	●
Atmosfera modificata	●	●	●	<input type="checkbox"/>	●
UHP: 3000-6000 atm					<input type="checkbox"/>
UHP: 9000- 10000 atm con riscaldamento	●				<input type="checkbox"/>
Aggiunta di additivi chimici		●	●	●	<input type="checkbox"/>

**Azione inibente specifica**

● **Freno aggiuntivo**



## 4. OLI ESSENZIALI

### 4.1 Introduzione

Tra le alternative più interessanti proposte dalla letteratura per il miglioramento della shelf-life dei prodotti di IV gamma vi è l'uso di oli essenziali (Abadias *et al.*, 2011, Gutierrez *et al.*, 2009). Il potere antimicrobico degli oli essenziali è conosciuto da molti anni; in particolare gli oli essenziali di *Melaleuca alternifolia.*, *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis* venivano utilizzati per il trattamento di infezioni batteriche e micotiche (Van Vuuren *et al.*, 2007).

È risaputo che da alcune piante è possibile estrarre delle miscele di sostanze organiche volatili conosciute come oli essenziali. Essi sono noti già dall'antichità e sono stati utilizzati per molteplici scopi come la cosmesi e l'alimentazione.

Nonostante la diversa composizione chimica degli oli essenziali, essi hanno in comune alcune proprietà antisettiche, antibatteriche, antifungine e antiossidanti generali.

Gli oli essenziali sono liquidi oleosi ottenuti da materiale vegetale (fiori, bulbi, foglie, semi, radici, frutti ecc.). Possono essere ottenuti in vari modi (pressione, estrazione con solventi o CO<sub>2</sub> supercritica) ma il metodo più comune è la distillazione con vapore.

Il termine "olio essenziale" fu coniato nel XVI secolo dal medico svizzero Paracelso di Hohenheim, che chiamò "*Quinta essentia*" uno dei componenti di un miscuglio estratto da una pianta. Si stima che circa 3.000 oli essenziali siano noti, di cui 300 sono commercialmente importanti per le loro innumerevoli proprietà (Burt, 2004).

Le proprietà antimicrobiche degli oli essenziali e dei loro componenti sono conosciute già da molto tempo, ma i meccanismi d'azione dei vari composti non sono ancora stati studiati nel dettaglio (Lambert *et al.*, 2001, 2004). Considerato l'alto numero di composti chimici presenti negli oli essenziali è presumibile che la loro attività antimicrobica non sia attribuibile ad uno specifico meccanismo, ma piuttosto ad una serie di azioni che si combinano e si amplificano per effetto di molecole che agiscono in sinergia.

## 4.2 Caratteristiche chimico-fisiche degli oli essenziali

Un composto o un metabolita cellulare può essere definito volatile se si trova alle condizioni normali in forma gassosa o se possiede una elevata pressione di vapore alle condizioni in cui viene usualmente liberato dalla cellula.

Molti composti la cui pressione di vapore non può definirsi elevata, hanno tuttavia un forte impatto organolettico. Queste molecole, definite aromi o composti aromatici, spesso sono stati identificati come componenti degli oli essenziali di piante aromatiche e di estratti usati nella produzione alimentare. Originariamente sono state utilizzate per esaltarne l'aroma, tuttavia spezie ed erbe possono portare ad un prolungamento della shelf-life grazie alla loro capacità antimicrobica. Infatti, alcune di queste sostanze aromatiche svolgono un ruolo chiave nei meccanismi di auto difesa di molte piante contro organismi estranei.

Nonostante la composizione chimica degli oli essenziali sia molto complessa, è possibile riunire i componenti in alcuni gruppi fondamentali sulla base degli elementi presenti nei composti (Pedretti, 2003):

### δ Composti contenenti carbonio e idrogeno

- idrocarburi monoterprenici (C10) alifatici e aromatici insaturi mono e biciclici: limonene, mircene, pinene, canfene, terpinene, sabinene, fellandrene, silverstrene.
- idrocarburi sesquiterprenici (C15): cardinene, selinene, umulene, cariofillene, cedrene.
- azuleni: camazulene, eucazulene, gajazulene, vetivazulene.
- idrocarburi diterprenici (C20): canforene, cupressene.

### δ Composti contenenti carbonio, idrogeno e ossigeno

- alcoli: geraniolo, linalolo, terpineolo, mentolo, nerolo, citronello, borneolo, mirtenolo, santalolo, farnesolo.
- aldeidi: aldeide cinnamica, aldeide benzoica, aldeide anisica, vanillina, citrale, citronellale.
- chetoni: carvone, tujone, canfora, mentone, fencone, pulegone.



- eteri: eucaliptolo, safrolo, estragolo, anetolo, apiolo.
  - esteri: acetato di linalile, salicilato di metile, acetato di geranile, acetato di bornile, benzoato di benzile, acetato di terpenili.
  - acidi organici: acido benzoico, acido cinnamico, acido salicilico, acido cuminico.
  - perossidi: ascaridolo
  - fenoli: timolo, eugenolo, carvacrolo. I composti fenolici comprendono i flavonoidi, i tannini, le lignine e l'acido salicilico. Il termine fenolici comprende un'ampia gamma di composti, i quali hanno tutti un gruppo ossidrilico legato ad un anello aromatico. Essi sono presenti in quasi tutte le piante e si possono accumulare in tutte le loro parti (Raven *et al.*, 2002).
- δ Composti contenenti carbonio, idrogeno, ossigeno, azoto e zolfo
- derivati solfocianici e solforati (Pedretti, 2003).

Dal punto di vista delle proprietà fisiche, in generale si può affermare che all'aumentare del numero di atomi di carbonio della struttura e del peso molecolare, la solubilità in acqua della molecola diminuisce; mentre aumenta quella nei solventi meno polari e nei lipidi.

Le caratteristiche di idrofilia e lipofilia sono molto importanti ai fini dell'attività biologica dei composti organici volatili; la solubilità nei grassi consente alle sostanze volatili di solubilizzarsi nelle membrane citoplasmatiche e nelle cuticole cerose.

Caratteristica di estrema importanza di queste sostanze è la volatilità, cioè la tendenza delle molecole a passare dalla fase liquida alla fase di vapore. È importante conoscere la volatilità non tanto del composto puro quanto delle sue soluzioni acquose. La volatilità è descritta dal coefficiente di partizione.

L'aggiunta di soluti come sali e/o zuccheri può cambiare notevolmente la volatilità del composto aromatico dissolto. L'attività biologica (bioattività) delle sostanze aromatiche vegetali, che generalmente si esprime come inibizione o stimolazione di processi metabolici, è estremamente correlate alla loro volatilità. Gli organismi produttori di composti aromatici, per le caratteristiche di volatilità di questi ultimi, sarebbero in grado di entrare in relazione a distanza con altri microrganismi, senza la

necessità di intermediari e con un più ampio raggio di inattivazione. La via gassosa assicurerebbe anche un minor grado di inattivazione (per solvatazione, adsorbimento ed idrolisi) dei composti prodotti (Hutchison, 1971).

Altra caratteristica peculiare dei composti organici volatili, è quella di manifestare la propria attività a concentrazioni molto più basse di quelle che potrebbero avere un pronunciato effetto nutritivo.

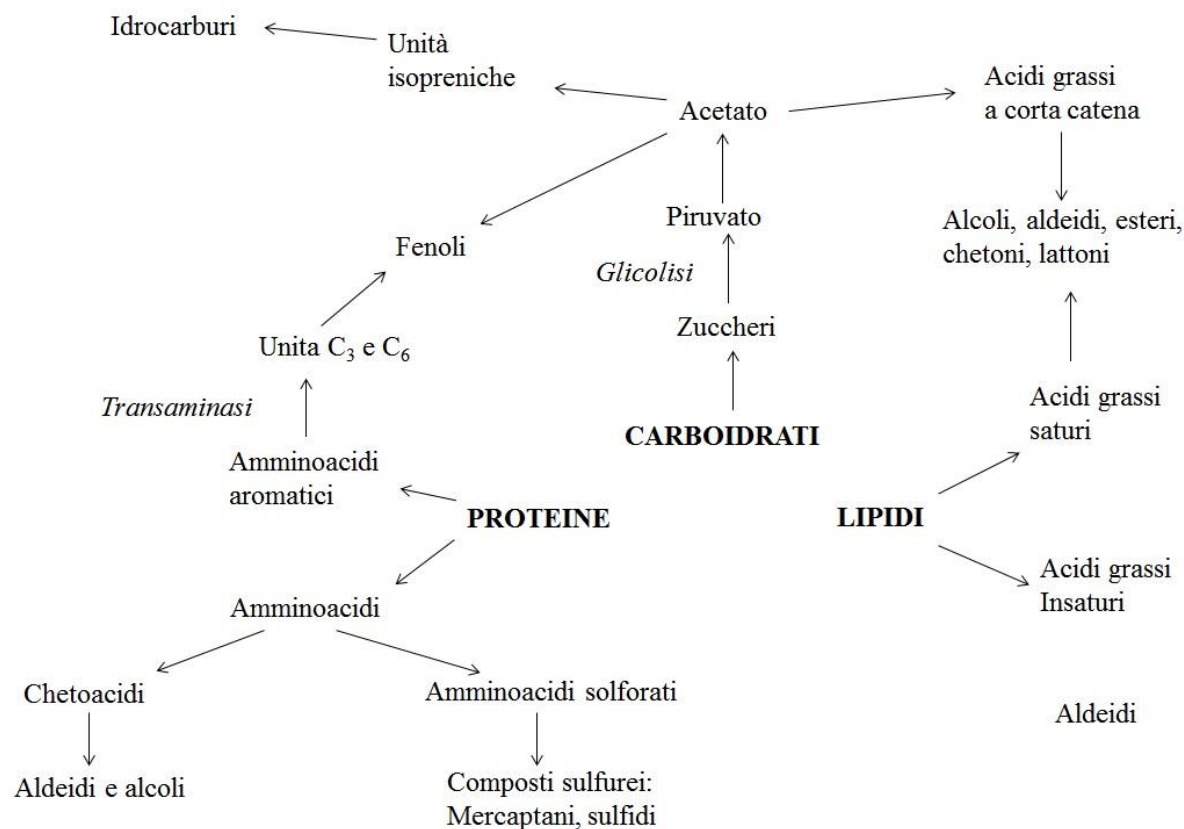
### ***4.3 Meccanismo di formazione dei composti volatili***

Le aldeidi volatili e gli alcoli sono importanti composti che contribuiscono al caratteristico aroma di frutti, dei vegetali e delle piante.

Le formazione per via enzimatica di questi composti, a partire da acidi grassi insaturi, e il ruolo della lipossigenasi (LOX) e dell'idrossidoliasi è nota da molto tempo. Nei tessuti vegetali, infatti, la via della LOX e dell'idrossiliasi converte l'acido linoleico e l'acido linolenico in esanale e in *cis*-3-esenale.

L'esanale può poi essere ridotto nell'alcool corrispondente, l'esanolo, grazie all'azione dell'alcool-ossidoreduttasi; mentre il *cis*-3-esenale è normalmente isomerizzato a *trans*-2-esenale, sia per via enzimatica sia per via non enzimatica, come riportato in figura (Hatanaka, 1993). La composizione quali-quantitativa dei composti volatili è influenzata dalla quantità e dal grado di insaturazione degli acidi grassi insaturi presenti nei tessuti, dall'attività della LOX e dal pH.

Nella figura 4.1 viene rappresentato lo schema di sviluppo delle suddette molecole.



**Figura 4.1** - Schema riassuntivo dello sviluppo degli aromi nei vegetali.

#### 4.4 Composizione chimica degli oli essenziali

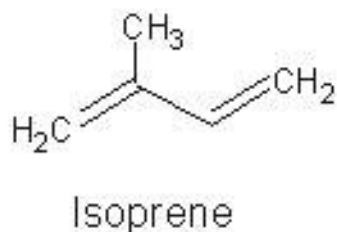
I componenti degli oli essenziali, o meglio delle essenze, sono metaboliti secondari della pianta, cioè sono prodotti del metabolismo che non partecipano direttamente alla crescita e allo sviluppo dell'organismo (Raven *et al.*, 2002).

Ogni tipo di olio essenziale ha la sua specifica composizione chimica che varia non solo in base alla specie di pianta da cui l'olio è stato estratto ma in base alle caratteristiche specifiche della pianta da cui l'olio è stato estratto (Pedretti, 2002).

I principali costituenti chimici degli oli sono rappresentati da terpeni che sono idrocarburi con formula generale  $(C_5H_8)_n$ .

Essi sono biomolecole costituite da multipli dell'unità isoprenica (sono chiamati anche isoprenoidi), e possono essere lineari, ciclici o entrambi. Essi rappresentano la classe più abbondante di metaboliti secondari, in quanto comprendono più di 22000 composti descritti (Raven *et al.*, 2002). Ogni unità isoprenica (figura 4.2) è costituita da cinque

atomi di carbonio, e viene legata ad altre unità isopreniche in diversi modi. Le varie unità che costituiscono i terpeni possono essere modificate e contenere elementi diversi da carbonio e idrogeno (Hart *et al.*, 2008).



**Figura 4.2** - Struttura dell'unità isoprenica

I terpeni vengono sintetizzati dalla pianta, a partire da acetato, attraverso un intermedio molto importante, il pirofosfato di isoprenile (Hart *et al.*, 2007).

Essendo il più ampio gruppo di sostanze naturali vegetali, i terpeni nelle piante, sono coinvolti in un'ampia varietà di processi, dalla fotosintesi e dalla crescita, alla riproduzione e alla difesa (Hart *et al.*, 2007). Una singola pianta può sintetizzare molti differenti terpenoidi, in tempi differenti durante il suo sviluppo e localizzati in parti diverse della pianta (Raven *et al.*, 2002). I terpeni vegetali non solo giocano un ruolo fondamentale nelle piante, ma sono anche impiegati come aromi, fragranze e medicinali (Raven *et al.*, 2002). Come riportato in tabelle 4.1 i terpeni vengono classificati in base al numero di sub-unità (unità isopreniche) contenute nella loro struttura (Hart *et al.*, 2007).

Classificazione	Unità isopreniche	Atomi di carbonio
Emiterpeni	1	5
Monoterpeni	2	10
Sesquiterpeni	3	15
Diterpeni	4	20
Sesteterpeni	5	25
Triterpeni	6	30
Tetraterpeni	8	40

**Tabella 4.1** - Classificazione dei terpeni.

Gli oli essenziali contengono in prevalenza monoterpeni e sesquiterpeni che non hanno un peso molecolare alto e proprio per questo a temperatura ambiente sono liquidi. Sono esempi di terpeni il geraniolo, il mentolo, la canfora, il limonene e il pinene.

Oltre ai terpeni, tra i componenti degli oli essenziali vi sono anche i fenoli o altri idrocarburi ossigenati. Talvolta sono presenti anche acidi, lattoni (composti chimici la cui struttura è costituita da un estere ciclico) e composti contenenti zolfo o azoto (Pedretti, 2003).

La tipologia e la quantità dei componenti dell'olio essenziale ne determinano e ne caratterizzano le proprietà. La varietà e la ricchezza dei composti contribuisce alle caratteristiche peculiari di ciascun olio (Burt, 2004). In alcuni oli essenziali può predominare un solo costituente, in altri non c'è un singolo componente che prevale, ma un equilibrio di vari composti. Anche i componenti presenti in minime tracce possono influenzare in modo preponderante l'attività biologica dell'olio essenziale stesso (Pedretti, 2003).

Dato che i componenti degli oli essenziali sono metaboliti secondari la composizione chimica dell'essenza subisce una forte influenza dell'ambiente esterno (Burt, 2004; Lanciotti *et al.*, 2004). La composizione di un'essenza è influenzata dal clima e in particolare dalla stagionalità (Burt, 2004; van Vuuren *et al.*, 2007). Altri parametri importanti che influiscono sulla composizione delle essenze sono l'area geografica dove è cresciuta la pianta, l'altitudine (Rota *et al.*, 2007), il tipo di terreno, la presenza di differenti quantità d'acqua, la pendenza del terreno, le modalità di coltivazione e, fattore molto importante, la durata della foto esposizione (esposizione alla luce del sole) infatti, la formazione delle essenze è strettamente legata all'azione della luce e del calore del sole (Burt, 2004).

#### ***4.5 Attività antibatterica degli oli essenziali***

Prerequisito essenziale per l'attività antimicrobica, è il raggiungimento delle cellule target e la solubilizzazione delle molecole nella membrana cellulare. Le sostanze presenti negli oli essenziali hanno natura idrofoba; tuttavia le condizioni tese

ad incrementare l'idrofobicità e ad aumentarne la tensione di vapore ne potenziano la bioattività.

Generalmente gli oli essenziali che presentano una maggior attività antimicrobica contengono un'elevata percentuale di componenti fenoliche, come carvacrolo, timolo ed eugenolo; ne sono esempio l'origano ed il timo (Gutierrez *et al.*, 2009).

I numerosi processi e le sostanze impiegate come agenti antimicrobici possono manifestare la loro attività in uno dei vari modi. I microrganismi vengono infatti inibiti o uccisi secondo un processo letale che inizia in uno specifico sito d'azione e una volta che è stato imposto il processo letale iniziale si instaura un effetto "domino" che può portare alla morte del microbo.

Si possono individuare le seguenti modalità d'azione antimicrobica:

- *Danneggiamento della parete cellulare*

La parete cellulare è una struttura importante, in quanto fornisce protezione e partecipa ad alcuni processi fisiologici della cellula. Alcuni agenti possono inibire la formazione del materiale della parete cellulare dei batteri, con la risultante formazione di una struttura suscettibile a lisi e quindi a morte cellulare.

- *Alterazione della permeabilità cellulare*

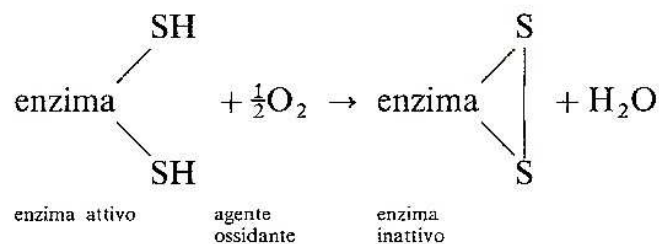
La membrana citoplasmatica preserva l'integrità dei costituenti cellulari e assicura il trasporto selettivo delle sostanze nutritive nella cellula. Un danno a questa membrana può avere come effetto l'inibizione dell'accrescimento o la morte della cellula. L'attività antimicrobica dei composti fenolici è attribuibile al loro effetto sulla permeabilità cellulare. Queste sostanze infatti hanno la capacità di annullare la permeabilità selettiva della membrana, permettendo la fuga dei costituenti cellulari. L'azione battericida di questi agenti può essere correlata con la fuga di azoto e fosforo dalla cellula. Nella membrana batterica risiedono parecchi enzimi e quindi un'alterazione della membrana può influenzare negativamente il funzionamento di questi enzimi.

- *Alterazione delle proteine e degli acidi nucleici*

La sopravvivenza di una cellula è associata alla conservazione delle proteine e degli acidi nucleici. Una condizione o una sostanza che alteri queste molecole, cioè denaturi proteine o acidi nucleici, può danneggiare irreversibilmente la cellula. Temperature elevate provocano ad esempio una denaturazione di questi costituenti cellulari.

- *Inibizione dell'azione enzimatica*

Ciascuno dei numerosi enzimi presenti nella cellula rappresenta un potenziale bersaglio per un inibitore. L'inibizione delle reazioni che forniscono energia (ATP) risulta particolarmente dannosa. Alcuni agenti sono in grado di danneggiare i costituenti cellulari in misura tale che essi non sono più in grado di svolgere le normali funzioni metaboliche. Per esempio, l'attività di molti enzimi dipende da uno dei loro componenti, il gruppo solfidrilico. Un agente ossidante può alterare questo gruppo e inattivare gli enzimi (figura 4.3).



**Figura 4.3** - Disattivazione di un enzima tramite un agente ossidante

- *Antimetaboliti*

Esistono alcuni casi di inibizione il cui danno iniziale è un'interferenza in una biosintesi specifica. Molti composti essenziali per il metabolismo microbico possono essere bloccati da composti strutturalmente simili al metabolita naturale, ma lievemente diverso da esso. Tali sostanze vengono chiamate antimetaboliti.

- *Inibizione della sintesi degli acidi nucleici*

Certe sostanze chimiche sono potenti inibitori della sintesi dell'RNA e del DNA. Due

categorie di sostanze inibiscono la sintesi degli acidi nucleici: i composti che interferiscono con la formazione delle unità costitutive degli acidi nucleici, e cioè delle basi azotate, e i composti che interferiscono con la polimerizzazione dei nucleotidi in acidi nucleici. Il ruolo fondamentale del DNA e del RNA nella cellula suggerisce che qualunque interferenza con la loro formazione e funzione danneggia gravemente la cellula.

Una caratteristica importante dei componenti degli oli essenziali è la loro idrofobicità, che gli permette di penetrare nella membrana cellulare incrementandone la permeabilità. Questo può provocare la fuoriuscita di ioni e di molecole dalla cellula e causarne la morte (Burt *et al.*, 2003).

