

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI

CORSO DI LAUREA IN TECNOLOGIE ALIMENTARI

TESI

in

Tecnologie Alimentari

**EFFETTO DEI CAMPI ELETTRICI PULSATI SULLE
CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE DI FRAGOLE FRESCHE
E LIOFILIZZATE**

RELATORE

Chiar.mo Prof. Pietro Rocculi

CORRELATORI

Dott.ssa Silvia Tappi

Dott.ssa Urszula Tylewicz

CANDIDATO

Federico Drudi

Matricola N°

0000793125

Anno accademico 2018/2019

Sessione unica

Riassunto

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di investigare l'effetto del pretrattamento con campi elettrici pulsati (PEF) sulle cinetiche di reidratazione di fragole liofilizzate. Le fragole sono state trattate a 50Hz , con impulsi di $20\ \mu\text{m}$ e intensità di 100 e $200\ \text{V/cm}$; i campioni sono stati successivamente congelati e liofilizzati. La reidratazione è stata svolta immergendo i campioni in acqua per tempi diversi fino a 60min . La reversibilità del trattamento è stata valutata tramite analisi al microscopio. Durante la reidratazione sono state valutate le cinetiche di aumento di peso, contenuto in acqua e attività dell'acqua. Inoltre, tramite calorimetro differenziale a scansione (DSC) sono state valutate l'acqua congelabile e la temperatura di transizione vetrosa. I risultati hanno mostrato come il trattamento irreversibile (200V/cm) abbia permesso di raggiungere un livello di idratazione maggiore, in termini di peso, contenuto in acqua ed attività dell'acqua. Al contrario, il campione trattato a 100V/cm , risultato causare un'elettroporazione reversibile, non ha mostrato differenze significative rispetto al campione non trattato. Tuttavia, dall'analisi effettuate tramite DSC non sono emerse differenze significative tra i campioni.

Indice

Introduzione	6
1 Parte generale	9
1.1 Le fragole	9
1.1.1 Descrizione del frutto	9
1.1.2 Tecniche di coltivazione	10
1.1.3 Lavorazioni secondarie del prodotto	10
1.2 Pulsed Electric Field (PEF)	11
1.2.1 Principio di funzionamento	12
1.2.2 Applicazione dei PEF in campo alimentare	15
1.2.3 Il PEF come pretrattamento alla liofilizzazione	18
2 Materiali e metodi	21
2.1 Preparazione del campione	21
2.2 Trattamento con campi elettrici pulsati (PEF)	21
2.3 La liofilizzazione	22
2.4 Reidratazione	22
2.5 Determinazioni analitiche	23
2.5.1 Vitalità cellulare	23
2.5.2 Attività dell'acqua (A_W)	23
2.5.3 Contenuto in acqua	24
2.6 Analisi termiche tramite calorimetria differenziale a scansione (DSC)	24
2.6.1 Analisi dei dati	26
3 Risultati e discussione	27
3.1 Analisi dati reidratazione	27
3.1.1 Vitalità cellulare	27
3.1.2 Cinetica di reidratazione	27
3.2 Contenuto in acqua	28
3.2.1 Analisi dell'acqua (A_W)	29
3.2.2 Calorimetria differenziale a scansione	29

4 Conclusioni	33
Bibliografia	33

Introduzione

Il trattamento con campi elettrici pulsati (PEF) su tessuti vegetali ha dimostrato possedere un effetto migliorativo nei fenomeni di trasferimento di massa, tramite l'effetto di elettroporazione delle membrane cellulari.

La variazione reversibile o irreversibile della permeabilità delle membrane dovuta alla formazione di pori, è in grado di causare l'aumento della velocità di processi quali per esempio essiccamento, congelamento e liofilizzazione.

La riduzione dei tempi di processo è fondamentale dal punto di vista della sostenibilità; pertanto l'implementazione di trattamenti PEF a livello industriale è di particolare interesse. Inoltre, secondo diversi studi di letteratura, in seguito a pretrattamento con PEF, i vegetali sono in grado di mantenere meglio le caratteristiche strutturali e la qualità visiva durante il processo, portando ad una maggiore qualità del prodotto finito. Tuttavia, nonostante gli studi sulle cinetiche di disidratazione di prodotti pretrattati con PEF siano numerosi, sono scarse le informazioni relative al comportamento dei prodotti durante la reidratazione.