Studi condotti su ceppi di *E. coli* e *Salmonella typhimurium* hanno dimostrato che carvacolo e timolo provocano la disintegrazione della membrana cellulare in seguito all'aumento della fluidità del doppio strato lipidico e alla fuoriuscita dalla cellula di protoni e ioni potassio, con un conseguente crollo del potenziale di membrana e l'inibizione della sintesi di ATP.

I componenti degli oli essenziali possono interagire anche con le proteine inserite nella membrana citoplasmatica. Sono stati ipotizzati due possibili meccanismi d'azione: le molecole idrofobiche degli oli possono inserirsi nel doppio strato lipidico e distorcere la membrana, oppure possono verificarsi interazioni fra le molecole lipofile e la parte idrofobica delle proteine di membrana destabilizzandole (Burt *et al.*, 2004; Lanciotti *et al.*, 2004).

Alcuni studi hanno dimostrato che l'olio essenziale "intero" presenta una maggiore attività antimicrobica rispetto alle singole componenti, suggerendo che i vari composti agiscono in sinergia potenziando la loro attività. Ai composti principali è stata attribuita la massima azione microbica, ciò nonostante i componenti minoritari appaiono importanti per potenziare la loro attività.

Ad esempio, i due componenti principali dell'olio essenziale di origano, carvacolo e timolo, hanno mostrato un effetto sinergico contro *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.



Studi condotti su ceppi di *B. cereus* hanno mostrato il sinergismo tra carvacrolo e *p*-cimene, e, pare che quest'ultimo, di per se antibatterico molto debole, determini il rigonfiamento delle membrane cellulari in maggior misura rispetto al carvacrolo; questo meccanismo permetterebbe al carvacrolo di essere trasportato con maggior facilità all'interno della cellula (Burt *et al*, 2004).

Moleyar e Narasimham (1992) hanno valutato l'attività dell'eugenolo e della cinnamaldeide riscontrando che i singoli componenti non inibivano la crescita di *Staphylococcus* spp., *Bacillus* ssp., *Micrococcus* ssp. e *Enterobacter* ssp., mentre una miscela di cinnamaldeide ed eugenolo a 250 e 500 µg/ml rispettivamente, aveva inibito la crescita dei ceppi sopra menzionati.



## *Obiettivi*



La mia sperimentazione si inserisce in un progetto di respiro nazionale- “**AGER-STAY FRESH**”- volto a trovare soluzioni di lavaggio alternative al cloro per il prolungamento della *shelf-life* delle produzioni di IV gamma. Questi prodotti rappresentano, attualmente, uno dei più promettenti ed innovativi comparti del settore ortofrutticolo e sono definiti, secondo le norme della Comunità Europea, prodotti minimamente trasformati, cioè soggetti a interventi tecnologici ridotti, ed utilizzabili per il consumo diretto senza ulteriori manipolazioni, o con manipolazioni minime. La loro espansione sul mercato deriva dal fatto che sono in grado di offrire alta convenienza, alto valore nutrizionale ed organolettico e sono concepiti dai consumatori come prodotti “genuini” in quanto a base vegetale e, generalmente, non contengono sostanze antimicrobiche. Tuttavia, le materie prime vegetali utilizzate per le produzioni di IV gamma sono spesso caratterizzate da elevate contaminazioni microbiche (4-6 log UFC/g) poiché, durante la crescita o il post-raccolta, frutti o vegetali vengono a contatto con il suolo, insetti o contaminazioni di origine umana (Shewfelt, 1987; Beuchat, 1998; Abadias *et al.*, 2011). Anche le successive operazioni di pelatura, taglio e mondatura, seppur eseguite a livello industriale, possono favorire il trasferimento di cellule microbiche presenti sulla buccia alla polpa del frutto e promuovere quindi una ulteriore proliferazione microbica (Nguyen e Carlin, 1994; Lanciotti *et al.*, 2003; Rojas-Grau *et al.*, 2007). I dati della letteratura hanno evidenziato, infatti, la presenza di patogeni quali *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sia in frutta e vegetali freschi che sulle preparazioni di IV gamma derivate (Beuchat, 1998; Conway *et al.*, 2000; Gunes e Hotchkiss, 2002; Abadias *et al.*, 2006; Alegre *et al.*, 2010). D'altra parte proprio alcuni vegetali freschi e prodotti minimamente trattati a base vegetale sono stati legati a casi di tossinfezioni alimentari causate da *E. coli*O157:H7, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* (Powell e Luedtke, 2000; Harris *et al.*, 2003; Abadias *et al.*, 2011). Al momento la *shelf-life* e la sicurezza d'uso di questa categoria di prodotti sono basate principalmente sul mantenimento della catena del freddo unitamente alla fase di lavaggio delle materie prime con sostanze clorate (Lanciotti *et al.*, 2004). Recentemente, però, alcuni autori hanno evidenziato alcuni svantaggi derivanti da questa fase di processo come la formazione

di composti clorati cancerogeni (Gutierrez *et al.*, 2009). Pertanto, in questo ultimo decennio è aumentata, da parte dei consumatori, la richiesta di prodotti sicuri e sottoposti a trattamenti o conservanti di origine “naturale”. In questo scenario, l’utilizzo di oli essenziali o composti naturali, utilizzati come agenti preservanti, ha trovato grande spazio e consenso poiché concepiti come GRAS (Generally Recognized As Safe) e in grado di esplicare un’ ampia attività antimicrobica contro agenti patogeni e degradativi associati ai prodotti di IV gamma (Lanciotti *et al.*, 2004; Gutierrez *et al.*, 2009, Abadias *et al.*, 2011). Inoltre, sono in grado di impartire buone caratteristiche organolettiche (Utama *et al.*, 2002) e contribuire quindi al flavour dei composti a base vegetale, aumentandone la qualità e la sicurezza (Beuchat, 1998; Allende *et al.*, 2008; López-Gálvez *et al.*, 2009; Gutierrez *et al.*, 2009; Vandekinderen *et al.*, 2009; de Azeredo *et al.*, 2011). Tra gli oli essenziali utilizzabili per i prodotti di IV gamma a base mela, gli oli agrumari sono stati ampiamente studiati (Tassou *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2001; Caccioni *et al.*, 1998; Belletti *et al.*, 2004; McNeil *et al.*, 2011; Fisher e Phillips 2008; Sagdic *et al.*, 2013) al fine di comprendere quale frazione esplicasse una maggiore attività antimicrobica. Tra queste, il citrale (3,7-dimetil-2-7-octadienale), un’aldeide  $\alpha,\beta$ -insatura, composta dai due isomeri, nerale e geraniale, è stata riconosciuta come ampiamente presente negli oli di derivazione agrumaria e dotata di un’ampia attività antimicrobica (Hayese Markovic 2002; Wuryatmo *et al.*, 2003). Belletti *et al.* (2008) hanno dimostrato che concentrazioni appropriate di citrale e di olio di cedro, compatibili con le caratteristiche organolettiche dei prodotti sperimentati, erano in grado di aumentare la *shelf-life* e sicurezza di macedonie di frutta quando utilizzati nel liquido di governo.

Anche l’attività antimicrobica di esanale e *trans*-2-esenale, aldeidi compatibili con l’aroma di molti frutti e vegetali, è stata ampiamente provata sia in sistemi modello che reali (Lanciotti *et al.*, 1999, 2003, 2004; Corbo *et al.*, 2000). Infatti esanale, *trans*-2-esenale ed esil-acetato sono stati in grado di prolungare significativamente la *shelf-life* di prodotti a base mela non addizionati di liquido di governo (Lanciotti *et al.*, 2004; Serrano *et al.*, 2008).

In questa prospettiva, il principale obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di valutare gli effetti di olio essenziale di cedro e alcuni composti bioattivi degli oli

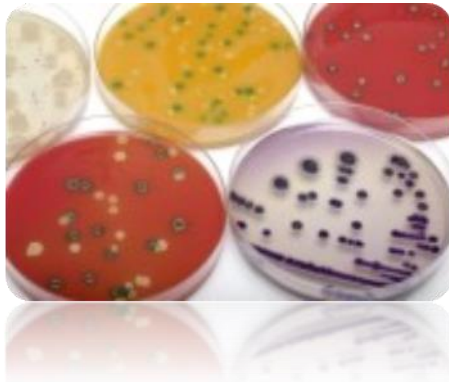
essenziali (citrale, esanale, *trans*-2-esenale e carvacrolo), utilizzati singolarmente o in combinazione, sulla *shelf-life* di mele affettate di IV gamma. In particolare, gli antimicrobici naturali sono stati utilizzati in fase di dipping. I prodotti così trattati, confezionati in atmosfera ordinaria e stoccati a 6° C sono stati comparati con i loro controlli (mele trattate unicamente con dipping in acido citrico e ascorbico). Su tutti i prodotti sono state eseguite analisi microbiologiche, di texture e colore. Inoltre il profilo in molecole volatili dello spazio di testa ed il profilo mediante naso elettronico sono stati rilevati nei prodotti immediatamente dopo confezionamento, dopo tre e dieci giorni di stoccaggio.

Un ulteriore obiettivo di questo lavoro sperimentale è stato quello di ottimizzare alcuni parametri di processo come la riduzione del rapporto acqua di lavaggio/prodotto ed incrementare la temperatura dell'acqua utilizzata al fine di meglio solubilizzare gli antimicrobici in fase di dipping. Inoltre, in fase di confezionamento, l'atmosfera ordinaria è stata sostituita da una atmosfera composta dal 7% di O<sub>2</sub> e il restante azoto. Tali cambiamenti sono stati adottati al fine di aumentare da una parte la sostenibilità del processo e dall'altra la *shelf-life* dei prodotti a base mela trattati.





## *Materiali e Metodi*



## **6.1 Oli essenziali e molecole antimicrobiche impiegate**

In questa sperimentazione, al fine di prolungare la *shelf-life* dei prodotti di IV gamma a base mela, sono stati impiegati unitamente al dipping tradizionale l'olio essenziale di cedro e alcune molecole antimicrobiche naturali.

L'olio essenziale di cedro è stato ottenuto da Flora S.r.l. (Pisa, Italia); tutti gli altri composti (esanale, *trans*-2-esenale, citrale e carvacrolo) sono stati acquistati dalla ditta Sigma-Aldrich (Milano, Italia). L'olio essenziale di cedro e gli antimicrobici naturali impiegati sono stati scelti sia per la loro attività antimicrobica che per la loro affinità organolettica con il prodotto mela.

## **6.2 Determinazione della concentrazione minima inibente (MIC) e della concentrazione minima battericida (MBC) dell'olio essenziale di cedro e dei composti antimicrobici naturali**

Prima di utilizzare l'olio di cedro e le molecole naturali sul prodotto reale, sono state valutate le loro capacità antimicrobiche *in vitro*, utilizzando come target alcuni possibili patogeni riscontrabili in prodotti di IV gamma. Per tutti i composti è stata definita quindi la loro MIC e MBC. La MIC è stata definita come la concentrazione minima del composto in grado di impedire la crescita visibile delle cellule microbiche testate dopo 24 h (MIC 24 h) o 48 h (MIC 48 h) di incubazione. La MBC è stata definita come la concentrazione minima del composto in grado di causare la morte delle cellule microbiche testate, non rilevabili quindi in piastre di BHI agar, dopo 24 h di incubazione alla temperatura ottimale delle cellule microbiche target.

Per la determinazione dei valori di MIC, 150 µL di brodo Brain Heart Infusion (Oxoid, Ltd, Basingstoke, Hampshire, Regno Unito) sono stati inoculati a tre diverse concentrazioni (2, 4 e 6 log UFC/mL) dei patogeni testati quali *Listeria monocytogenes* Scott A, *Salmonella Enteritidis* E5, *Escherichia coli* 555, *Staphylococcus aureus* F1 e *Bacillus cereus* SV90. I patogeni appartengono tutti alla collezione del DISTAL, Università di Bologna. Per la determinazione della MIC e

MBC delle molecole oggetto di studio, è stata adottata la procedura descritta da Stirolì *et al.* (2013). Le piastre microtiter sono state incubate a 37° C e l'eventuale sviluppo microbico è stato valutato dopo 24 e 48 ore. La MBC è stata determinata prelevando, dopo 48 ore di incubazione, 10 µL di soluzione da ogni pozzetto e spatolando in piastre di BHI agar.

### ***6.3 Caratterizzazione gas-cromatografica dell'olio di cedro***

La composizione dell'olio essenziale cedro utilizzato in questo studio è stato determinato tramite l'analisi gas-cromatografica abbinata ad SPME (SOLID PHASE MICRO EXTRACTION). Questa tecnica è stata scelta perché una condizione preliminare per l'efficacia antimicrobica degli oli essenziali (OE) è il contatto tra la molecola antimicrobica e le cellule bersaglio. Il contatto è favorito se le molecole sono nel loro stato più idrofobo, cioè, nella loro fase vapore, poiché questo aumenta la loro solubilizzazione nelle membrane cellulari (Gardini *et al.*, 1997; Belletti *et al.*, 2004). Sebbene la composizione dello spazio di testa non corrisponde a tutta la composizione dell'EO, la sua conoscenza è fondamentale perché dà una misura delle molecole volatili dell'olio (Belletti *et al.*, 2004). Inoltre, la determinazione del profilo dei composti volatili è di fondamentale importanza per standardizzare la composizione in termini di molecole più efficaci e, conseguentemente, di standardizzare l'attività antimicrobica degli oli essenziali. È ben noto che il profilo che si ottiene dipende dalla varietà, dall'origine vegetale dalle modalità di estrazione e dalle pratiche agronomiche.

L'olio essenziale di cedro è stato posto in un vial da 10 ml e sigillato con settoppi politetrafluoroetilene/silicone, parafilm e chiusi con ghiera metalliche.

Sono stati preparati tre diversi campioni, i quali sono stati condizionati a 25° C per 30 minuti al fine di accelerare il raggiungimento dell'equilibrio liquido-vapore. In seguito è stata inserita nello spazio di testa una fibra di silice fusa ricoperta da una fase fissa mista di Divinbenzene-Carboxen-polidimetilsilossano VB/CARBOXEN/PMDS, 50µm, SUPELCO, Steiheim, Germania). La fibra è stata poi esposta a ciascun campione a temperatura ambiente (25° C) per 20 minuti. La fibra, su cui sono stati

precedentemente assorbiti i composti volatili, è stata inserita nel blocco di iniezione e si è dato avvio alla corsa cromatografica ed infine, le molecole adsorbite sono stati desorbiti in GC per 10 minuti.

Per la separazione dei composti volatili è stato usato un gascromatografo Agilent Hewlett-Packard 6890 abbinato ad uno spettrometro di massa detector 5970 (Hewlett-Packard, Ginevra, Svizzera). L'iniettore è stato mantenuto isotermicamente a 230° C con un programma di split. Per la separazione dei picchi è stata utilizzata una colonna capillare Varian con lunghezza di 50 m, diametro interno di 320 µm mentre la fase interna era di 1.2 µm.

La rampa di temperatura è stata la seguente: 50° C per 0 minuti seguito da un aumento a 230° C con una velocità di incremento della temperatura di 3° C/minuto; e mantenuta per 1 minuto. Il gas di trasporto usato è stato l'elio con un flusso di 1 ml/min e un rapporto di splittaggio di 30:1. La frammentazione a livello dello spettrometro di massa è avvenuta tramite impatto elettronico a 70 eV. I composti sono stati identificati confrontandone gli spettri di massa con quelli di composti puri contenuti nelle librerie NIST (NIST/EPA / NIH Mass spectral Library, Versione 1.6, Stati Uniti d'America) del 1998.

#### ***6.4 Preparazione dei prodotti di IV gamma a base mela in atmosfera ordinaria***

Le mele, varietà *Golden delicious*, sono state acquistate presso un rivenditore locale lo stesso giorno delle analisi, sono quindi state lavate con acqua corrente a 8° C per 2 minuti e poi asciugate con carta assorbente. Dopo di che, le mele sono state sbucciate e tagliate a cubetti di circa 1,5 cm<sup>3</sup>. Gli oli essenziali (OE) e gli antimicrobici naturali, testati singolarmente o in combinazione, sono stati aggiunti alla soluzione di dipping tradizionale costituita da 1% di acido citrico + 0,5% di acido ascorbico (Carlo Erba, Milano, Italia).

Sono state preparate otto diverse soluzioni di trattamento impiegando acqua corrente ad una temperatura di 13° C:

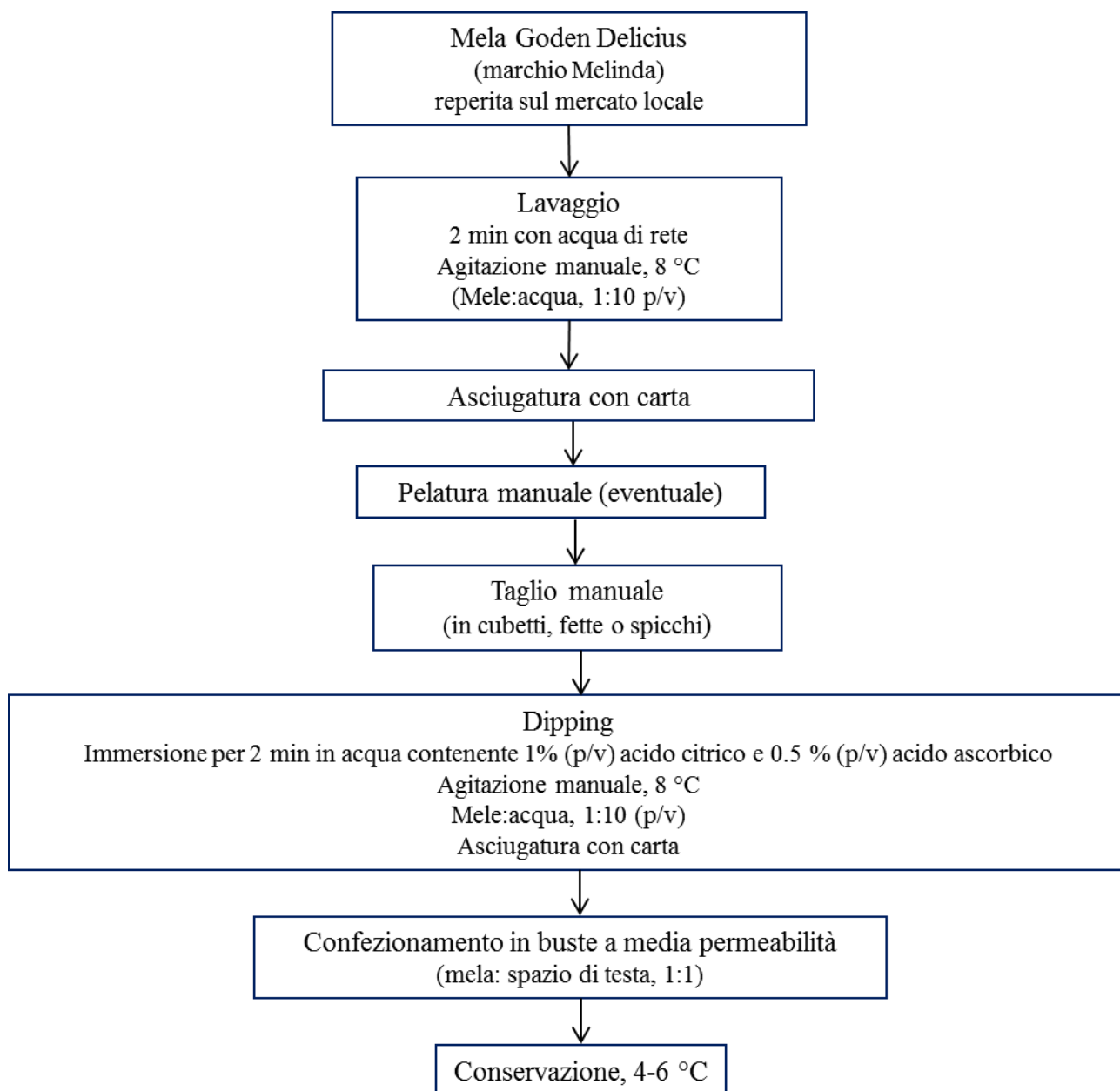
- 1) Dipping Tradizionale di Controllo (1% di acido citrico + 0,5% di acido ascorbico)
- 2) Dipping Tradizionale + citrale (250 mg/L);
- 3) Dipping Tradizionale + esanale (250 mg/L);
- 4) Dipping Tradizionale + combinazioni di citrale + esanale (125 +125 mg/L);
- 5) Dipping Tradizionale + combinazioni di citrale + *trans*-2-esenale (125 +125 mg/L);
- 6) Dipping Tradizionale + combinazioni di esanale + *trans*-2-esenale (125 +125 mg/L);
- 7) Dipping Tradizionale + combinazioni di citrale + OE di cedro (125 +125 mg/L);
- 8) Dipping Tradizionale + combinazioni di OE di cedro + carvacrolo (200 +50 mg/L ).

Gli antimicrobici naturali sono stati veicolati in acqua utilizzando etanolo 1% (v/v).

I campioni sono stati preparati previa immersione e successiva agitazione nella soluzione di trattamento per 2 minuti e con un rapporto mele/acqua di 1:10 (w/v). Dopo il trattamento, le mele sono state asciugate con carta e confezionate in sacchetti di BOPP di 50 micron di spessore con 50 g di prodotto e un rapporto mele/spazio di testa di 1:1. La permeabilità dei sacchetti utilizzati alla CO<sub>2</sub> a 22° C era di 2720 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/giorno, e la permeabilità all'O<sub>2</sub> a 22 ° C era di 970 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/giorno.

Per ogni soluzione utilizzata sono stati prodotti circa 20 unità campionarie. I campioni sono stati quindi conservati a 6° C fino al termine della shelf-life.

Nella figura sottostante è riportato il processo di lavorazione adottato.



**Figura 6.1** - Protocollo di lavorazione adottato.

I prodotti di IV gamma a base mela, ottenuti mediante diversi dipping, sono stati quindi sottoposti nel corso dello stoccaggio refrigerato ad analisi microbiologiche, di colore, di texture. Inoltre, è stata eseguita, immediatamente dopo il confezionamento e al termine della *shelf-life*, l'analisi del profilo in molecole volatili mediante GC/MS-SPME e l'analisi mediante naso elettronico.

## **6.5 Analisi microbiologiche**

Le analisi sono state eseguite immediatamente dopo i trattamenti e dopo 2, 3, 7, 10, 14 e 21 giorni di conservazione.

I campioni, posti in sacchetti sterili, sono stati addizionati di 90 ml di soluzione fisiologica sterile (9‰ di cloruro di sodio) e successivamente omogeneizzati per 3 minuti in Stomacher (modello Lab Blender Seward, London, UK). Sono state eseguite diluizioni decimali e i campionamenti sono stati effettuati per piastramento su terreni selettivi.

Durante la conservazione, l'evoluzione nel tempo di batteri lattici e dei lieviti, è stata valutata rispettivamente su Man Rogosa e Sharpe Agar (MRS, Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, Regno Unito) e Sabouraud Destrosio Agar (SAB, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Regno Unito).

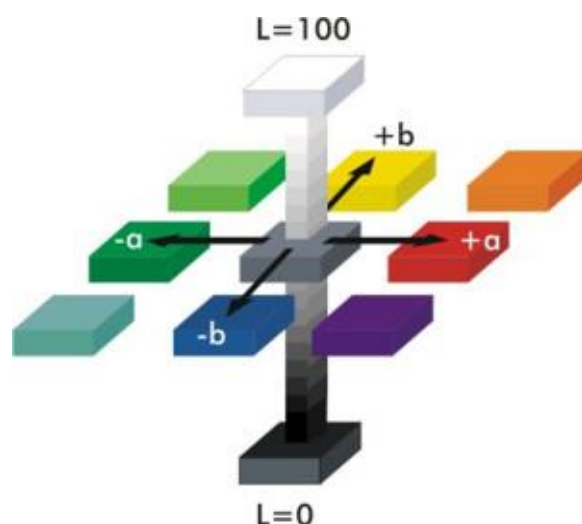
## **6.6 Analisi del colore**

L'analisi del colore delle fette di mela, è stata effettuata immediatamente dopo il trattamento e dopo 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10 giorni di conservazione.

Il colore della superficie delle mele è stato misurato utilizzando uno spettrofotocolorimetro mod. Colorflex (Hunterlab, USA). Il colore è stato misurato utilizzando la scala *CIELab* e illuminante D65.

La scala *CIELab* definisce il colore mediante tre coordinate:

1.  $L^*$  o luminosità, i cui valore va da 0 a 100;
2.  $a^*$ , che esprime il rosso quando è positiva e il verde quando è negativa;
3.  $b^*$ , che esprime il giallo quando è positiva e il blu quando è negativa.



**Figura 6.2** – Rappresentazione dello spazio di colore *CIELab*.

Lo strumento è stato precedentemente calibrato con una piastrella bianca, i cui valori di luminosità ( $L^*$ ) sono di 98.03, il valore di  $a^*$  di -0,23 ed un valore di  $b^*$  di 2,05.

I risultati sono stati espressi come  $L^*$  (luminosità) e  $a^*$  (indice rosso); valori numerici di  $a^*$   $b^*$  sono stati convertiti in tinta ( $h^\circ$ ), secondo le seguenti equazioni (McGuire, 1992):

$$h^\circ = \frac{\tan^{-1}(b^*/a^*)}{2\pi} \cdot 360$$

Per ogni tempo di campionamento sono state per ogni condizione, un'analisi di tre fette di mele, per un totale di 21 letture.

## **6.7 Analisi della texture**

L'analisi della texture è stata svolta subito dopo il trattamento e dopo 2, 4, 7, 10, 13 giorni di conservazione. La misura è stata effettuata a temperatura ambiente ( $20^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ ), dopo aver rimosso i campioni da temperatura di refrigerazione

Questa analisi si basa sulla penetrazione del materiale attraverso una sonda cilindrica con una testa piatta, conica, convessa o a stella. Viene misurata la forza necessaria alla penetrazione. Prerequisito di questo tipo di test è che le dimensioni del campione in esame siano maggiori di almeno tre volte rispetto al punzone.



È stato utilizzato un Texture Analyser TA DHI (Stable Micro System, UK) utilizzando come sonda un cilindro di acciaio inox del diametro di 6 mm ed una cella di carico da 50 kg. La velocità di discesa è stata di 0.50 mm/s ed il campione è stato penetrato per 6 mm.

I dati ottenuti sono stati espressi sia come durezza (kg) che come sforzo di taglio (kg/s).

### ***6.8 Analisi dello spazio di testa dei prodotti a base mela confezionati in atmosfera ordinaria mediante GC/MS-SPME***

I prodotti ottenuti sono stati sottoposti ad analisi dello spazio di testa mediante tecnica gas-cromatografica abbinata alla spettrometria di massa e alla tecnica di microestrazione in fase solida (SPME). Questa analisi è stata condotta immediatamente dopo confezionamento dopo tre e dieci giorni di stoccaggio. I campioni sono stati condizionati a 37° C per 30 minuti dopodichè una fibra in di silice fusa ricoperta da una fase fissa mista di Divinbenzene-Carboxen-polidimetilsilossano (DVB/CARBOXEN/PMDS, 50µm, SUPELCO, Steiheim, Germania) è stata introdotta nello spazio di testa per 30 minuti circa e fatta desorbire successivamente in colonna. Le condizioni gas-cromatografiche adottate sono quelle riportate da Patrignani *et al.*, (2013).

### ***6.9 Analisi mediante naso elettronico***

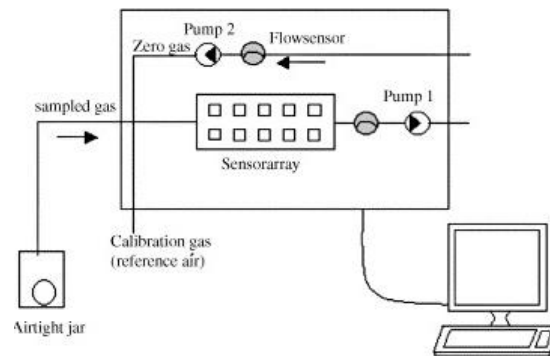
L'analisi delle sostanze volatili nello spazio di testa è stata effettuata anche utilizzando un naso elettronico portatile PEN2 (AIRSENSE Analytics, Milano, Italia).

Il naso elettronico è costituito da:

- ✚ Una matrice (array) costituita da dieci sensori MOS (Metal Oxidate Sensore) termoregolati singolarmente nel range 150-500° C;
- ✚ un sistema di campionamento;

- ✚ un sistema di acquisizione dei dati;
- ✚ un sistema di elaborazione dei dati

La figura 6.3 mostra lo schema di funzionamento del naso elettronico.



**Figura 6.3** - Rappresentazione schematica del funzionamento del naso elettronico e il flusso di gas di PEN 2.

Lo strumento incorpora due pompe: la prima che provvede alla aspirazione del campione da analizzare e all’invio dello stesso alla cella di misura dove i sensori determinano l’impronta digitale del campione. I dati acquisiti dai sensori sono poi elaborati da un personal computer e dal software WinMusterAirsense. La seconda è una pompa di aspirazione in controcorrente di aria zero per la pulizia dei sensori e della cella di misura.

Ciascuno sensore è sensibile, ma non selettivo, a diverse molecole, come è riportato nella tabella 6.1:

POSIZIONE	NOME SENSORE	DESCRIZIONE	RIFERIMENTO
1	W1C	Composti aromatici	Toluene, 10ppm
2	W5S	Molto sensibile, ampio range di sensibilità, reattivo agli ossidi di azoto, molto sensibile con segnale negativo	NO <sub>2</sub> , 1ppm
3	W3C	Composti ammoniacali, chetoni e aldeidi	Benzene, 10ppm
4	W6S	Idrogeno	H <sub>2</sub> , 100ppb
5	W5C	Alcani, composti aromatici e a bassa polarità	Propano, 1ppm
6	W1S	Composti della classe del metano	CH <sub>3</sub> , 100ppm
7	W1W	Solfuri, terpeni e composti organici solforati fortemente odorigeni (limonene, pirazine)	H <sub>2</sub> S, 1ppm
8	W2S	Alcoli e, parzialmente, ai composti aromatici	CO, 100ppm
9	W2W	Composti aromatici e composti solforati, simile al 6	H <sub>2</sub> S, 1ppm
10	W3S	Reattivo ad elevate concentrazioni di metano (> 100ppm) e a volte molto selettivo	CH <sub>3</sub> , 10-100ppm

**Tabella 6.1**– Sensori utilizzati e le loro principali applicazioni in PEN2.

Per ogni campione sono state eseguite tre repliche. Per ogni analisi, la risposta dei sensori è stata monitorata ad intervalli di 1 secondo, per un tempo complessivo di 95 secondi ad una velocità di flusso di 400 mL/min. I risultati sono espressi confrontando il segnale di ogni sensore con il livello minimo di segnale. La valutazione del segnale ha seguito il procedimento mostrato da SadoKamden *et al.* (2007), al fine di valutare quali sono i segnali più indicativi per verificare le differenze tra i diversi campioni.

I campioni sono stati preparati mettendo 5g di mele in vial da 40ml sigillati con un setto di politetrafluoroetilene (PTFE)/silicone, parafilm e chiusi con ghiere metalliche. Per ogni condizione, è stato valutato il profilo dei composti volatile immediatamente

dopo il trattamento e dopo 3 e 10 giorni di stoccaggio. Prima dell'analisi i campioni sono stati condizionati per 30 minuti ad una temperatura di 37° C.

### 6.10 Ottimizzazione del processo produttivo

Il processo produttivo è stato ottimizzato al fine di incrementare la *shelf-life* dei prodotti di quarta gamma a base mela ed aumentare l'efficacia di alcune delle fasi di processo. Sono stati quindi modificati il rapporto acqua di lavaggio/prodotto e la temperatura dell'acqua adottata ed introdotto il confezionamento in atmosfera modificata (0% CO<sub>2</sub> e 7% O<sub>2</sub>). Nella figura 6.4 sono riportate le fasi di ottimizzazioni adottate.

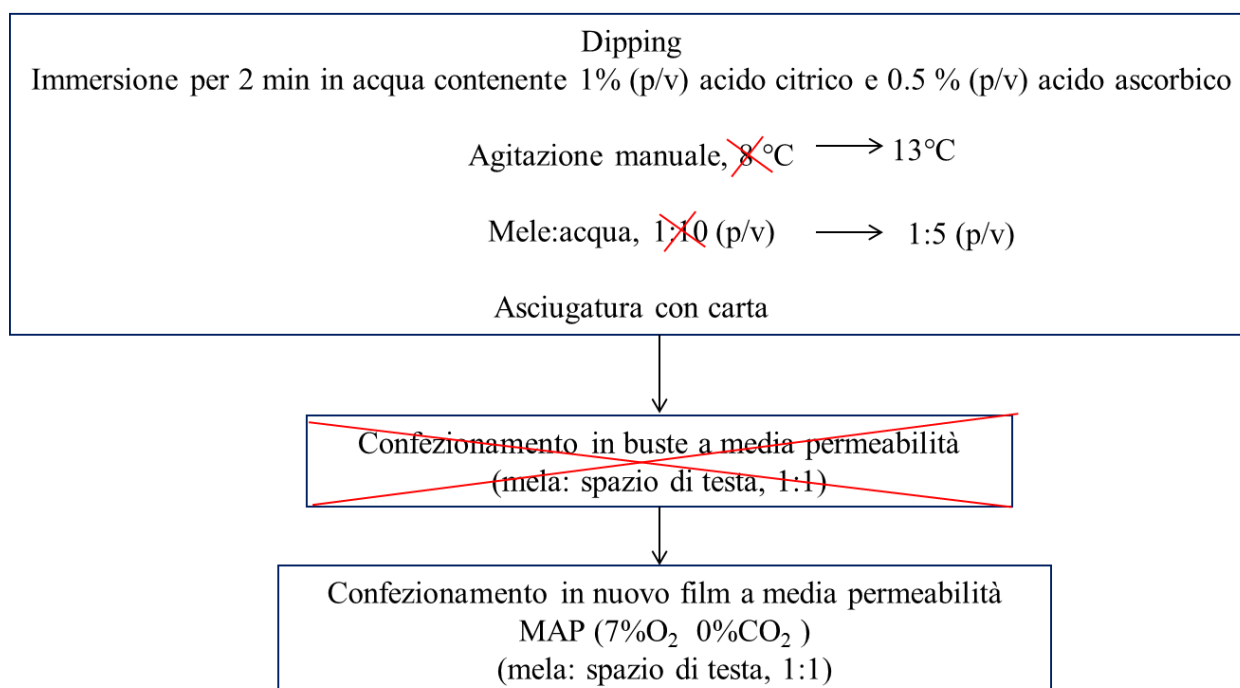


Figura 6.4- Ottimizzazione dipping e confezionamento mele.

Come precedentemente, i prodotti ottenuti sono stati sottoposti ad analisi microbiologiche, del colore e texture, dello spazio di testa mediante GC/MS-SPME e naso elettronico e all'analisi dell'evoluzione della CO<sub>2</sub>.

### ***6.11 Determinazione della CO<sub>2</sub> nello spazio di testa***

La determinazione del livello di anidride carbonica nello spazio di testa è stata utilizzata come criterio per verificare il metabolismo, e quindi della crescita dei microrganismi responsabili di deterioramento.

La valutazione è stata effettuata mediante l'impiego dell'analizzatore di gas multifunzione della Witt-Gasetechnik modello MFA III (WITT-GASETECHNIK GmbH & Co KG, Germania), subito dopo il trattamento e dopo 3, 7, 12, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 34 giorni di conservazione.

### ***6.12 Analisi statistica***

I dati di carica cellulare dei lieviti sono stati modellati secondo l'equazione di Gompertz modificata da Zwietering *et al.* (1990). La soglia di deterioramento (6 log UFC/g) può essere definito come la somma di  $k$ , corrispondente al livello iniziale di carica cellulare dopo il confezionamento, ed  $A$ , corrispondente alla massima densità cellulare.

Per ogni campione, i dati ottenuti dalle analisi svolte sono la media di tre diversi campioni ottenuti da tre esperimenti indipendenti.

I dati quantitativi ottenuti dalla determinazione dei metaboliti e dai dati del naso elettronico sono stati usati per costruire un'unica matrice, che è stato sottoposto a un doppia di analisi di raggruppamento. È stata poi ottenuta una mappa di calore, che rappresenta la visualizzazione di concentrazione dei metaboliti, in cui i valori sono rappresentati da celle colorate in base ai punteggi di  $Z$ ; dove  $Z$  rappresenta la differenza tra il valore osservato e la media, divisa la deviazione standard.

I dati ottenuti con il naso elettronico sono stati analizzati con la tecnica PCA (Principal Component Analysis). Questa analisi è finalizzata ad estrarre la massima informazione possibile contenuta in una struttura di dati multivariati, sintetizzandola in poche combinazioni lineari delle variabili stesse.



## *Risultati*





## 7.1 Caratterizzazione dell'olio essenziale di cedro mediante gascromatografia abbinata alla tecnica SPME (Solid Phase Micro Extraction)

L'olio essenziale di cedro è caratterizzato dalla presenza di alte percentuali di monoterpeni (come si nota nella figura 7.1 dove sono ben visibili i picchi), quali di limonene (35,75%),  $\beta$ -pinene (11,03%),  $\gamma$ -terpinene (20,14%),  $p$ -cimene (11,46%) e  $\alpha$ -pinene (3,06%) e monoterpeni ossigenati come linalolo (1,21%), nerale (2,69%) e geraniale (3,94%). È ben noto che molti di questi terpeni hanno attività antimicrobica (Dorman e Deans 2000; Belletti *et al.*, 2004). In realtà, tali molecole possono interagire con alcune strutture cellulari causando l'inibizione della crescita cellulare o la morte cellulare. I dati ottenuti sono in accordo con quelli di Belletti *et al.* (2004). D'altra parte, è noto che la frazione volatile degli oli essenziali di agrumi è una miscela di monoterpeni, sesquiterpeni e loro derivati ossigenati, aldeidi (compreso il citrale), chetoni, acidi, alcoli ed esteri (Flamini *et al.*, 2007).

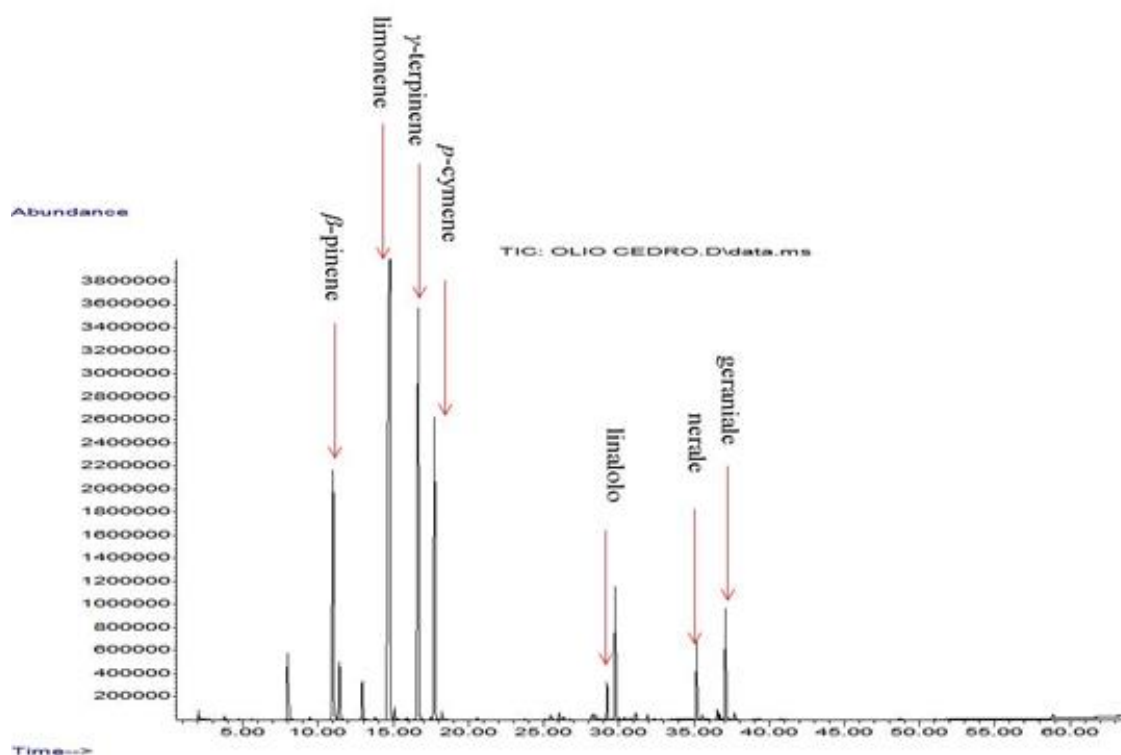


Figura 7.1 - Cromatogramma relativo all'olio essenziale di cedro ottenuto mediante tecnica GC/MS-SPME.