Pertanto, lo scopo di questa ricerca, è stato quello di valutare l'effetto del pretrattamento con PEF sulle cinetiche di reidratazione di fragole precedentemente sottoposte a liofilizzazione.

A tal fine, due livelli di campo elettrico, corrispondenti all'induzione di elettroporazione reversibile o irreversibile, sono stati applicati a campioni di fragola poi sottoposti a liofilizzazione. I campioni sono stati poi reidratati tramite immersione in acqua e sono state valutate le cinetiche di aumento di peso, contenuto in acqua e attività dell'acqua rispetto ad un campione di controllo non trattato.

Inoltre, la calorimetria differenziale a scansione è stata utilizzata per determinare il contenuto in acqua congelabile e la temperatura di transizione vetrosa.

Capitolo 1

Parte generale

1.1 Le fragole

La fragola è un frutto molto apprezzato dai consumatori e caratterizzato da un alto valore economico, difatti la produzione mondiale è in costante aumento (FAO 2000-2017) fin dagli anni duemila. Le varietà comunemente coltivate (*Fragaria x ananassa*) hanno avuto origine nel XVIII secolo dall'incrocio interspecifico tra *Fragaria Virginiana* e *Fragaria Chiloensis* e successive ibridazioni. Queste varietà sono caratterizzate dal produrre frutti grossi, con colorazioni intense ed un elevato contenuto zuccherino.

La fragola è però caratterizzata anche da una ridotta *shelf-life* (non più di qualche giorno) e da una difficile gestione in post raccolta. Questo, unitamente all'alto apprezzamento dei consumatori, ha reso la fragola un frutto molto studiato, non solo dal punto di vista agronomico ma anche tecnologico con l'obiettivo di preservarne la qualità e i tratti nutrizionali il più a lungo possibile (Hancock 1999)

1.1.1 Descrizione del frutto

La fragola botanicamente è un falso frutto, ovvero il ricettacolo ingrossato di un'inflorescenza sul quale sono disposti i vari frutti, detti acheni, che sono invece neri e di piccole dimensioni. La fragola quindi è costituita dal tessuto spugnoso centrale dell'asse ricetticolare dal quale si diramano varie logge. Queste sono più carnose e succulente, sono separate le une dalle altre dai vasi che portano i nutrienti agli acheni (Hancock 1999).

Il frutto si compone per circa il 90% da acqua e il restante 10% dai solidi solubili totali ovvero principalmente (40%) zuccheri riducenti quali fruttosio e glucosio (circa l'80% del totale degli zuccheri presenti). Altri componenti rilevanti sono l'acido citrico e la vitamina C (Salunkhe et al. 1995; Hancock 1999). Vi sono infine moltissimi composti presenti in minime quantità che partecipano alla colorazione e all'aroma del frutto, sostanze di questo tipo sono ad esempio i polifenoli (il più rappresentativo nella fragola è l'acido ellagico) e molte sostanze volatili a basso peso molecolare (aldeidi, esteri, eteri ecc...). Quantità e concentrazione di questi composti minori

sono fortemente influenzati dalle condizioni ambientali di coltivazione e dal livello di maturazione raggiunto dal frutto (Salunkhe et al. 1995; Hancock 1999).

1.1.2 Tecniche di coltivazione

Le fragole sono una specie vegetale estremamente studiata e nel tempo si sono riuscite a creare varietà e tecniche produttive che ne hanno permesso un florido sviluppo ed una coltivazione dislocata in un areale più ampio possibile (Hancock 1999).

Le tecniche di coltivazione di questa pianta hanno seguito un notevole sviluppo tecnologico nell'arco dell'ultimo secolo ma tuttora i due principali sistemi colturali sono il sistema libero e quello a collinette i quali possono essere utilizzati sia in pieno campo che sotto i tunnel (in caso di climi più freddi o per anticiparne il periodo di raccolta). Il primo è caratterizzato da una semina primaverile e lo si predilige in climi più freddi e con una disponibilità di ore di luce ridotta (tipico quindi di climi continentali del nord Europa). Il sistema a collinette preferisce allo stesso modo cultivar brevidiurne ma si addice di più a climi mediterranei con inverni più miti, la semina inoltre è estiva o invernale.

La differenza sostanziale però fra i due sistemi sta nella produzione, nella durata della coltura e nelle metodiche con cui la pianta si lascia crescere. Il sistema a collinette si basa sull'eliminazione degli stoloni e concentra la produzione solo sulle piante originariamente poste a dimora, queste si ritrovano su collinette alte circa 15-25cm in file parallele e con una pacciamatura eseguita con film plastici di colorazione scura (permettendo un ottimo controllo delle infestanti, il riscaldamento del suolo vicino alle radici e una migliore protezione del frutto dallo sporco). Queste condizioni aumentano i costi di gestione del campo ed inoltre riducono la durata utile della coltura che si rinnova annualmente o al massimo ogni due anni. Questo maggiore sforzo è però giustificato dal rilevante aumento di produzione rispetto al sistema libero, che quindi si cerca di evitare e si utilizza solo in climi non sufficientemente caldi (Hancock 1999).

La conduzione libera invece basa la sua produzione sul libero sviluppo non solo delle piantine originariamente poste in campo ma soprattutto degli stoloni da esse prodotte i quali vengono indirizzati in strette file mediante l'uso di una pacciamatura di paglia e non di materiale plastico. Tale sistema quindi non necessita di una sistemazione a collinette del terreno, ha un sesto d'impianto più largo e permette di avere una produzione sufficiente per più tempo (dai due ai cinque anni). Questo rende quindi il sistema molto più economico da gestire riuscendo a far fronte alla ridotta produzione e assicurandone quindi un'economicità quando, a causa delle condizioni climatiche, non risulta economicamente vantaggioso l'utilizzo del sistema a collinette (Hancock 1999).

1.1.3 Lavorazioni secondarie del prodotto

La raccolta del prodotto è generalmente manuale a causa della delicatezza e della facilità con cui si formano ammaccature sul frutto raggiunta la maturazione commerciale. Questa viene svolta preferibilmente quando la colorazione rossa finale della fragola ha raggiunto i 3/4 del totale così da

poter garantire una maggior conservabilità senza ridurre eccessivamente le qualità organolettiche del frutto. In ogni caso è da evitare una raccolta con frutti ben maturi o sovramaturi in quanto questo comporta un velocissimo rammollimento dei tessuti ed un loro imbrunimento rendendo il frutto non commerciabile a lungo (Hancock 1999).

Le lavorazioni svolte in post raccolta sul prodotto fresco sono poche e consistono essenzialmente nella rimozione più rapida possibile del calore di campo dai frutti raccolti. Questo è un passaggio cruciale per la conservabilità del prodotto che se svolto adeguatamente, ovvero raggiungendo entro le 3 ore dalla raccolta temperature di 5°C, permette di avere una *shelf-life* che raggiunge i 5-10 giorni. I processi di raffreddamento dei frutti possono avvenire passivamente, tramite correnti forzate d'aria refrigerata oppure mediante un raffreddamento ad acqua (più veloce ed efficiente ma può causare problematiche dovute alla *cross-contamination* dei frutti) (Hancock 1999).

Altra tecnica molto usata nel mantenimento dei frutti dopo la raccolta è l'utilizzo di atmosfere controllate, in quanto la fragola è dotata di una buona resistenza soprattutto ad elevati livelli di CO₂ che possono raggiungere il 10-20%. Questo permette di ottenere un buon effetto batteriostatico che rallenta lo sviluppo di muffe e il tasso di respirazione (Salunkhe et al. 1995).