<b>Molecole identificate</b>	<b>Area totale</b>	<b>Area %</b>
<b><math>\alpha</math>-pinene</b>	38112402	3.06
<b>Canfene</b>	757129	0.06
<b><math>\beta</math>-pinene</b>	137322834	11.03
<b><math>\beta</math>-fellandrene</b>	26026228	2.09
<b><math>\beta</math>-miricene</b>	17285238	1.39
<b><math>\alpha</math>-fellandrene</b>	125001	0.01
<b><math>\alpha</math>-terpinene</b>	689537	0.06
<b>Limonene</b>	445232682	35.75
<b><math>\beta</math>-tuiene</b>	4555454	0.37
<b><math>\beta</math>-trans-ocimene</b>	648384	0.05
<b><math>\gamma</math>-terpinene</b>	250747986	20.14
<b>3,8-p-mentadiene</b>	725860	0.06
<b><math>\rho</math>-cimene</b>	142735387	11.46
<b>Terpinolene</b>	3488583	0.28
<b>Ossido di limonene</b>	3018628	0.24
<b>Linalolo</b>	15086745	1.21
<b>Cis-<math>\beta</math>-terpineolo</b>	166768	0.01
<b>Linalil propionato</b>	58324455	4.68
<b><math>\alpha</math>-bergamotene</b>	3107911	0.25
<b>Cariofillene</b>	2233647	0.18
<b>Citronellile buttirato</b>	305439	0.02
<b>Nerale</b>	33540693	2.69
<b>Terpineolo</b>	1702439	0.14
<b>Nerolo acetato</b>	3627589	0.29
<b><math>\beta</math>-bisabolene</b>	1823835	0.15
<b>Geraniale</b>	49016281	3.94
<b>Geraniale acetato</b>	2791492	0.22

**Tabella 7.1** - Composizione dell'olio essenziale di cedro determinata mediante gas-cromatografia abbinata alla spettrometria di massa e alla micro-estrazione in fase solida.

## ***7.2 Valutazione della concentrazione minima inibente (MIC) e della concentrazione minima battericida (MBC) delle molecole antimicrobiche testate***

In questo lavoro di tesi, sono state valutate le MIC e le MBC di citrale, esanale, *trans-2-esenale* nonché dell'olio essenziale di cedro nei confronti di *Listeria monocytogenes* Scott A, *Escherichia coli* 555, *Salmonella Enteritidis* E5, *Staphylococcus aureus* F1 e *Bacillus cereus* SV 90, utilizzati a tre diversi livelli di inoculo (2, 4 e 6 log UFC/mL).

Sono state evidenziate notevoli differenze tra la MIC e la MBC in relazione alla sostanza aggiunta, alla specie e al livello di inoculo preso in considerazione. In particolare, l'olio di cedro ha mostrato la più bassa attività antimicrobica rispetto alle altre molecole studiate. Infatti, come è evidente dalle tabelle 7.3 e 7.5, l'olio essenziale di cedro ha fatto rilevare i valori di MIC e MCB superiori a 1000 mg/L, indipendentemente dal microrganismo e dal livello di inoculo, con l'unica eccezione nei confronti di *L. monocytogenes* e *S. aureus* inoculati entrambi a livelli di  $10^2$ UFC/mL e dopo 24 ore di incubazione (MIC 24h). In queste condizioni i valori di MIC sono stati più bassi e rispettivamente di 500 e 800 mg/L. Anche Belletti *et al.* (2008) avevano osservato una riduzione dell'efficacia di questo olio essenziale verso i batteri *Gram*-negativi, deliberatamente inoculati in macedonie di frutta in liquido di governo, quando impiegato a concentrazioni comprese fra 300 e 600 mg/L mentre si era dimostrato molto più efficace nei confronti di batteri *Gram*-positivi quali *Listeria monocytogenes*.

Il citrale ha evidenziato una bassa efficacia antimicrobica contro le specie *Gram*-negative, essendo i valori di MIC sempre superiori a 1500 mg/L, indipendentemente dal livello di inoculo considerato. Al contrario, le specie *Gram*-positive hanno mostrato valori di MIC compresi tra 250 e 700 mg/L in relazione al livello iniziale di inoculo. L'effetto del livello di inoculo è particolarmente evidente per *B. cereus* e *S. aureus*, la cui MIC diminuisce da 700 mg/L con inoculo di  $10^6$ UFC/mL, a 250 mg/L con inoculo di  $10^2$ ; mentre la MBC da 550 mg/L con inoculo di  $10^6$  UFC/mL, fino a valori di 300 mg/L con inoculo di  $10^2$ UFC/mL. Le concentrazioni

necessarie per ottenere le MIC e MBC a carichi cellulari maggiori in questi caso sono raddoppiate rispetto a quelli necessari per raggiungere lo stesso risultato a livello di carica inferiore.

L'influenza dell'inoculo iniziale sulla MIC e MBC sono evidenti anche in presenza di *esanale* e *trans-2-esenale*. Queste molecole hanno mostrato la più alta efficacia contro *Escherichia coli* e, in minor misura, contro *Salmonella enteritidis*, mentre erano abbastanza inefficaci contro gli altri microrganismi testati. La diversa risposta tra batteri *Gram-positivi* e *Gram-negativi* agli oli essenziali o a loro componenti è già riportata in letteratura. Infatti i batteri *Gram-negativi* sono generalmente più resistenti grazie alla presenza di una membrana esterna allo strato peptidoglicanico della parete, che agisce come barriera nei confronti di macromolecole e sostanze idrofobe (Helander *et al.*, 1997), nonché per l'elevato contenuto di acidi grassi ciclopropanici nella membrana citoplasmatica (Chang e Cronan, 1999). Le molecole con basso peso molecolare ma abbastanza idrofile sono favorite nell'attraversare questa barriera tipica dei batteri *Gram-negativi* (Helander *et al.*, 1997; Lanciotti *et al.*, 2003).

	<i>Listeria monocytogenes</i>								
<b>Carica cellulare</b>	6 log cfu mL <sup>-1</sup>	6 log cfu mL <sup>-1</sup>	6 log cfu mL <sup>-1</sup>	4 log cfu mL <sup>-1</sup>	4 log cfu mL <sup>-1</sup>	4 log cfu mL <sup>-1</sup>	2 log cfu mL <sup>-1</sup>	2 log cfu mL <sup>-1</sup>	2 log cfu mL <sup>-1</sup>
<b>MIC/MBC</b>	MIC 24h (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 48h (mg L <sup>-1</sup> )	MBC (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 24h (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 48h (mg L <sup>-1</sup> )	MBC (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 24h (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 48h (mg L <sup>-1</sup> )	MBC (mg L <sup>-1</sup> )
<b>Citrale</b>	350	475	500	325	425	425	250	300	325
<b>Trans-2-esenale</b>	1250	1400	>1500	1250	1400	>1500	850	1300	1400
<b>Esanale</b>	>1500	>1500	>1500	1500	>1500	>1500	1350	>1500	>1500
<b>OE di cedro</b>	>1200	>1200	>1200	>1000	>1000	>1000	500	>1000	>1000

Tabella 7.2 - Valori di MIC e MBC, espressi in mg/L, per *Listeria monocytogenes* Scott A in rapporto al livello di inoculo.

	<i>Salmonella Enteritidis</i>								
<b>Carica cellulare</b>	6 log cfu mL <sup>-1</sup>	6 log cfu mL <sup>-1</sup>	6 log cfu mL <sup>-1</sup>	4 log cfu mL <sup>-1</sup>	4 log cfu mL <sup>-1</sup>	4 log cfu mL <sup>-1</sup>	2 log cfu mL <sup>-1</sup>	2 log cfu mL <sup>-1</sup>	2 log cfu mL <sup>-1</sup>
<b>MIC/MBC</b>	MIC 24h (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 48h (mg L <sup>-1</sup> )	MBC (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 24h (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 48h (mg L <sup>-1</sup> )	MBC (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 24h (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 48h (mg L <sup>-1</sup> )	MBC (mg L <sup>-1</sup> )
<b>Citrale</b>	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500
<b>Trans-2-esenale</b>	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	800	1300	1500
<b>Esanale</b>	>1500	>1500	>1500	1050	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500
<b>OE di cedro</b>	>1200	>1200	>1200	>1200	>1200	>1200	>1000	>1000	>1000

Tabella 7.3 - Valori di MIC e MBC, espressi in mg/L, per *Salmonella enteritidis* E5 in rapporto al livello di inoculo.

	<i>Escherichia coli</i>								
<b>Carica cellulare</b>	6 log cfu mL <sup>-1</sup>	6 log cfu mL <sup>-1</sup>	6 log cfu mL <sup>-1</sup>	4 log cfu mL <sup>-1</sup>	4 log cfu mL <sup>-1</sup>	4 log cfu mL <sup>-1</sup>	2 log cfu mL <sup>-1</sup>	2 log cfu mL <sup>-1</sup>	2 log cfu mL <sup>-1</sup>
<b>MIC/MBC</b>	MIC 24h (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 48h (mg L <sup>-1</sup> )	MBC (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 24h (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 48h (mg L <sup>-1</sup> )	MBC (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 24h (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 48h (mg L <sup>-1</sup> )	MBC (mg L <sup>-1</sup> )
<b>Citrale</b>	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500
<b>Trans-2-esenale</b>	525	600	650	500	575	575	500	525	525
<b>Esanale</b>	>1500	>1500	>1500	1050	>1500	>1500	700	1200	>1200
<b>OE di cedro</b>	>1200	>1200	>1200	>1200	>1200	>1200	>1000	>1000	>1000

**Tabella 7.4** - Valori di MIC e MBC, espressi in mg/L, per *Escherichiacoli*555 in rapporto al livello di inoculo.

	<i>Staphylococcus aureus</i>								
<b>Carica cellulare</b>	6 log cfu mL <sup>-1</sup>	6 log cfu mL <sup>-1</sup>	6 log cfu mL <sup>-1</sup>	4 log cfu mL <sup>-1</sup>	4 log cfu mL <sup>-1</sup>	4 log cfu mL <sup>-1</sup>	2 log cfu mL <sup>-1</sup>	2 log cfu mL <sup>-1</sup>	2 log cfu mL <sup>-1</sup>
<b>MIC/MBC</b>	MIC 24h (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 48h (mg L <sup>-1</sup> )	MBC (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 24h (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 48h (mg L <sup>-1</sup> )	MBC (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 24h (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 48h (mg L <sup>-1</sup> )	MBC (mg L <sup>-1</sup> )
<b>Citrale</b>	500	550	550	450	500	500	250	250	250
<b>Trans-2-esenale</b>	1200	1400	>1500	1300	1400	>1500	900	1300	1400
<b>Esenale</b>	>1500	>1500	>1500	1500	>1500	>1500	1400	>1500	>1500
<b>OE di cedro</b>	>1200	>1200	>1200	>1000	>1000	>1000	800	>1000	>1000

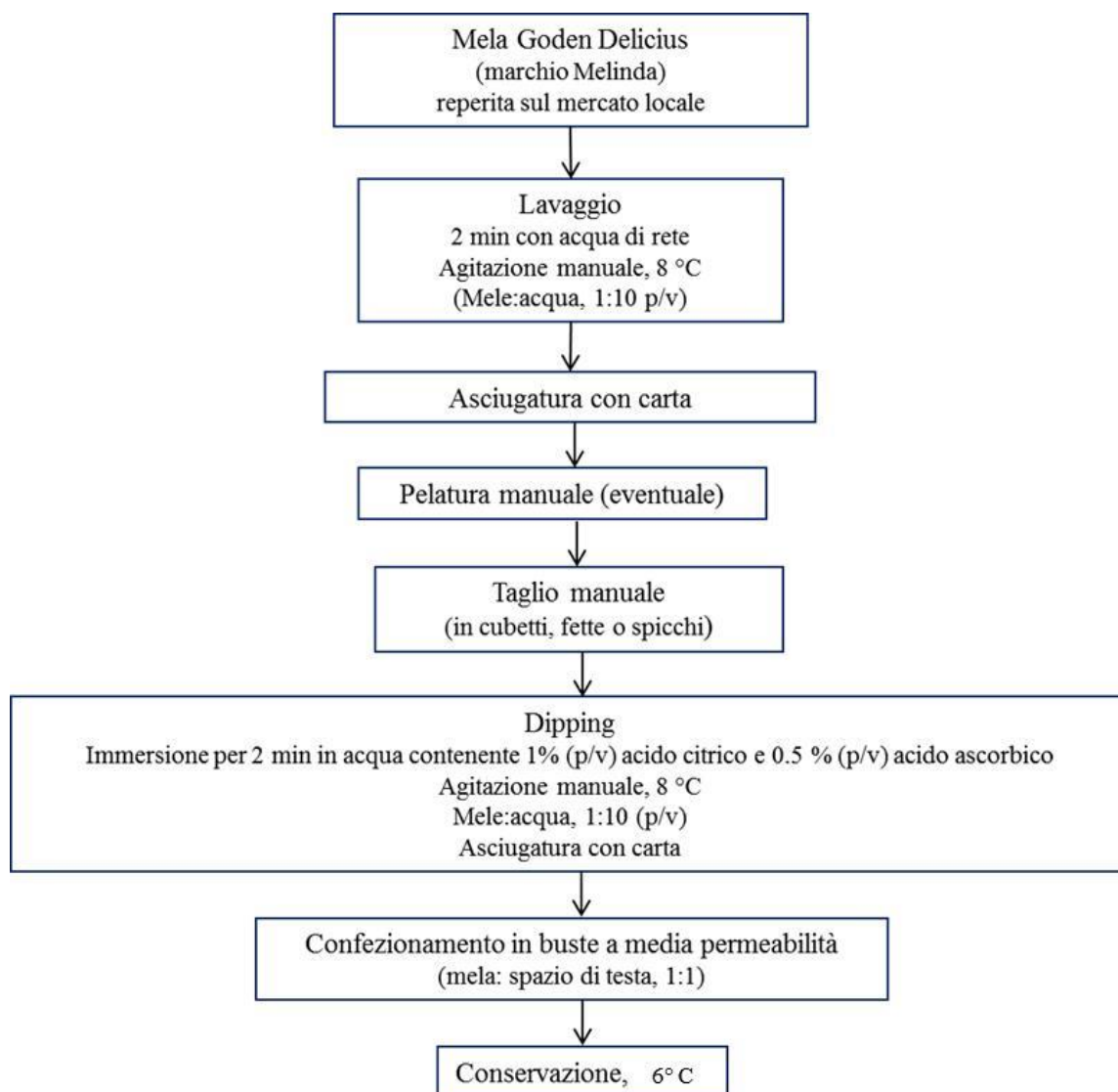
**Tabella 7.5** - Valori di MIC e MBC, espressi in mg/L, *Staphylococcus aureus* F1 in rapporto al livello di inoculo.

	<i>Bacillus cereus</i>								
<b>Carica cellulare</b>	6 log cfu mL <sup>-1</sup>	6 log cfu mL <sup>-1</sup>	6 log cfu mL <sup>-1</sup>	4 log cfu mL <sup>-1</sup>	4 log cfu mL <sup>-1</sup>	4 log cfu mL <sup>-1</sup>	2 log cfu mL <sup>-1</sup>	2 log cfu mL <sup>-1</sup>	2 log cfu mL <sup>-1</sup>
<b>MIC/MBC</b>	MIC 24h (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 48h (mg L <sup>-1</sup> )	MBC (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 24h (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 48h (mg L <sup>-1</sup> )	MBC (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 24h (mg L <sup>-1</sup> )	MIC 48h (mg L <sup>-1</sup> )	MBC (mg L <sup>-1</sup> )
<b>Citrale</b>	300	>650	>650	300	350	350	300	300	300
<b>Trans-2-esenale</b>	1200	1350	>1400	1200	1350	>1400	800	1250	1300
<b>Esanale</b>	>1500	>1500	>1500	1500	>1500	>1500	1350	>1500	>1500
<b>OE di cedro</b>	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000

**Tabella 7.6** - Valori di MIC e MBC, espressi in mg/L, per *Bacillus cereus* SV 90 in rapporto al livello di inoculo.

### 7.3 Effetto dell'olio essenziale di cedro e delle sostanze antimicrobiche saggiate sulla shelf-life di prodotti di IV gamma a base mela

I prodotti di quarta gamma a base di mele cubettate sono stati preparati seguendo il seguente protocollo.



Le mele, varietà *Golden delicious*, sono state acquistate presso un rivenditore locale lo stesso giorno delle analisi, sono quindi state lavate con acqua corrente a 8° C per 2 minuti e poi asciugate con carta assorbente. Dopo di che, le mele sono state sbucciate e tagliate a cubetti di circa 1,5 cm<sup>3</sup>. Gli oli essenziali (OE) e gli antimicrobici



naturali, testati singolarmente o in combinazione, sono stati addizionati alla soluzione di dipping tradizionale costituita da 1% di acido citrico + 0,5% di acido ascorbico.

Sono state preparate otto diverse soluzioni di trattamento impiegando acqua corrente ad una temperatura di 13° C:

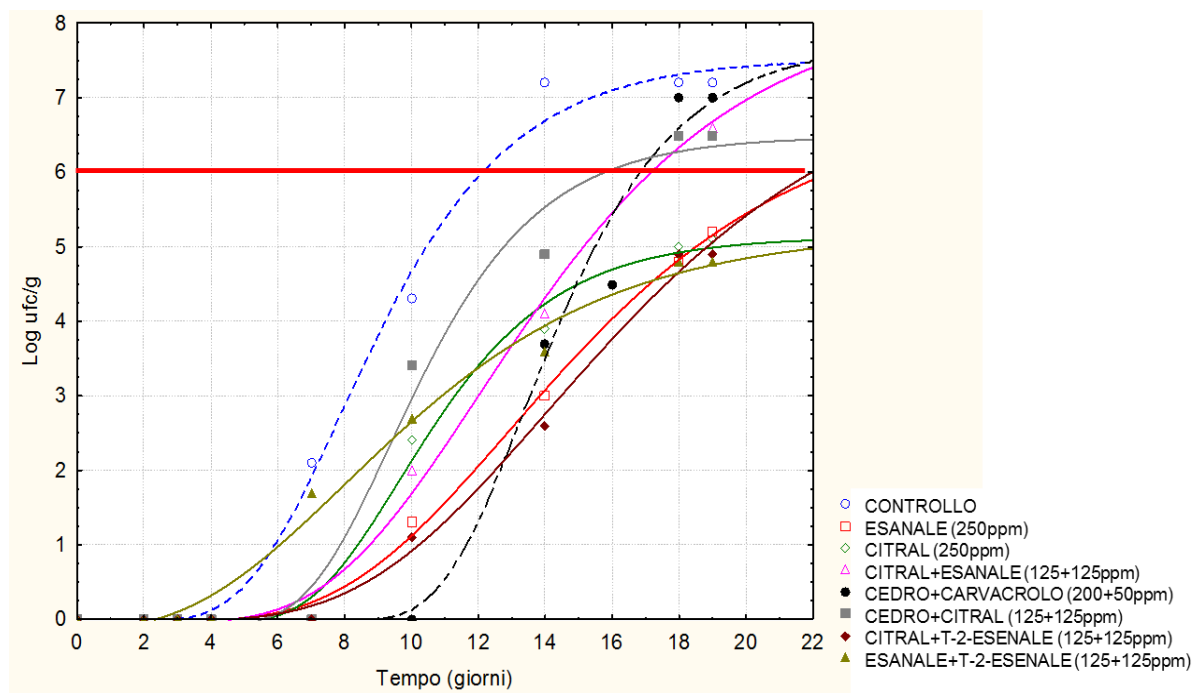
- 1) Dipping Tradizionale di Controllo (1% di acido citrico + 0,5% di acido ascorbico)
- 2) Dipping Tradizionale + citrale (250 mg/L);
- 3) Dipping Tradizionale + esanale (250 mg/L);
- 4) Dipping Tradizionale + combinazioni di citrale + esanale (125 +125 mg/L);
- 5) Dipping Tradizionale + combinazioni di citrale + *trans*-2-esenale (125 +125 mg/L);
- 6) Dipping Tradizionale + combinazioni di esanale + *trans*-2-esenale (125 +125 mg/L);
- 7) Dipping Tradizionale + combinazioni di citrale + OE di cedro (125 +125 mg/L);
- 8) Dipping Tradizionale + combinazioni di OE di cedro + carvacrolo (200 +50 mg/L).

Gli antimicrobici naturali sono stati veicolati in acqua utilizzando etanolo 1% (v/v).

Dopo il trattamento, le mele sono state asciugate con carta e confezionate in atmosfera ordinaria e quindi conservati a 6° C fino al termine della *shelf-life*.

Durante il periodo di conservazione, è stata valutata la crescita di batteri lattici (LAB) e dei lieviti naturalmente presenti, essendo questi i principali responsabili del deterioramento della frutta di IV gamma. Infatti, il valore del pH, il tenore zuccherino e il rapporto C/N favorisce la crescita di batteri lattici, lieviti e muffe. Tuttavia, l'elevato tasso di respirazione dei pezzi di frutta, rimuove rapidamente una gran parte dell'ossigeno presente nello spazio di testa dei sacchetti, creando così un ambiente non adatto allo sviluppo delle muffe aerobiche. In figura 7.3, sono riportate le curve di crescita dei lieviti elaborate secondo l'equazione di Gompertz modificata da Zwietering *et al.* (1990).