A parte la commercializzazione di frutti freschi, le fragole sono enormemente soggette a processi di trasformazione che puntano ad ottenere prodotti con un valore aggiunto maggiore che mantengano però le caratteristiche salienti del frutto fresco ovvero il colore, l'aroma e le sostanze nutritive. Fra questi si annoverano lavorazioni classiche come la produzione di confetture e di succhi oppure lavorazioni volte ad ottenere creme e sciroppi poi utilizzati come ingredienti per altri prodotti. Vi sono infine altre lavorazioni di minore importanza che si possono adottare come i processi di disidratazione e preparazioni specifiche (frutta sotto spirito).

Per quanto riguarda i processi disidratativi si hanno più possibilità, dalla semplice essiccazione ad aria forzata fino alla più costosa liofilizzazione. Ovviamente la scelta è influenzata dalla qualità del prodotto finito che si vuole ottenere e dai costi.

Uno dei processi di trasformazione più utilizzati è il congelamento rapido dei singoli frutti (o di frazioni di essi) che permette di conservarli al meglio, il processo si svolge preferibilmente con l'uso di criogeni non tossici che posso andare a diretto contatto col frutto come N₂ e CO₂. Il frutto dopo il congelamento può essere venduto tal quale o, molto più comunemente, utilizzato da altre aziende come ingrediente per formulazioni di nuovi prodotti (Salunkhe et al. 1995).

1.2 Pulsed Electric Field (PEF)

I campi elettrici pulsati (*Pulsed Electric Field* o PEF) rappresentano una tecnologia di trattamento non termico di recente sviluppo ideata all'inizio del XX secolo ma che ha iniziato a svilupparsi più concretamente con impianti pilota ed applicazioni industriali solo dagli anni '50 e '60 del secolo scorso (Sitzmann et al. 2016). Tuttavia, prima della commercializzazione dei primi impianti di pastorizzazione tramite PEF si è dovuto aspettare gli anni 2000 e solo da pochi anni si è iniziato a commercializzare impianti per pretrattamenti su matrici vegetali di vario genere (Lelieveld et al.

2007, capitolo 2). Attualmente sono presenti una cinquantina di applicazioni industriali di impianti PEF in campo alimentare o meno (Töpfl 2017). Questa tecnologia infatti, non si limita al solo campo dell'industria alimentare, ma ha trovato notevoli applicazioni nel campo medico ed in tutte le bio-industrie (bioraffinerie, digestori ecc.) che vedono il recupero di sottoprodotti o l'utilizzo di materie vegetali alternative (Töpfl 2017).

1.2.1 Principio di funzionamento

Questa tecnologia innovativa si basa sull'applicazione di un campo elettrico pulsato (impulsi estremamente corti, nell'ordine dei ms, μ s e ns) il quale interagisce con le membrane cellulari del prodotto trattato (o del microrganismo da eliminare) andando a modificare la permeabilità di membrana mediante la formazione di micropori permanenti o temporanei sulla superficie delle membrane stesse (Donsì et al. 2010). A differenza del riscaldamento ohmico, il PEF applica un campo elettrico che, non essendo costante, riesce a minimizzare l'effetto Joule riducendo quindi il riscaldamento indotto nel prodotto. Questa è la caratteristica che ha reso il PEF una delle tecnologie emergenti più promettenti negli ultimi anni.

Come precedentemente indicato, l'azione principale del trattamento PEF è l'elettroporazione delle membrane cellulari. Sul meccanismo di funzionamento e sulla formazione stessa di questi micropori si è dibattuto a lungo in quanto inizialmente le conoscenze a riguardo erano molto ridotte, attualmente però dopo l'evoluzione degli studi a riguardo si è riuscito a comprendere al meglio il meccanismo che permette la creazione di questi pori nel doppio strato lipidico delle membrane (Silve 2017).



Figura 1.1: (a) Il grafico riporta il potenziale transmembrana a riposo ($\Delta\Psi_0$) e quello indotto ($\Delta\Psi_{tot}$). Si noti come quest'ultimo vari nei diversi punti in funzione della posizione angolare della membrana rispetto alla direzione del campo esterno. (b) L'immagine rappresenta una cellula prima (sinistra) e durante (destra) l'applicazione di un campo esterno. La fluorescenza si deve ad apposite molecole che si dispongono seguendo le forze esterne applicate sulla cellula (Silve 2017).