I lieviti hanno mostrato un tasso di crescita più elevato nei campioni di controllo (privi delle sostanze antimicrobiche e trattati con il solo dipping tradizionale) dove raggiungono carichi cellulari di 6 log UFC/g dopo circa 12 giorni. Questo livello di carico cellulare può essere considerato come riferimento perché corrisponde all'avvio del processo di deterioramento percepibile. Le sostanze più efficaci nel rallentare lo sviluppo dei lieviti naturalmente presenti sono state l'esanale, quando impiegato in concentrazione di 250 mg/L, il citrale e la miscela esanale + *trans*-2-esenale, entrambi utilizzati a 125 mg/L. In particolare l'esanale ha ritardato il raggiungimento della soglia di deterioramento di circa 10 giorni rispetto al controllo, mentre i carichi di lieviti nei campioni trattati con il citrale e la miscela delle due aldeidi non hanno mai raggiunto la carica di 6 log UFC/g durante il periodo di tempo monitorato.



**Figura 7.2** - Evoluzione del carico di lieviti (log UFC/g) in mele addizionate di oli essenziali e/o componenti bioattivi durante lo stoccaggio a 6° C.

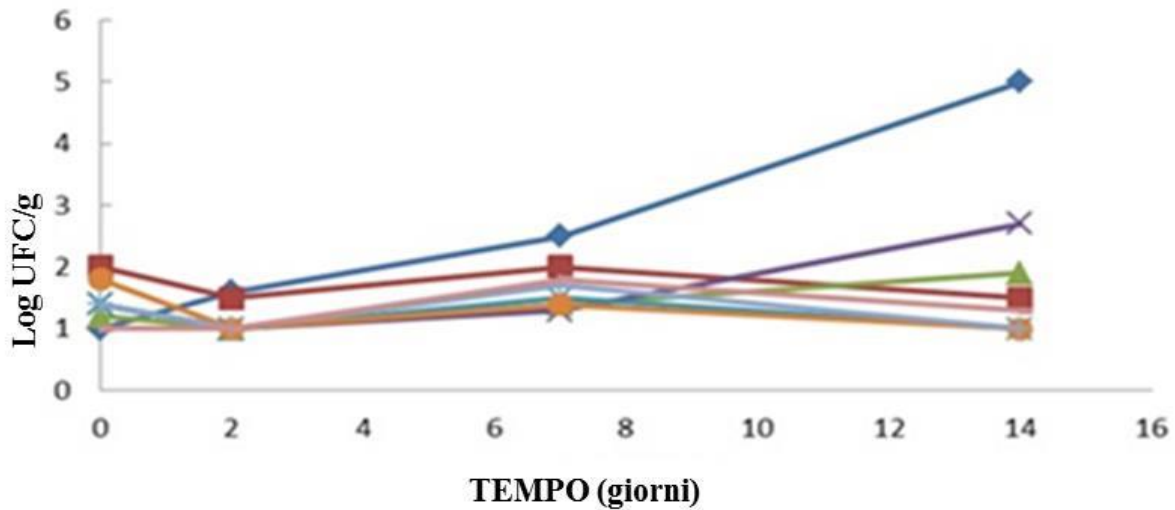
Nella tabella sottostante sono invece riportati tutti i parametri di crescita dei lieviti alle diverse condizioni di dipping ottenuti mediante elaborazione dei dati grezzi con equazione di Gompertz modificata da Zwietering *et al.* (1990).

Campioni	A	$\mu_{max}$	$\lambda$	R	Tempo (giorni)
Controllo <sup>a</sup>	7.55	0.97	5.04	0.99	<b>12.12</b>
OE di cedro + Citrale <sup>b</sup>	6.54	0.96	6.87	0.99	<b>15.79</b>
Esanale + trans-2-esenale <sup>c</sup>	5.40	0.43	3.40	0.99	- <sup>i</sup>
Citrale <sup>d</sup>	5.17	0.72	7.00	0.99	-
Citrale + Esanale <sup>e</sup>	8.30	0.68	7.53	0.99	<b>17.17</b>
Esanale <sup>f</sup>	6.97	0.51	7.94	0.99	<b>22.55</b>
Citrale + trans-2-esenale <sup>g</sup>	7.62	0.51	8.56	0.99	<b>21.97</b>
OE di cedro + Carvacrolo <sup>h</sup>	<b>7.74</b>	<b>1.14</b>	<b>10.90</b>	<b>0.99</b>	<b>16.83</b>

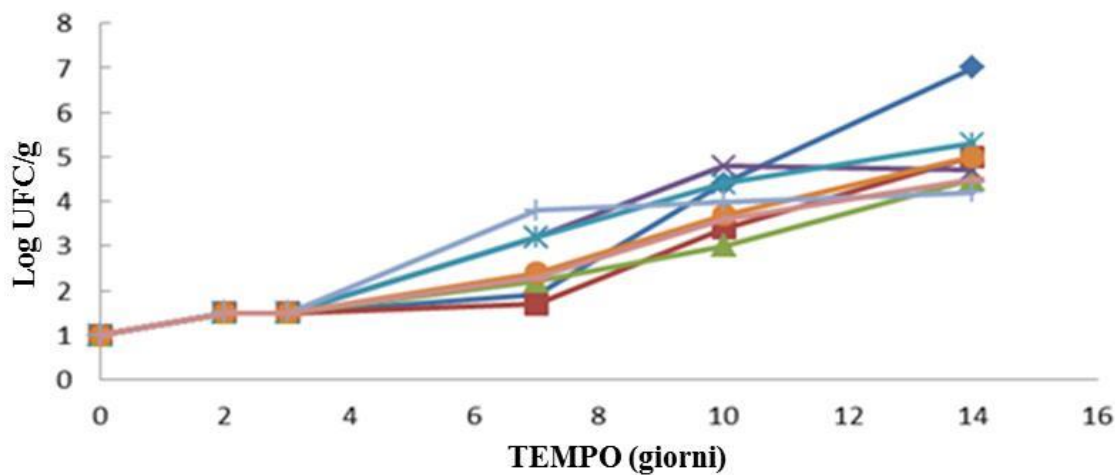
**Tabella 7.7** - Parametri della curva di Gompertz della carica cellulare di lieviti nelle mele, conservate a 6° C, in relazione al trattamento di dipping. Dove: <sup>a</sup> Controllo è stato trattato solo con la soluzione di dipping (1% acido citrico + 0.5% acido ascorbico); <sup>b</sup> Concentrazione impiegata di 125 mg L<sup>-1</sup> ciascuno; <sup>c</sup> Concentrazione impiegata di 125 mg L<sup>-1</sup> ciascuno; <sup>d</sup> Concentrazione impiegata di 250 mg L<sup>-1</sup>; <sup>e</sup> Concentrazione impiegata di 125 mg L<sup>-1</sup> ciascuno; <sup>f</sup> Concentrazione impiegata di 250 mg L<sup>-1</sup>.

<sup>g</sup> Concentrazione impiegata di 125 mg L<sup>-1</sup> ciascuno; <sup>h</sup> Concentrazione impiegata di 200 mg L<sup>-1</sup> di OE di cedro e di 50 mg L<sup>-1</sup> di carvacrolo; Tempo: il tempo (giorni) necessari per arrivare ad una carica microbica di 6.0 log CFU ml<sup>-1</sup> scelto come limite di spoilage; A: massima concentrazione cellulare, tenendo in considerazione la carica microbica iniziale (k) (log CFU g<sup>-1</sup>);  $\mu_{max}$ : velocità massima di crescita ((log CFU g<sup>-1</sup>) giorni<sup>-1</sup>);  $\lambda$ : tempo di latenza (lag time) (giorni) ed R: coefficiente di correlazione.

Anche i batteri lattici e i mesofili aerobi totali hanno mostrato un tasso di crescita più elevato nei campioni di controllo (figure 7.3 e 7.4). Infatti, dopo 14 giorni di conservazione a 6° C, questi hanno raggiunto livelli di 5,0 log UFC/g per i LAB e di 7,0 log UFC/g per i batteri mesofili totali soltanto nei campioni di controllo, mentre negli altri campioni i carichi di batteri lattici variavano tra 1,0 e 2,7 log UFC/g (figura 7.3); mentre i livelli dei mesofili totali variavano da 4,0 a 5,2 log UFC/g (figura 7.4).



**Figura 7.3** - Evoluzione del carico di batteri lattici (log UFC/g) in mele addizionate di oli essenziali e/o componenti bioattivi durante lo stoccaggio a 6° C.



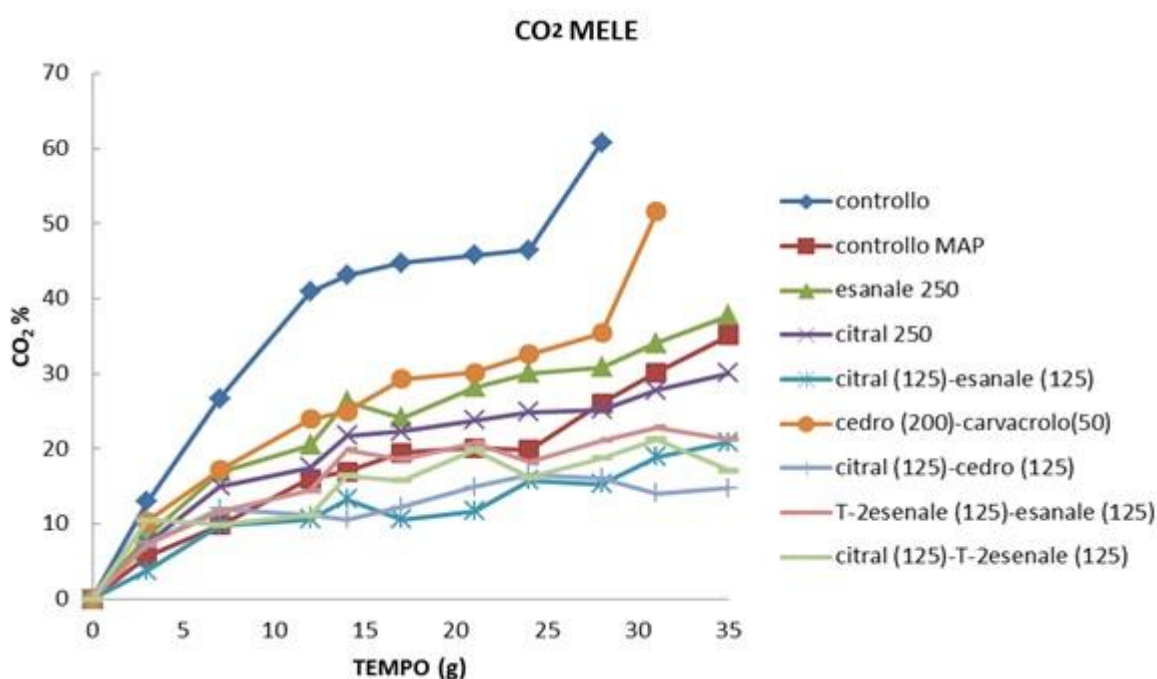
**Figura 7.4** - Evoluzione del carico di batteri mesofili totali (log UFC/g) in mele addizionate di oli essenziali e/o componenti bioattivi durante lo stoccaggio a 6° C.

#### ***7.4 Evoluzione della CO<sub>2</sub> nello spazio di testa durante la conservazione***

L'evoluzione della CO<sub>2</sub> nello spazio di testa (figura 7.5) rende conto perfettamente del diverso sviluppo dei microrganismi responsabili del deterioramento nei campioni considerati. In particolare, i più alti valori di anidride carbonica sono stati osservati nei campioni di controllo, già dopo 5 giorni dal confezionamento, e nei

campioni trattati con la miscela olio di cedro + carvacrolo. Tali campioni erano quelli che evidenziavano i maggiori livelli di lieviti degradativi.

I valori più bassi di CO<sub>2</sub>, minori del 20% anche dopo 35 giorni di conservazione, si sono registrati per le mele trattate con la miscela citrale + OE di cedro, la miscela citrale+*trans*-2-esenale, la miscela citrale + esanale e la miscela *trans*-2-esenale+esanale.



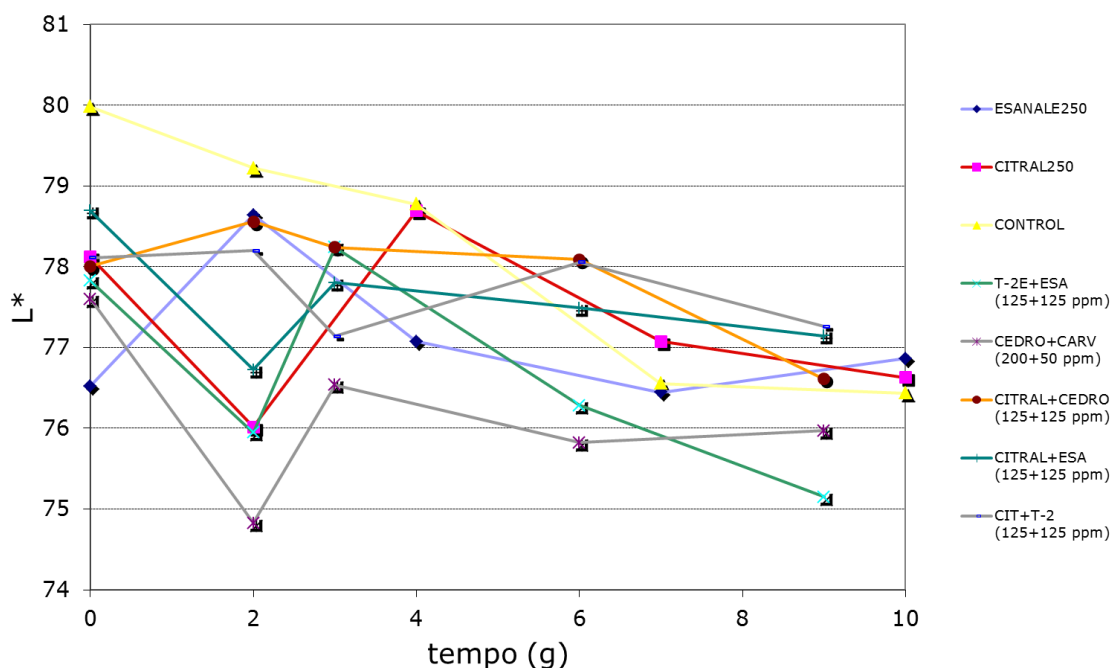
**Figura 7.5** - Evoluzione della CO<sub>2</sub> nello spazio di testa in mele confezionate e addizionate di oli essenziali e/o componenti bioattivi durante lo stoccaggio a 6° C.

### ***7.5 Effetto dell'olio essenziale di cedro e delle sostanze antimicrobiche saggate sul colore dei prodotti di IV gamma a base mela***

Come riportato in figura 7.6, il trattamento con olio essenziale di cedro e con le molecole antimicrobiche saggate ha promosso immediatamente una modificazione della componente acromatica delle mele trattate, corrispondente ad una diminuzione del valore di L\* (luminosità) di 1.5-3.5 unità. Secondo quanto riportato da Fletcher (1999), l'occhio umano può percepire variazioni di luminosità superiori alle tre unità e

la diminuzione di  $L^*$  promossa dai trattamenti era intorno a questo valore. Fino al quarto giorno di conservazione, il campione di controllo ha mostrato i valori di luminosità più alti, con un andamento progressivamente decrescente fino alla fine della shelf-life, come conseguenza dell'inevitabile imbrunimento enzimatico.

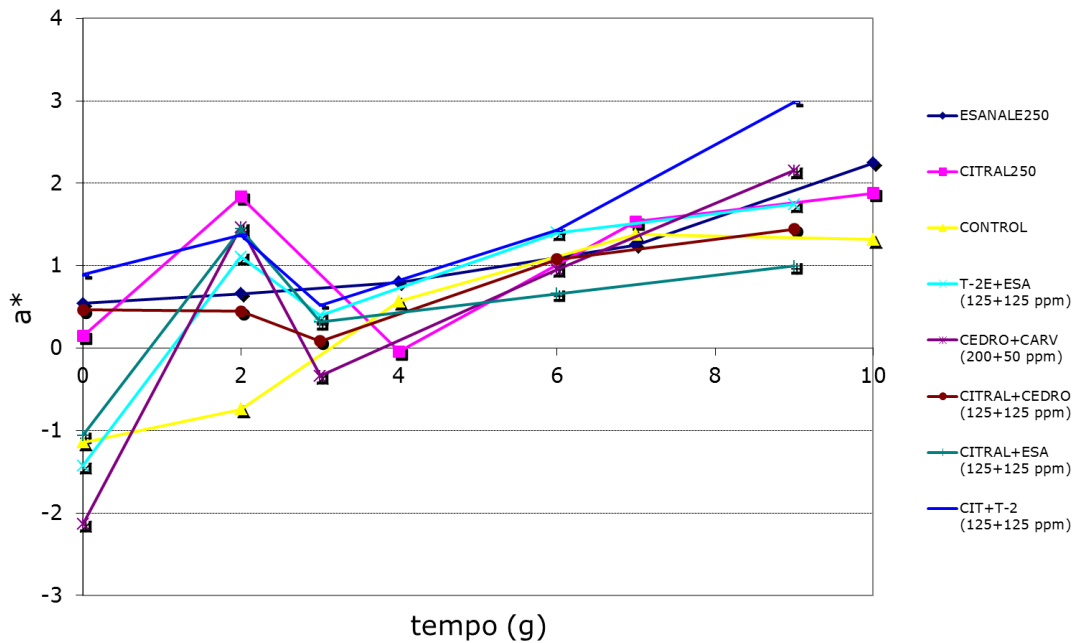
Dopo quattro giorni di conservazione, i campioni trattati con la miscela citrale + olio essenziale di cedro, citrale + *trans*-2-esenale, citrale + esanale e citrale hanno mostrato valori più alti di luminosità; tali trattamenti hanno mostrato anche un effetto positivo nel ritardare la perdita di luminosità.



**Figura 7.6** - Evoluzione del valore di  $L^*$  nei campioni di mela in relazione al dipping subito.

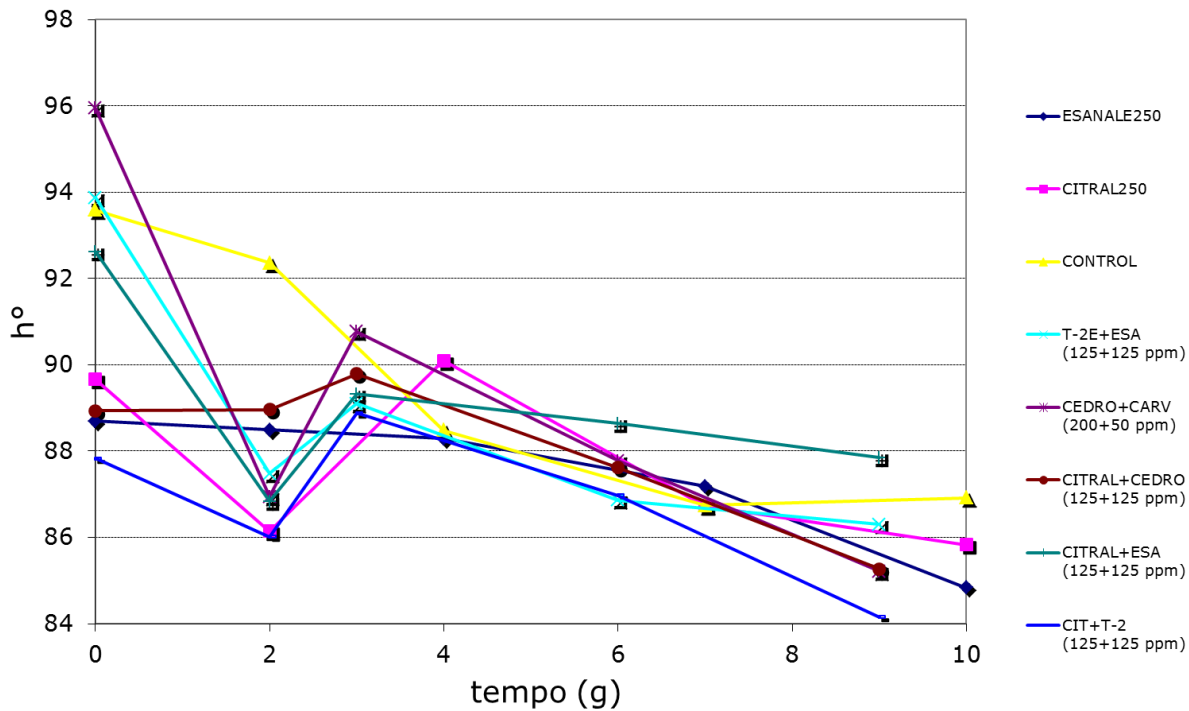
I trattamenti con esanale, citrale, la miscela citrale + EO di cedro e la miscela citrale + *trans*-2-esenale hanno invece provocato un immediato aumento dell'indice di rosso ( $a^*$ ); mentre le miscele esanale + *trans*-2-esenale, EO di cedro + carvacrolo e citrale + esanale hanno evidenziato un valore iniziale dell'indice di rosso molto simile al controllo. Dopo due giorni di conservazione, tutti i campioni hanno mostrato valori significativamente più alti di  $a^*$  rispetto al controllo, raggiungendo valori simili al quarto giorno di refrigerazione. Tra i trattamenti indagati, la miscela citrale + esanale

ha consentito di mantenere il più basso valore di rosso sulla superficie delle mele (figura 7.7).



**Figura 7.7** - Evoluzione del valore di  $a^*$  nei campioni di mela in relazione al dipping subito.

Per quanto riguarda la tinta ( $h^\circ$ ) (figura 7.8), i trattamenti con le miscele di EO di cedro + carvacolo e citrale + esanale sembravano non influenzare questo parametro, ma dopo due giorni di conservazione il campione di controllo ha evidenziato un valore molto simile al tempo zero, mentre tutti i campioni trattati hanno evidenziato una diminuzione molto netta nella prima fase di conservazione. Dal quarto giorno alla fine della *shelf-life*, l'andamento decrescente di  $h^\circ$  è risultato molto simile per tutti i campioni con l'unica eccezione del campione trattato con la miscela citrale + esanale che ha mostrato i valori più elevati.



**Figura 7.8** - Evoluzione del parametro di  $h^\circ$  nei campioni di mela in relazione al dipping subito.

L'aumento dell'imbrunimento iniziale causato dal citrale è in accordo con i dati riportati da Belletti *et al.* (2008), i quali hanno osservato l'effetto citotossico su frutta tagliata a pezzi per macedonia ad una concentrazione di 125 mg/L. Probabilmente nelle nostre condizioni sperimentali, gli effetti negativi di questa aldeide sono stati ridotti poiché impiegata in combinazione con l'esanale. D'altra parte, l'effetto positivo dell'esanale sul mantenimento del colore è già stato osservato in numerosi studi (Lanciotti *et al.*, 1999; Corbo *et al.*, 2000). Valero *et al.* (1990) hanno attribuito l'inibizione di imbrunimento nelle mele trattate con esanale alla precoce conversione dell'esanale impiegato in etanolo. Gli alcoli alifatici sono infatti noti per la loro capacità di inibire le polifenolossidasi presenti nei tessuti vegetali.

Le immagini sottostanti mostrano l'evoluzione del colore delle mele nel campione di controllo (immagine 7.1) e nel campione trattato con la miscela citrale + esanale (immagine 7.2). Come si può notare nei campioni trattati con la miscela



citrale ed esanale si osserva un aumento dell'imbrunimento dopo sette giorni di conservazione e poi successivamente si osserva l'effetto di mantenimento di colore.



**Immagine 7.1** - Evoluzione del colore nel campione di controllo.



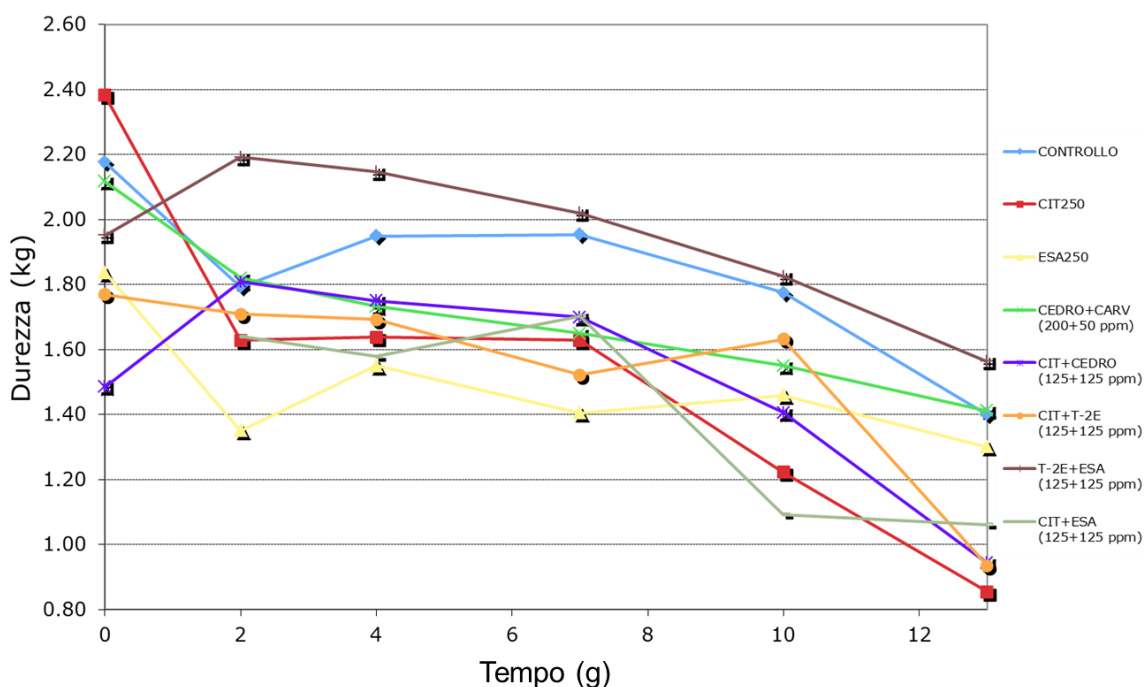
**Immagine 7.2** - Evoluzione del colore nel campione trattato con la miscela citrale + esanale.

## ***7.6 Effetto dell'olio essenziale di cedro e delle sostanze antimicrobiche saggiate sulla texture dei prodotti di IV gamma a base mela***

Come conseguenza del trattamento di dipping, solo il campione trattato con il citrale ha mostrato maggior valore di durezza rispetto al controllo (figura 7.9), mentre il trattamento con la miscela citrale + EO di cedro ha causato la massima perdita di compattezza. L'effetto positivo del citrale è stato però perduto già dopo soli due giorni di conservazione.

Come previsto, durante la conservazione, la texture delle mele è diminuita per tutti i campioni esaminati in un modo molto simile. Tra questi, solo il campione

trattato con la miscela esanale + *trans*-2-esenale ha mantenuto valori di durezza più elevati rispetto al controllo per tutta la *shelf-life*.



**Figura 7.9** – Evoluzione della durezza (espressa in kg) delle fette di mele trattate.

### ***7.7 Effetto dell'olio essenziale di cedro e degli antimicrobici naturali testati sul profilo in molecole volatili rilevati mediante GC/SPME e naso elettronico***

Per valutare l'effetto dei composti saggiati sul profilo aromatico delle mele trattate, i campioni sono stati analizzati tramite analisi gas-cromatografica abbinata alla tecnica SPME (micro-estrazione in fase solida) e l'analisi al naso elettronico. Anche se solo le molecole più significative sono stati riportati in tabella 7.8, l'analisi gas-cromatografica ha permesso l'identificazione di 45 molecole appartenenti a classi chimiche differenti e che hanno fornito un ben specifico profilo aromatico in funzione all'agente antimicrobico utilizzato e al tempo di conservazione.

Nerale, geraniale, nerolo e geraniolo hanno caratterizzato i campioni trattati con citrale e con la miscela citrale + olio essenziale di cedro. Questi ultimi campioni hanno

evidenziato anche la presenza di elevati livelli di limonene, terpinene, linalil-butirato e  $\beta$ -miricene. I campioni trattati con il citrale hanno mostrato anche la presenza di citronellile acetato e  $\beta$ -citronellolo, mentre esanale, *trans*-2-esenale, esanolo ed esteri dell'acido acetico sono stati rilevati nei campioni trattati con esanale e *trans*-2-esenale. Esanale e *trans*-2-esenale hanno mostrato una notevole abbondanza (in termini di area di picco) di *trans*-2-esenil acetato. Esanale e *trans*-2-esenale hanno mostrato livelli più elevati nei campioni di controllo rispetto ai campioni trattati con le medesime molecole, il che indica che la loro addizione accelera i meccanismi di detossificazione adottati dai tessuti. D'altra parte, è stato dimostrato per le altre aldeidi, come la riduzione di nerale e geraniale in nerolo e geraniolo sia il primo passo della biotrasformazione del citrale in composti a più bassa tossicità ad opera di penicilli (Esmaeili and Tavassoli, 2010). Anche Patrignani *et al.* (2013), hanno dimostrato l'aumento di questi alcoli in conseguenza ai meccanismi di detossificazione dei lieviti in succhi di frutta addizionati con citrale. Un meccanismo simile, cioè la riduzione ai rispettivi alcoli, è stato dimostrato anche per sei aldeidi alifatiche (Patrignani *et al.*, 2008). I campioni trattati con l'olio essenziale di cedro hanno mostrato la presenza di elevate quantità di monoterpeni e monoterpeni ossigenati, la cui presenza è ben documentata nell'olio stesso. Gli esteri metilici di timolo e carvacrolo sono stati i principali composti volatili rilevati nei campioni trattati con carvacrolo.

Composti	Controllo <sup>a</sup>			OE di cedro + Citrale <sup>b</sup>			Esmale + trans-2- esmale <sup>c</sup>			Citrale <sup>d</sup>			Citrale + Esmale <sup>e</sup>			Esmale <sup>f</sup>			Citrale + trans-2- esmale <sup>g</sup>			OE di cedro+ Carvacolo <sup>h</sup>		
	T0	T3	T10	T0	T3	T10	T0	T3	T10	T0	T3	T10	T0	T3	T10	T0	T3	T10	T0	T3	T10	T0	T3	T10
Acetato di etile	0.0	4.3	2.5	2.5	7.5	3.6	0.8	12.7	34.3	6.4	13.5	14.6	1.2	10.3	11.0	1.2	19.3	33.9	0.6	15.2	14.6	3.7	23.3	38.7
Estere isobutilico dell'acido acetico	0.6	1.2	5.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.2	0.6	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0
Estere butilico dell'acido acetico	6.9	10.9	1.8	6.0	4.7	0.0	0.8	4.4	7.9	12.9	5.2	7.6	1.3	5.5	6.0	6.1	13.6	9.3	5.2	11.5	11.6	0.8	2.5	5.1
1-butano, 2-metil-acetato	11.0	11.5	12.3	5.6	4.0	0.0	1.1	1.4	4.8	23.7	11.8	5.2	4.3	5.5	1.7	15.3	27.5	3.6	5.9	10.0	2.8	2.6	4.1	4.3
Estere etilico dell'acido acetico	16.4	42.2	12.6	7.3	22.0	4.2	235.1	460.8	74.0	20.6	57.2	36.8	25.0	167.3	12.2	236.5	431.6	259.3	31.3	171.6	53.5	6.9	26.0	20.3
Trans-2-esani acetato	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	46.4	9.5	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	13.1	3.0	0.2	0.0	0.0	0.0
Estere metilico dell'acido butanoico	0.0	0.0	0.0	0.4	1.0	0.0	0.0	0.1	0.0	3.4	6.8	3.9	5.6	3.8	0.0	5.2	11.1	0.0	0.7	7.9	1.1	0.0	0.0	0.0
Acetato di citronellale	0.0	0.0	0.0	0.3	5.4	1.9	0.0	0.0	0.0	1.4	9.5	11.1	1.5	10.2	0.4	0.0	0.0	0.0	1.2	21.8	4.0	0.0	0.0	0.0
Butirato di linale	0.0	0.0	0.0	4.9	5.4	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	28.4	26.6	8.3	0.0
Esteri totali	34.9	70.0	34.7	26.9	50.0	10.1	284.2	499.0	122.8	68.5	104.1	79.2	38.9	202.6	31.6	264.3	503.3	306.6	58.0	240.9	88.2	42.4	82.5	76.6
Esano	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.5	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	6.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
$\beta$ -mircene	0.0	0.0	0.0	0.4	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1	3.6	2.0
Limone	0.4	1.7	1.4	38.6	28.3	2.6	0.0	0.4	0.9	1.0	1.3	0.9	1.7	0.5	0.0	0.7	0.2	0.0	0.5	1.1	0.3	213.0	203.1	124.8
$\alpha$ Terpinene	0.0	0.0	0.0	19.7	19.0	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	155.5	126.9	72.1
Cinene	0.0	0.0	0.0	13.3	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	35.0	66.3	55.2
$\beta$ -pinene	0.0	0.0	0.0	3.1	1.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.7	8.0	4.4
Estere metilico del timolo	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	18.0	11.0
Idrocarburi totali	0.4	1.7	1.4	75.0	52.2	4.0	0.0	0.4	0.9	1.0	1.3	8.4	1.7	0.5	0.0	0.7	0.5	0.0	6.9	1.1	0.3	416.4	426.0	269.4
Netolo	0.0	0.0	0.0	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	4.3	0.0	0.0	0.0	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Geraniolo	0.0	0.0	0.0	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Carvacolo	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	27.4	15.5	0.0	0.0
$\beta$ -citronellolo	0.0	0.0	0.0	39.6	58.3	33.4	0.0	0.0	63.7	144.3	81.1	44.8	64.8	4.7	0.0	0.0	0.0	42.4	72.1	21.5	6.5	6.0	0.0	0.0
Esmale	2.5	1.7	0.0	8.4	3.0	3.8	33.1	8.4	2.6	9.5	11.0	11.4	33.3	17.8	2.6	35.2	10.2	7.6	21.0	16.3	5.6	1.5	2.4	1.5
Eranolo	0.6	0.9	0.0	12.0	10.8	6.1	11.0	8.9	8.0	14.0	12.2	10.3	11.5	10.3	4.9	14.1	12.0	8.7	10.8	11.5	7.4	14.5	14.1	9.3
Alcoli totali	3.1	2.6	0.0	63.7	72.0	43.3	44.1	17.2	10.6	96.5	167.5	102.9	92.8	92.9	12.2	49.3	22.2	16.3	79.0	99.9	34.5	49.9	38.0	10.8
Esmale	24.6	35.6	24.0	18.2	55.5	38.5	3.9	2.7	16.5	9.9	27.7	20.0	31.5	26.1	28.8	14.7	11.3	10.4	16.3	20.2	30.2	5.1	6.3	12.5
Netolo	0.0	0.0	0.0	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	48.7	1.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Geraniolo	0.0	0.0	0.0	3.7	0.5	0.0	0.0	0.0	48.4	1.9	0.0	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Trans-2-esane	14.6	28.2	50.0	13.3	29.3	31.6	7.2	5.5	29.8	7.2	19.3	18.4	24.7	12.4	11.1	0.0	7.2	18.2	18.8	16.8	23.3	6.9	10.4	18.8
Aldeidi totali	39.2	63.7	73.9	38.0	85.3	70.0	11.1	8.2	46.3	114.1	49.9	38.4	61.5	38.5	39.9	14.7	18.5	28.5	51.4	37.0	53.5	12.0	16.7	31.2
Alfaibofin totali	77.5	138.1	110.1	203.6	259.6	127.4	339.3	514.8	180.6	280.1	322.9	228.9	194.9	334.5	83.6	329.0	544.6	351.4	195.3	378.9	176.5	520.6	563.1	388.1

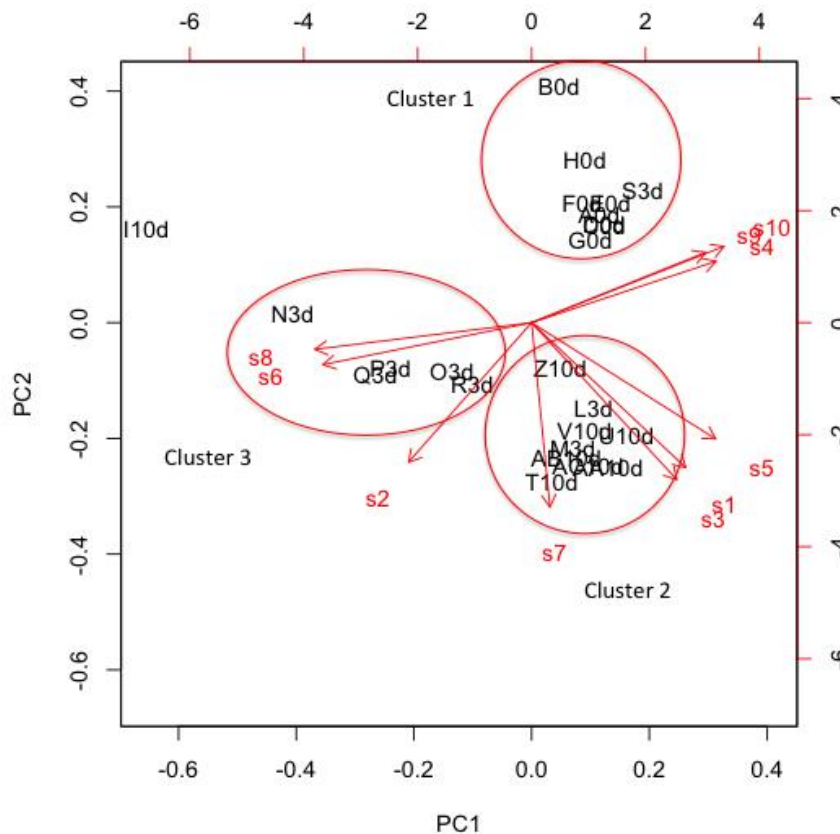
**Tabella 7.8** - Composti aromatici volatili (espresso come Area  $10^{-5}$ ) rilevati nella mela trattata con le differenti soluzioni di dipping durante la conservazione a 6° C. Dove: <sup>a</sup> Controllo è stato trattato con la sola soluzione di dipping (1% acido citrico + 0.5% acido ascorbico); <sup>b</sup> Concentrazione impiegata di 125 mg L<sup>-1</sup> ciascuno; <sup>c</sup> Concentrazione impiegata di 125 mg L<sup>-1</sup> ciascuno; <sup>d</sup> Concentrazione impiegata di 250 mg L<sup>-1</sup>; <sup>e</sup> Concentrazione impiegata di 125 mg L<sup>-1</sup> ciascuno; <sup>f</sup> Concentrazione impiegata di 250 mg L<sup>-1</sup>; <sup>g</sup> Concentrazione impiegata di 125 mg L<sup>-1</sup> ciascuno; <sup>h</sup> Concentrazione impiegata di 200 mg L<sup>-1</sup> di OE di cedro e di 50 mg L<sup>-1</sup> di carvacolo.

Al fine di individuare le molecole in grado di contribuire in maniera significativa alla discriminazione statistica tra i campioni è stata effettuata un'analisi multivariata utilizzando una mappa di calore (figura 7.9). Questo ha permesso di ottenere cinque piccoli cluster. L'analisi ha evidenziato il ruolo svolto dall'olio essenziale o dagli antimicrobici naturali utilizzati nel raggruppamento.

In particolare, i campioni trattati con la miscela olio essenziale di cedro + carvacrolo conservati fino a 5 giorni, sono stati raggruppati insieme (cluster 2) sulla base dell'alta presenza di  $\alpha$ -terpinene, limonene e  $\rho$ -cimene. L'esanale, invece, ha contribuito alla formazione del cluster 3 che ha raggruppati i campioni trattati con esanale (immediatamente dopo l'imballaggio e dopo 10 giorni di conservazione), i campioni trattati con la miscela esanale + *trans*-2-esenale (immediatamente dopo l'imballaggio), nonché i campioni trattati con citrale in miscela con esanale o *trans*-2-esenale (dopo 3 giorni di conservazione). I campioni di questo cluster erano caratterizzati dalla presenza dell'estere esilico dell'acido acetico. I due campioni del cluster 3 addizionati con citrale erano caratterizzati anche dalla presenza di  $\beta$ -citronellolo. Quest'ultima molecola ha inoltre contribuito alla formazione del cluster 5 che raggruppava i campioni contenenti l'olio essenziale di cedro, citrale e una miscela di questi. Nerale e geraniale hanno caratterizzato principalmente i campioni addizionati di citrale, subito dopo il trattamento. I campioni di controllo erano distribuiti in due subcluster del gruppo 4, che comprendeva i campioni trattati con citrale + *trans*-2-esenale, esanale, *trans*-2-esenale e la miscela OE di cedro + citrale dopo 10 giorni di conservazione. Questo cluster è stato caratterizzato dalla presenza di *trans*-2-esenale, esanale ed etil-acetato. I campioni trattati con OE di cedro e citrale, conservati per 10 giorni, hanno mostrato la più alta similarità con i campioni di controllo. Il cluster 1 comprendeva i campioni trattati con esanale e la miscela esanale+*trans*-2-esenale dopo 3 giorni di conservazione, con l'estere esilico dell'acido acetico come unica molecola discriminante. I campioni trattati con citrale, dopo 3 giorni di conservazione, non erano in alcun cluster, ma era vicini a raggrupparsi al cluster 4 con una percentuale di somiglianza del 66,6%; questi campioni erano caratterizzati da alta abbondanza di  $\beta$ -citronellolo.



proiettati in un piano cartesiano definito dalle componenti PC1 e PC2, sono stati raggruppati in tre cluster diversi in base al tempo di conservazione (figura 7.10).



**Figura 7.10** - Analisi della componente principale dei dati ottenuti mediante naso elettronico.

Nel primo cluster sono stati raggruppati i campioni analizzati immediatamente dopo l'imballaggio, indipendentemente dalla presenza dell'antimicrobico naturale impiegato. Il secondo gruppo è rappresentato dai campioni conservati per 10 giorni e i campioni conservati per 3 giorni addizionati di citrale o esanale, mentre il terzo gruppo contiene tutti i restanti campioni dopo 3 giorni di conservazione.

Tutti i campioni, tranne quelli del cluster 3 (contenente i campioni analizzati dopo 3 giorni di conservazione), non sono stati discriminati dalla componente 1 (in grado di spiegare il 57,4% della varianza), ma sono stati raggruppati in due cluster sulla base della componente 2 (26,9% della varianza), in grado di spiegare la maggior parte della varianza rilevata nei tre tempi di conservazione considerati. Il gruppo 3 differiva dagli altri campioni sulla base della componente 1; ed in particolare questo era dovuto ai



sensori 8 e 6, in grado di rilevare alcoli e idrocarburi. Il sensore 9, un sensore piuttosto aspecifico, caratterizzava il cluster 1; mentre i sensori 1, 3 e 5, adatti al rilevamento di composti aromatici, caratterizzano il cluster 2.

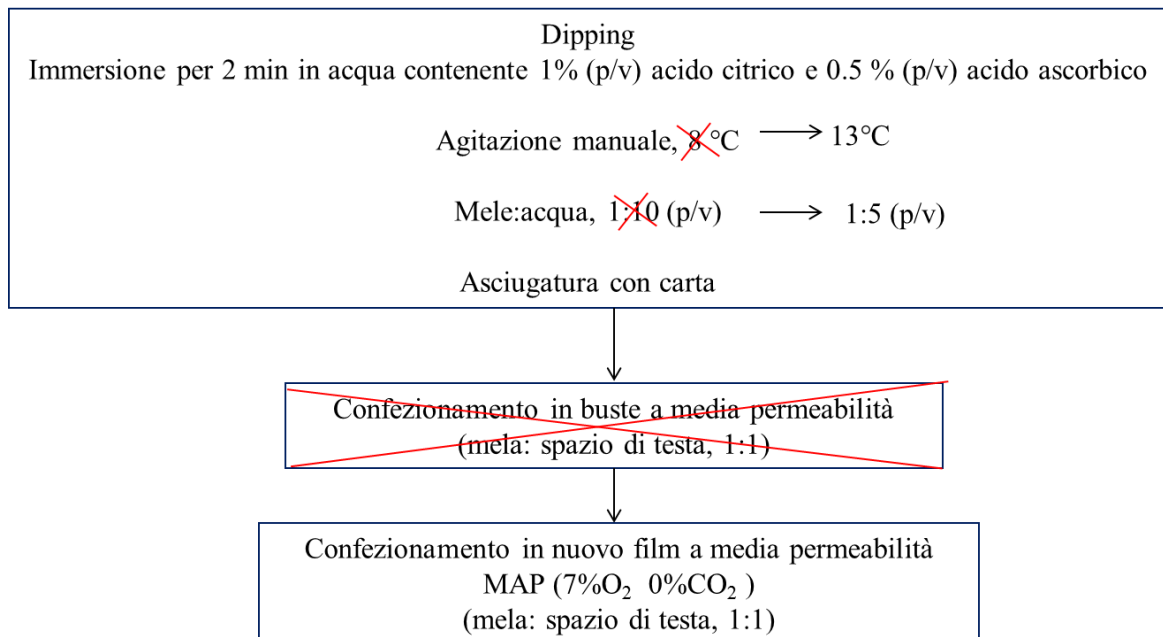
Sado *et al.* (2010), in uno studio volto a valutare la sensibilità del naso elettronico nel discriminare le diverse classi di composti, hanno dimostrato che la risposta dei sensori di 9 e 2 hanno una reattività simile, mentre i sensori 1, 3 e 5 hanno una reattività inversa alle sostanze analizzate. I dati ottenuti indicano chiaramente che l'aggiunta dei composti prescelti non ha influenzato significativamente i profili al naso elettronico. Infatti il raggruppamento è basato principalmente sul tempo di conservazione, ad eccezione dei campioni addizionati con citrale o esanale conservati per tre giorni che sono stati raggruppati con i campioni, addizionati di citrale o esanale e conservati per dieci giorni. Probabilmente, per questi campioni, questo comportamento può essere attribuito alla crescita ritardata dei lieviti. D'altra parte, le concentrazioni degli antimicrobici utilizzati sono state scelte in base a studi preliminari al fine di bilanciare l'effetto antimicrobico e l'impatto sensoriale sul prodotto.

### ***7.8 Ottimizzazione del processo produttivo dei prodotti di quarta gamma***

Un ulteriore obiettivo di questo lavoro sperimentale è stato quello di ottimizzare alcuni parametri di processo come la riduzione del rapporto acqua di lavaggio/prodotto ed incrementare la temperatura dell'acqua utilizzata al fine di meglio solubilizzare gli antimicrobici in fase di dipping e di incrementarne la tensione di vapore. È noto come ad un incremento della tensione di vapore delle sostanze considerate corrisponda un aumento della loro tossicità nei confronti di microrganismi patogeni e degradativi (Lanciotti *et al.*, 2004). Infatti all'aumentare della tensione di vapore aumenta l'affinità delle molecole considerate per le membrane citoplasmatiche dei microrganismi principale e primario bersaglio delle sostanze antimicrobiche (Lanciotti *et al.*, 2004). Inoltre, in fase di confezionamento, l'atmosfera ordinaria è stata sostituita da una atmosfera composta dal 7% di O<sub>2</sub> e il restante azoto (figura 7.11). Tali cambiamenti



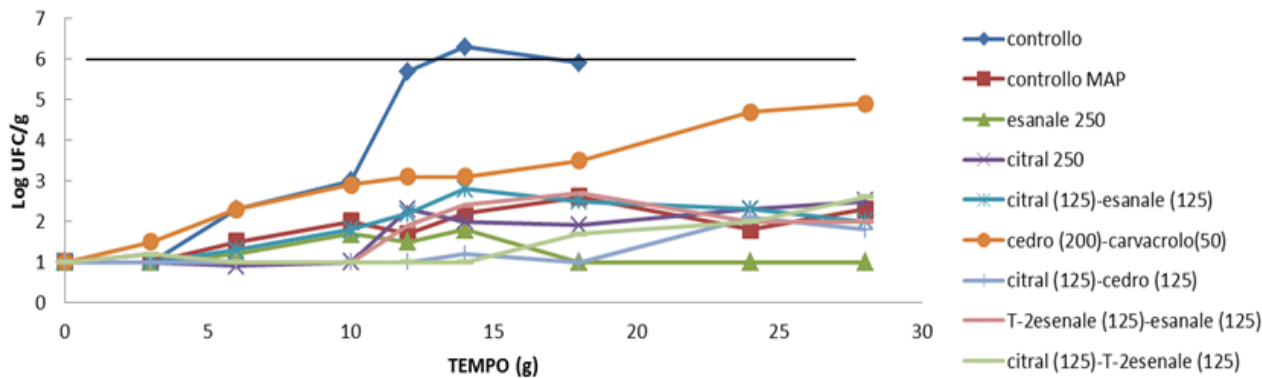
sono stati adottati al fine di aumentare da una parte la sostenibilità del processo e dall'altra la *shelf-life* dei prodotti a base mela trattati.



**Figura 7.11** - Ottimizzazione del processo produttivo per l'ottenimento di prodotti di IV gamma a base mela.

## ***7.9 Evoluzione dei lieviti e batteri lattici autoctoni nei prodotti di IV gamma a base mela conservati in atmosfera modificata***

Durante lo stoccaggio refrigerato (6° C) dei prodotti trattati con dipping tradizionale (controllo) e con gli antimicrobici tradizionali testati, è stata monitorata sia la crescita dei lieviti che dei batteri lattici poiché considerati i maggiori agenti di alterazione di questi prodotti (Patrignani *et al.*, 2013). In figura 7.12 è riportato il carico cellulare dei lieviti in 28 giorni di stoccaggio a 6° C, in rapporto al campione analizzato.



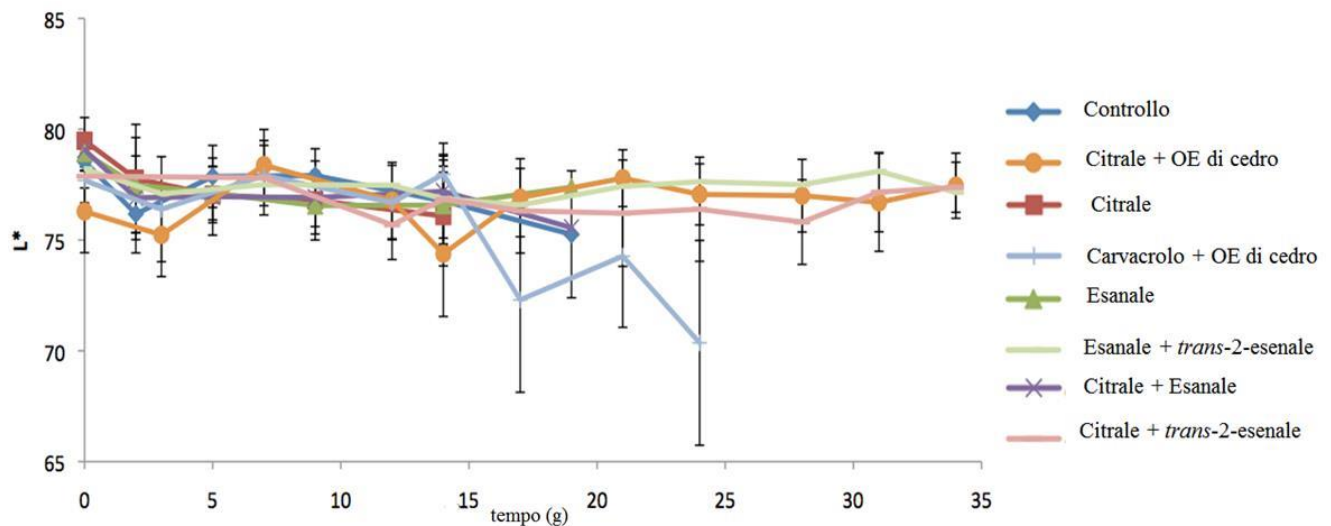
**Figura 7.12** - Evoluzione dei lieviti autoctoni in prodotti di IV gamma a base mela in rapporto alla condizione di dipping.

Come evidente, l'esonale, da solo o in miscela con il *trans*-2-esenale o il citrale, è uno dei composti in grado di rallentare maggiormente lo spoilage da parte dei lieviti autoctoni. D'altra parte l'efficacia di antimicrobici naturali quali esonale e *trans*-2-esenale in prodotti di IV gamma è già grandemente documentata in letteratura (Lanciotti *et al.* 1999; Corbo *et al.* 2000; Lanciotti *et al.*, 2004; Belletti *et al.*, 2008; Patrignani *et al.*, 2008). Inoltre l'utilizzo di atmosfera modificata incrementa ulteriormente l'efficacia di questi composti contro i microrganismi degradativi. I batteri lattici hanno mostrato un andamento molto simile a quello dei lieviti ma con un potenziale di crescita più ridotto (dati non mostrati). Infatti i lieviti sono senz'altro i microrganismi più favoriti in questa tipologia di prodotto caratterizzata da elevate concentrazioni zuccherine e favoriti dai rapporti fra carbonio ed azoto (Patrignani *et al.*, 2013).

### ***7.10 Effetto dell'olio essenziale di cedro e delle sostanze antimicrobiche saggiate sul colore dei prodotti di IV gamma a base mela conservati in atmosfera modificata***

Fra i diversi dipping testati, solo il trattamento con la miscela cedro-citrato ha provocato un immediato decremento della componente acromatica delle mele mentre tutti gli altri trattamenti hanno dato risultati molto simili a quelli del controllo trattato

con dipping tradizionale (figura 7.13). Durante lo stoccaggio, in tutti i campioni è stata osservata una progressiva diminuzione del parametro  $L^*$  (luminosità). In particolare il campione di controllo, dopo 19 giorni di conservazione, ha mostrato un valore di  $L$  più basso di circa 3 unità rispetto al valore iniziale. I campioni di mela trattati con cedro e carvacrolo non si sono differenziati in modo sostanziale dal controllo nella prima parte dello stoccaggio mentre dopo 14 giorni hanno registrato un rapido decremento di luminosità. Differentemente i campioni trattati con cedro + *trans*-2-esenale ed esanale + *trans*-2-esenale hanno mostrato valori di luminosità finale molto simili a quelle iniziali, fino al trentacinquesimo giorno di conservazione.



**Figura 7.13** - Evoluzione del parametro  $L^*$  nei diversi campioni di mela in relazione al trattamento subito.

### CONTROLLO



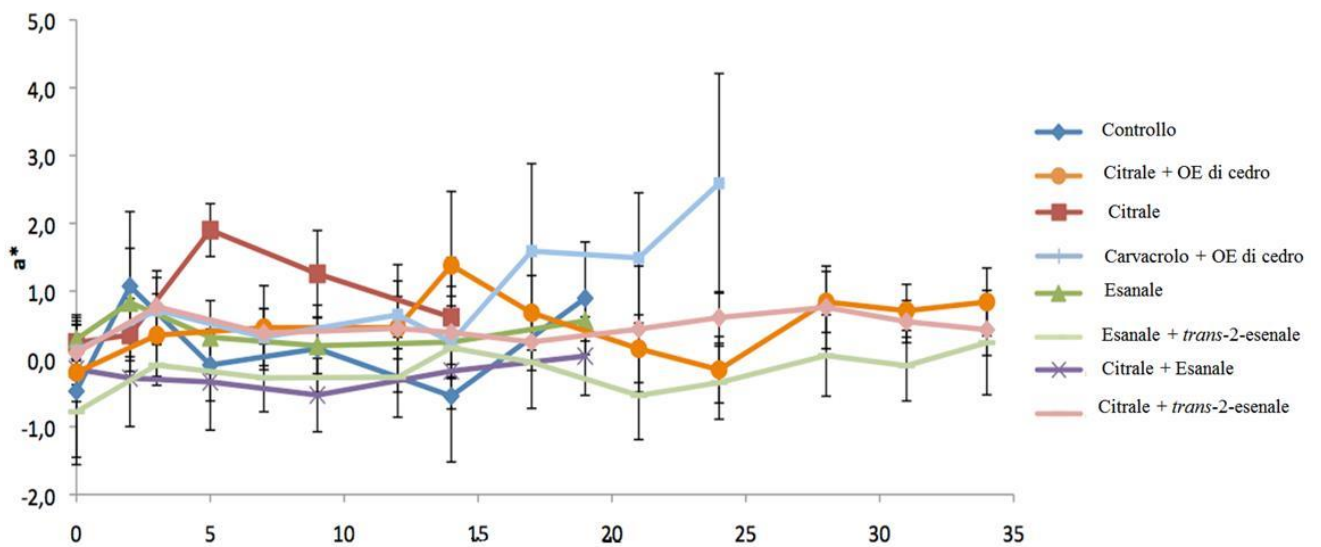
### CITRALE + *trans*-2-ESENALE



### ESANALE + *trans*-2-ESENALE



Per quanto concerne  $a^*$ , come riportato in figura 7.14, i diversi trattamenti non sembrano modificare significativamente questo parametro. Le successive modificazioni sembrano seguire l'andamento registrato per la luminosità. In particolare, i campioni trattati con la miscela citrale + *trans*-2-esenale e la miscela *trans*-2-esenale + esanale hanno mostrato una buona ritenzione del parametro  $a^*$  mentre il citrale ha causato un incremento istantaneo rispetto al controllo. Diversamente la combinazione di citrale e olio di cedro ha dato luogo ad un'interazione positiva specialmente nella seconda parte dello stoccaggio dei prodotti a base mela. I dati ottenuti nella mia sperimentazione sono comunque in accordo con Lanciotti *et al.* (1999) e Corbo *et al.* (2000) secondo cui i trattamenti di prodotti a base mela con esanale o *trans*-2-esenale ritardano l'imbrunimento enzimatico, causando una disattivazione delle polifenolossidasi, particolarmente se associata alle atmosfere modificate. Questi autori hanno proposto come meccanismo di inibizione la precoce formazione di alcoli dalle aldeidi utilizzate (da esanale ad etanolo) nonché l'effetto inibitorio dell'esanale sulla fenilalanina ammonio liasi, enzima responsabile della formazione di polifenoli substrato delle polifenolossidasi.



**Figura 7.14** - Evoluzione del parametro  $a^*$  nei diversi campioni di mela in relazione al trattamento subito.

In figura 7.15 è riportata invece la durezza dei cubetti di mela durante lo stoccaggio. Immediatamente dopo trattamento, i campioni trattati con citrale, la miscela citrale + OE di cedro, la miscela citrale + *trans*-2-esenale e la miscela esanale + *trans*-2-esenale hanno mostrato parametri di durezza leggermente maggiori rispetto al controllo. I campioni trattati con dipping tradizionali hanno subito un decremento di tale parametro così come i campioni trattati con citrale, la miscela citrale + OE di cedro e la miscela carvacrolo + OE di cedro. Diversamente i campioni trattati con esanale, pur mostrando un decremento di durezza nella prima parte della conservazione, hanno mostrato complessivamente una buona ritenzione di texture fino al 19° giorno di stoccaggio. Tuttavia, la migliore ritenzione di tale parametro è stata osservata in campioni trattati con la miscela esanale + *trans*-2-esenale fino a 34 giorni di stoccaggio.

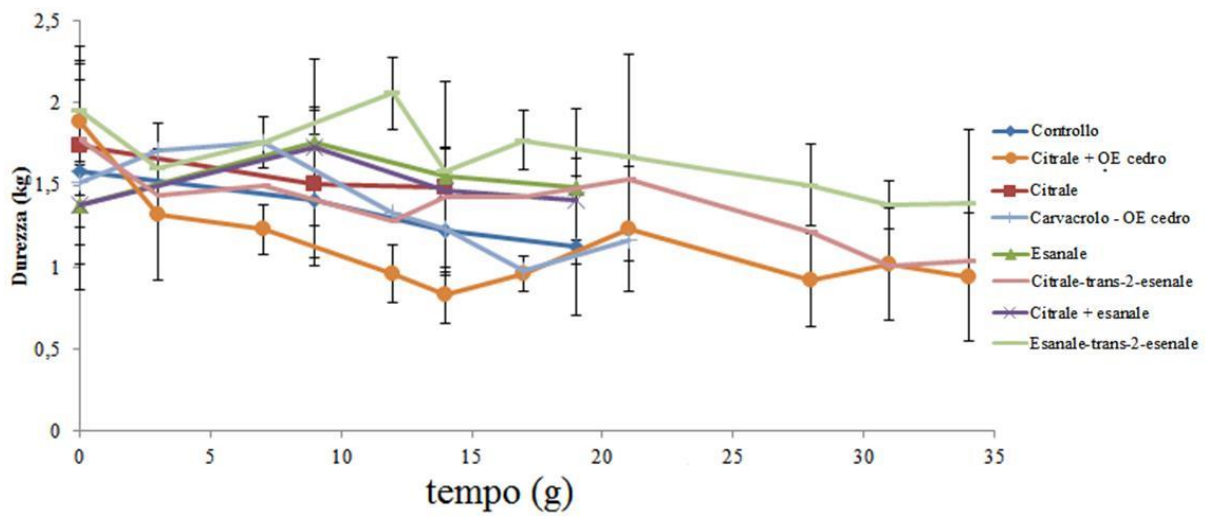


Figura 7.15 - Evoluzione della durezza nei diversi campioni di mela in relazione al trattamento subito.







## *Conclusioni*

In questo progetto si è voluto valutare l'efficacia dell'olio essenziale di cedro e di alcuni costituenti bioattivi degli oli essenziali nel ritardare lo sviluppo degli agenti responsabili del deterioramento dei prodotti minimamente processati a base mela. Infatti, gli antimicrobici hanno ritardato il raggiungimento della soglia di deterioramento di 3-10 giorni rispetto ai controlli.

Tra le condizioni testate il citrale e la miscela esanale +*trans*-2-esenale sono risultati i più efficaci nell'inibire la crescita dei lieviti, i quali, dopo 21 giorni di conservazione non hanno raggiunto la soglia. Sebbene tutti i composti utilizzati hanno determinato uno specifico profilo aromatico al gascromatografo, non ha influenzato i profili al naso elettronico dei campioni che si sono raggruppati principalmente sulla base del tempo di conservazione. Eccezioni erano rappresentati dai campioni aggiunti con citrale o esanale conservati per 3 giorni che sono stati raggruppati con i campioni conservati fino a 10 giorni; dimostrando che non ci sono state modifiche significative durante la *shelf-life* di questi campioni.

I risultati delle analisi fisiche hanno mostrato che in generale fino al quarto-settimo giorno di conservazione, i campione di controllo hanno mantenuto meglio il loro colore iniziale e la consistenza. Gli effetti benefici dell'impiego dell'olio essenziale e dei composti naturali risulta più evidente nella seconda parte del periodo di conservazione, che suggerisce l'uso potenziale di questi trattamenti per la conservazione prolungata di prodotti minimamente processati a base mela.

L'ottimizzazione del processo produttivo e l'adozione dell'atmosfera modificata hanno significativamente incrementato la *shelf-life* del prodotto, in particolare i lieviti raggiungevano la soglia di alterazione solo nei campioni di controllo confezionati in atmosfera ordinaria, mentre in tutti gli altri campioni non raggiungevano tale soglia entro i 35 giorni di conservazione considerati. D'altra parte è noto che l'atmosfera modificata è molto efficace nel ritardare la crescita microbica e i processi degradativi di prodotti di IV gamma a base di frutta. I dati di colore e consistenza indicano come miscele più efficaci nel preservare le caratteristiche di freschezza delle materie prime quelle a base di citrale + *trans*-2-esenale e esanale+*trans*-2-esenale. Tali miscele di antimicrobici naturali hanno consentito

quando applicate unitamente all'atmosfera modificata di mantenere la colorazione ottimale del prodotto per oltre 35 giorni.

Per tanto i risultati ottenuti possono avere una grande potenzialità applicativa, indicando che l'uso di oli essenziali o loro componenti unitamente ad altri ostacoli, come il confezionamento in atmosfera modificata, possono estendere la *shelf-life* dei prodotti a base mela senza effetti negativi sulla qualità generale del prodotto.



## *Bibliografia*



Abadias M., Canamas T. P., Asensio A., Anguera M., Vinas I. (2006): “*Microbial quality of commercial ‘Golden Delicious’ apples throughout production and shelf-life in Lleida (Catalonia, Spain)*”. *International Journal of Food Microbiology*. 108, 404-409.

Abadias M., Alegre I., Usall J., Torres R., Vinas I. (2011): “*Evaluation of alternative sanitizers to chlorine disinfection for reducing foodborne pathogens in fresh-cut apple*”. *Postharvest Biology and Technology*. 59: 289-297.

Abadis M., Alegre I., Vinas I., Usall J., Anguera M. (2011): “*Microbiological and physiological quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain Lactobacillus rhamnosus GG*”. *Food Microbiology*. 28, 59-66.

Alegre I., Abadias M., Anguera M., Oliveira M., Vinas I. (2010): “*Factors affecting growth of foodborne pathogens on minimally processed apples*”. *Food Microbiology*. 27, 70-76.

Alegre I., Vinas I., Usall J., Anguera M., Abadis M. (2012): “*An Enterobacteriaceae species isolated from apples controls foodborne pathogens on fresh-cut apples and peaches*”. *Postharvest Biology and Technology*. 74, 118-124.

Ahvenainen R. (1996): “*New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetable*”. *Trends in Food Science & Technology*. 7, 179-187.

Allende A., Selma M.V., López-Gálvez F., Villaescusa R., Gil M.I. (2008): “*Role of commercial sanitizers and washing systems on epiphytic microorganisms and sensory quality of fresh-cut scarole and lettuce*”. *Postharvest Biology and Technology*. 49:155-163.

Anino S.V., Salvatori D.M., Alzamora S.M. (2006): “*Changes in calcium level and mechanical properties of apple tissue due to impregnation with calcium salts*”. Food Research International. 39: 154-164.

Ayala-Zavala J.F., del Toro-Sánchez L., Alvarez-Parrilla E., Soto-Valdez H., Martín-Belloso O., Ruiz-Cruz S. e González-Aguilar G.A. (2008): “*Natural antimicrobial agents incorporated in active packaging to preserve the quality of fresh fruits and vegetables*”. Stewart Postharvest Review. 4: 1-9.

Belletti N., Ndagijimana M., Sisto C., Guerzoni M.E., Lanciotti R., Gardini F. (2004): “*Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on Saccharomyces cerevisiae*”. Journal of Agricultural Food Chemistry. 52: 6932-6938.

Belletti N., Lanciotti R., Patrignani F., Gardini F. (2008): “*Antimicrobial efficacy of citron essential oil on spoilage and pathogenic microorganisms in fruit-based salads*”. Journal of Food Science. 73: M331-338.

Bennik M. H. J., Van Overbeek W., Smid E. J. e Gorris L. G. M. (1999): “*Biopreservation in modified atmosphere stored mugbean sprouts: the use of vegetable-associated bacteriocinogenic lactic acid bacteria to control the growth of Listeria monocytogens*”. Letters in Applied Microbiology. 28: 226-232.

Beuchat L. R. (1998): “*Surface decontamination of fruit and vegetables eaten raw: a review*”. Food Safety Unit, World Health Organization. WHO/FSF/FOS/98.2.

Beuchat L. R. (2002): “*Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables*”. Microbes and Infection. 4: 413-423.



Burt S. A. (2004): “*Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review*”. International Journal of Food Microbiology. 94: 223-253.

Burt S. A., Reinders R. D. (2003): “*Antibacterial activity of selected plant essential oils against Escherichia coli O 157:H7*”. Letters in Applied Microbiology. 36 (3): 162-167.

Caccioni D. R. L., Guizzardi M., Biondi D. M., Renda A., Ruberto G. (1998): “*Relationships between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on Penicillium digitatum and Penicillium italicum*”. International Journal of Food Microbiology. 43: 73-79.

Chang Y., Cronan J. E. (1999): “*Membrane cyclopropane fatty acid content as a major factor in acid resistance of Escherichia coli*”. Molecular Microbiology. 33: 249-59.

Cocolin L. S., Comi G. (2007): “*La microbiologia applicata alle industrie alimentari*”. Aracne editrice. 6: 368-369.

Conway W. S., Leverentz B., Saftner R. A., Janisiewicz W. J., Sams C. E., Leblanc E. (2000): “*Survival and growth of Listeria monocytogenes on fresh-cut apple slices and its interaction with Glomerella cingulata and Penicillium expansum*”. Plant Disease. 84: 177-181

Corbo M. R., Bevilacqua A., Campaniello D., D’Amato D., Speranza B. e Sinigaglia M. (2009): “*Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and non-thermal approaches- a review*”. International Journal of Food Science and Technology. 44: 223-241.

Corbo M. R., Lanciotti R., Gardini F., Sinigaglia M., Guerzoni M. E. (2000): “*Effects of hexanal, trans-2-hexenal, and storage temperature on shelf life of fresh sliced apples*”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 2401-2408.

Corbo M.R., Speranza B., Campaniello D., D’Amato D. e Sinigaglia M. (2010): “*Fresh-cut fruits preservation: current status and emerging technologies*”. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 1143-1154.

D’Amato D., Sinigaglia M., Corbo M.R. (2010): “*Use of chitosan, honey and pineapple juice as filling liquids for increasing the microbiological shelf life of a fruit-based salad*”. *International Journal of Food Science and Technology*. 45: 1033-1041.

De Azeredo G. A., Stamford T. L. M., Nunes P. C., Neto N. J. G., de Oliveira M. E. C., de Souza E. L. (2011): “*Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables*”. *Food Research International*. 44: 1541-1548.

Dorman H. J. D., Deans S. G. (2000): “*Antimicrobial against from plants: antimicrobial activity of plant volatile oils*”. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 308-316.

Esmaeili A., Tavassoli A. (2010): “*Microbial transformation of citral by *Penicillium* sp.*” *Acta Biochimica Polonica*. 57: 265-268.

FDA - Food and Drug Administration (2010): “*Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Fresh-cut Fruits and Vegetables*”.

FDA/CFSAN (2004): “*Methods to reduce-eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. In: Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction-elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce*”.

Fisher K., Phillips C. (2008): “*Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?*”. Trends of Food Science & Technology. 19: 156-164

Flamini G., Tebano M., Cioni P.R. (2007): “*Volatiles emission patterns of different plant organs and pollen of Citrus limon*”. Analytica Chimica Acta. 589: 120-124.

Francis G. A., Thomas C., O’Beirne D. (2001): “*The microbiological safety of minimally processed vegetables*”. International Journal of Food Science and Technology. 34: 1-22.

Gardini F., Lanciotti R., Caccioni D. R. L., Guerzoni M. E. (1997): “*Antifungal activity of hexanal as dependent on its vapor pressure*”. Journal of Agricultural Food Chemistry. 45: 4297-4302.

Gil M.I., Selma M.V., López-Gálvez F., Allende A. (2009): “*Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions.*” International Journal of Food Microbiology. 134: 37-45.

Gómez-López V.M., Devlieghere F., Ragaert P., Debevere J. (2007): “*Shelf-life extension of minimally processed carrots by gaseous chlorine dioxide*”. International Journal of Food Microbiology. 116: 221-227.

Gonzalez-Aguilar G.A., Ayala-Zavala J.F., Olivas G.I., de la Rosa L.A., Alvarez-Parrilla E. (2010): “*Preserving quality of fresh-cut products using safe technologies*”. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. 5: 65-72.

Gorny J.R., Cifuentes R.A, Hess-Pierce B.H., Kader A.A. (2000): “*Quality changes in fresh-cut pear slices as affected by cultivar, ripeness stage, fruit size and storage regime*”. Journal of Food Science. 65: 541-544.

Gunes G. G., Hotchkiss J. H. (2002): “*Growth and survival of Escherichia coli O157 : H7 on fresh-cut apples in modified atmospheres at abusive temperatures*”. Journal of Food Protection. 65: 1641-1645.

Gutierrez J., Bourke P., Lonchamp J., Barry-Ryan C. (2009): “*Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables*”. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 10: 195-202.

Harris L. J., Farber J. N., Beuchat L. R., Parish M. E., Suslow T. V., Garret E. H., Busta F. F. (2003): “*Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce*”. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2: 78-141.

Hart H., Craine L. E., Hart D. J., Hadad C. M. (2008): “*Chimicaorganica*”. Zanichelli. 186,199, 399-400.

Hatanaka A. (1993): “*The biogeneration of green odour by green leaves*”. Phytochemistry. 34: 1201-1218,

Hayes A. J., Markovic B. (2002): “*Toxicity of Australian essential oil Backhousia citriodora (lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity*”. Food and Chemical Toxicology. 40: 535-43.

Helander I. M., von Wright A., Matilla-Sandholm T. M. (1997): “*Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria*”. Trends in Food Science & Technology. 8: 146-150.

Hutchinson S. A. (1971): “*Biological activity of volatile fungal metabolites*”. Transactions of the British Mycological Society. Volume 57, Issue 2.

Kramer J., Cantoni C. (2011): “*Alimenti, microbiologia e igiene*”. Tecniche nuove.

Lambert R. J. W., Skandamis P. N., Coote P., Nychas G. J. E. (2001): “*A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol*”. Journal of Applied Microbiology. 91: 453-462.

Lanciotti R., Corbo M.R., Gardini F., Sinigaglia M., Guerzoni M.E. (1999): “*Effect of hexanal on the shelf life of fresh apple slices*”. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 47:4769-4776.

Lanciotti R., Belletti N., Patrignani F., Gianotti A., Gardini F., Guerzoni M. E. (2003): “*Application of Hexanal, (E)-2-Hexenal, and Hexyl Acetate To Improve the Safety of Fresh-Sliced Apples*”. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51: 2958-2963

Lanciotti R., Gianotti F., Patrignani F., Belletti N., Guerzoni M.E. , Gardini F. (2004): “*Use of natural aroma compounds to improve shelf life and safety of minimally processed fruits*”. Trends in Food Science & Technology. 15: 201-208.

Leepipattanawit R., Beaudry R.M. e Hernandez R.J. (1996): “*Control of decay in modified-atmosphere packages of sliced apples using 2-nonanone vapor*”. Journal of Food Science. 64: 1043-1057.

Leistner L. (1978): “*Food Quality and Nutrition*”. Applied Science Publishers. 553-557.

Leistner L. (1995): “*Principles and applications of hurdle technology, new methods of food preservation*”. G.W. Could, (ed.), Blackie Academic & Professional, London.

Lin C. M., Wei C.I. (1997): “*Transfer of Salmonella montevideo onto interior surfaces of tomatoes by cutting*”. Journal of Food Protection. 6: 858-863.

López-Gálvez F., Allende A., Selma M. V., Gil M. I. (2009): “*Prevention of Escherichia coli cross-contamination by different commercial sanitizers during washing of fresh-cut lettuce*”. International Journal of Food Microbiology. 133: 167–171.

Lunati F. (1994): “*Si fanno largo i prodotti della IV gamma*”. Agricoltura nuova, n° 7.

McGuire R. G. (1992): “*Reporting of objective color measurements*”. Hortscience. 27: 1254-1255.

McNeil M., Facey P., Porter R. (2011): “*Essential oils from the Hyptis genus - A review (1909-2009)*”. Natural Product Communications. 6: 1775-1796.

Moleyar V. e Narasimham P. (1992): “*Antibacterial activity of essential oil components*”. International Journal of Food Microbiology. 16 (4): 337-342.

Morgante R.A., Mencaroni G., Scuota S., Cenc T. (2008): “*Survey on Minimally processed vegetables - Indagine conoscitiva sui vegetali di IV gamma*”. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche Webzine Sanità Pubblica Veterinaria: Numero 50-51.

Nannapaneni R., Chalova V. I., Story R., Wiggins K. C., Crandall P. G., Ricke S. C., Johnson M. G. (2009): “*Ciprofloxacin-sensitive and ciprofloxacin-*

*resistant Campylobacter jejuni are equally susceptible to natural orange oil-based antimicrobials*". Environmental Science and Health. B 44: 571-577.

Nguyen C., Carlin F. (1994): "*The microbiology of minimally processed fresh fruit and vegetable*". CRC Critical Review in Food Science and Nutrition. 34: 371-401.

Ölmez H., Kretzschmar U. (2009): "*Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact*". LWT- Food Science and Technology. 42:686–693.

Ozdemir M., Floros J.D. (2004): "*Active food packaging technologies*". Critical Review in Food Science and Nutrition. 44: 185-193.

Patrignani F., Iucci L., Belletti N., Gardini F, Guerzoni M.E., Lanciotti R. (2008): "*Effects of sub-lethal concentrations of hexanal and 2-(E)-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile compounds of Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Salmonella enteritidis and Escherichia coli*". International Journal of Food Microbiology. 123: 1–8.

Patrignani F., Tabanelli G., Siroli L., Gardini F., Lanciotti R. (2013): "*Combined effects of high pressure homogenization treatment and citral on microbiological quality of apricot juice*". International Journal of Food Microbiology. 160: 273-281.

Pedretti M. (2003): "*Chimica e farmacologia delle piante medicinali*". Studio edizioni. 62-64: 66-70.

Perry J. J., Staley J. T., Lory S. (2004): "*Microbiologia - Fisiologia, genetica, virologia, evoluzione e diversità*". Zanichelli.

Powell D., Luedtke A. (2000): “*Fact sheet: a timeline of fresh juice outbreaks*”. Food Safety Risk Management and Communication Project, Food Safety Network.

Raven P. H., Evert R. F., Eichhorn S. E. (2002): “*Biologia delle piante*”. Zanichelli. 34-39, 797-798.

Raybaudi-Massilia R. M., Mosqueda-Melgar J., Sobrino-López A., Soliva-Fortuny R., Martín-Belloso O. (2007): “*Shelf-life extensión of fresh-cut Fuji apples at different ripeness stages using natural substances*”. Postharvest Biology and Technology. 45: 265-275.

Rico D., Martín-Diana A. B., Barat J. M., Barry-Ryan C. (2007): “*Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review*”. Trends in Food Science & Technology. 18: 373-386.

Rocculi P., Romani S., Venier E., Dalla Rosa M., Mastrocola D. (2003): “*Aspetti tecnologici dei prodotti a base di frutta trasformati “al minimo” (IV gamma)*”. Rivista di Frutticoltura. 3: 23-31.

Roller S., Seedhar P. (2002): “*Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4° and 8°C*”. Letters in Applied Microbiology. 35: 390-394.

Rojas-Grau M. A., Roybaudi-Massilia R. M., Soliva-Fortuny R. C., Avena-Bustillos R. J., McHugh T. H., Marin-Belloso O. (2007): “*Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples*”. Postharvest Biology and Technology. 45: 254-264.



Rota M. C., Herrera A., Martinez R. M., Sotomayor J. A., Jordán, M. (2008): “*Antimicrobial activity and chemical composition of Thymus vulgaris, Thymus zygis and Thymus hyemalis essential oils*”. Food Control. 19: 681-687.

SadoKamden, S. L., Ndagijimana M., Vannini L., Guerzoni M. E. (2007): “*Differentiation of fresh seafood products and storage time using an electronic nose: features selection for data analysis*”. Italian Journal of Food Science. Special Issue (SLIM 2006): 393-399.

Sagdic O, Ozturk I., Tornuk F. (2013): “*Inactivation of non-toxigenic and toxigenic Escherichia coli O157:H7 inoculated on minimally processed tomatoes and cucumbers: Utilization of hydrosols of Lamiaceae spices as natural food sanitizers*”. Food Control. 30: 7-14.

Serrano M, Martínez-Romero D., Guillén F., Valverde J. M., Zapata P. J., Castillo S., Valero D. (2008): “*The addition of essential oils to MAP as a tool to maintain the overall quality of fruits*”. Trends of Food Science and Technology. 19: 464-471.

Shewfelt, R. L. (1987): “*Quality of minimally processed fruits and vegetables*”. Journal of Food Quality. 10: 143-156.

Soliva-Fortuny R.C., Martín-Belloso O. (2003): “*New advances in extending the shelf life of fresh-cut fruits: a review*”. Trends in Food Science & Technology. 14: 341-353.

Tassou, C., Koutsoumanis K., Nychas G. J. E. (2000): “*Inhibition of Salmonella enteritidis and Staphylococcus aureus in nutrient broth by mint essential oil*”. Food Research International. 33: 273-280.

Utama I. M. S., Willis R. B. H., Ben-Yehoshua S., Kuek C. (2002): “*In vitro efficacy of plant volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetable decay microorganisms*”. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50: 6371-6377.

Valero E., Varon R., Garcia-Carmona F. (1990): “*Inhibition of grape polyphenol oxidase by several aliphatic alcohols*”. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 38: 1097-1103.

Vandekinderen I., Devlieghere F., De Meulenaer B., Ragaert P., Van Camp J. (2009): “*Decontamination strategies for fresh-cut produce*”. Stewart Postharvest Review. 5: 1-8.

Van Vuuren S.F., Suliman S., Dhorat S., Viljoen A.M. (2007): “*The pharmacological interaction of commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials*”. South African Journal of Botany. 73 (2): 339-40.

Velani S., Roberts D. (1991): “*Listeria monocytogenes and other listeria ssp. in pre packed mixed salads and individual salad ingredient*”. PHLS Microbiology digest. 8: 21-22.

Wuryatmo E., Klieber A., Scott E. S. (2003): “*Inhibition of citrus postharvest pathogens by vapor of citral and related compounds in culture*”. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51: 2637-40.

Zwietering M. H., Jongenburger I., Rombouts F. M., Van 't Riet C. (1990): “*Modelling of the bacterial growth curve*”. Applied and Environmental Microbiology. 56: 1875–1881.





## ***RINGRAZIAMENTI***

Non è facile citare e ringraziare, in poche righe, tutte le persone che hanno contribuito alla nascita e allo sviluppo di questa tesi di laurea: chi con una collaborazione costante, chi con un supporto morale o materiale, chi con consigli e suggerimenti o solo con parole di incoraggiamento, sono stati in tanti a dare il proprio apporto alla mia carriera universitaria e a questo lavoro.

Innanzitutto vorrei esprimere la mia gratitudine alla prof.ssa Rosalba Lanciotti, relatore di questa tesi, per la grande disponibilità, il supporto e la cortesia dimostratami in questi mesi. Un doveroso ringraziamento va alla dott.ssa Francesca Patrignani e al dott. Lorenzo Siroli per l'aiuto datomi in laboratorio e per aver dedicato numerose ore alla mia tesi.

Grazie ovviamente a *Libero, Fosca, Gian Luca, Lety, Marina e Gigi* e a tutti i componenti della famiglia per non avermi mai ostacolato e per avermi dato la libertà di fare le mie scelte e di prendermi le mie responsabilità. Vi ringrazio per non essere mai (???) stati opprimenti, pesanti ed invadenti e per aver sopportato il mio pessimo carattere. Grazie a *Paola e Giovanni*, per esserci sempre e per l'immancabile aperitivo del sabato e del caffè della domenica; *Nona, Nono e Sergio*.

Ora viene il bello, perché spero di non dimenticare nessuno. Grazie infinite a *Francesca* per essere lei, per i suoi consigli, per il supporto dimostrato e per esserci sempre; *Massi* per le indimenticabili trasferte Cotignola-Cesena "pompano sempre il pugno", per le chiacchiere e per avermi supportato-sopportato in questi anni di università. Vorrei ringraziare i miei compagni di corso, presenti e passati, *Chiara* per avermi aiutato in laboratorio e per le belle serate extra-universitarie; *Simona* per le sparlate fatte in biblioteca e per il sorriso sempre dimostratomi.

Grazie a tutti gli amici, compresi i 9 ore del Mc, che ho avuto l'onore di conoscere in tutti questi anni.

Ringrazio infine tutto il gruppo di Microbiologia, tutti i professori che ho avuto e tutto il personale del Campus di Scienze e Tecnologie Alimentari.

Spero di non aver dimenticato nessuno o aver fatto dei permali, in ogni caso si può sempre rimediare con una uscita e una birra....