Quando una cellula è sottoposta ad un campo elettrico le cariche in essa contenute si muovono seguendo l'azione delle forze elettroforetiche, essendo però racchiuse dalla membrana la quale funge da isolante si assiste alla creazione di un voltaggio transmembrana che si aggiunge a quello fisiologico (figura 1.1a). Si ottengono quindi due poli nella cellula; il catodo che risulterà essere depolarizzato mentre l'anodo sarà iperpolarizzato come mostra la figura 1.1b. L'aumento del potenziale transmembrana si può prevedere con l'utilizzo dell'equazione di Maxwell (eq. 1.1) assu-

mendo che la cellula abbia una conformazione perfettamente sferica e diverse altre semplificazioni come suggerito da Weaver et al. (1996).

$$U_m = 1.5r_{cell}E \cos \theta \quad (1.1)$$

Considerando U_m il potenziale transmembrana, r_{cell} il raggio della cellula e θ l'angolo fra il punto sulla cellula in cui si misura U_m e la direzione del vettore E .

Questa polarizzazione è resa possibile applicando degli impulsi sufficientemente intensi da produrre un campo elettrico all'interno della cellula che sia abbondantemente più intenso del normale. La natura stessa della cellula favorisce questo processo in quanto grazie alla capacità amplificativa della cellula, dovuta alla sua forma e proprietà elettriche (Silve 2017), si riescono a produrre grossi potenziali transmembrana con l'applicazione di campi esterni relativamente ridotti. Il coefficiente di amplificazione del campo, in prima approssimazione, corrisponde quindi al rapporto fra il raggio della cellula e lo spessore della membrana (Silve 2017). Considerando quindi che lo spessore medio della membrana cellulare sia di $\approx 5\text{nm}$ mentre il raggio sia di $\approx 100\mu\text{m}$ si può ottenere un campo elettrico interno alla cellula di circa 10^5 volte più intenso rispetto al campo elettrico utilizzato per crearlo ($E_m = u_m/h$) (Donsì et al. 2010; Pataro et al. 2011).

L'effetto di elettroporazione si ottiene al superamento di un certo valore critico (E_c) di questo campo (valore che varia a seconda delle caratteristiche delle cellule). Un valore medio indicativo è stato stabilito sperimentalmente per le cellule vegetali corrispondente a 0.2-1.0 V (Donsì et al. 2010).

La reversibilità o irreversibilità dell'elettroporazione dipende da quanto il campo generatosi nella cellula superi il valore critico, pertanto controllando il numero degli impulsi, la loro durata e l'intensità del campo applicato si può controllare il processo. Un'elettroporazione reversibile avverrà quindi quando il campo indotto superi di poco o eguagli E_c , in questo caso quindi la cellula sarà in grado di riparare i danni subiti e ristabilire l'integrità della membrana dopo un certo tempo. Mentre per un'elettroporazione irreversibile si deve superare abbondantemente tale valore soglia (E_c) causando quindi una lacerazione della membrana più marcata che non permette alla cellula di ripararsi e ne causa la morte (Pataro et al. 2011).

Il dibattito scientifico è tuttora aperto riguardo alla reale esistenza o meno dei pori indotti dal trattamento PEF. Difatti non sono ancora state presentate prove scientifiche riguardo la loro esistenza, ma sono unicamente supportati da modelli matematici che ne predicono la formazione durante il trattamento. Per giunta i pori teorizzati dai modelli matematici presentano un diametro nell'ordine dei nanometri e una vita che non supera pochi millisecondi dopo la fine del trattamento, e pertanto non sono sufficienti a spiegare come molecole estremamente grandi riescano ad attraversare la membrana cellulare e come questo stato di permeabilizzazione possa durare per svariati minuti dopo la fine del trattamento (Silve 2017).

Volendo riassumere e riordinare le fasi di elettroporazione che si verificano ogni volta che un impulso sia applicato alla nostra matrice (si tenga però conto della durata infinitesima di ciascuna

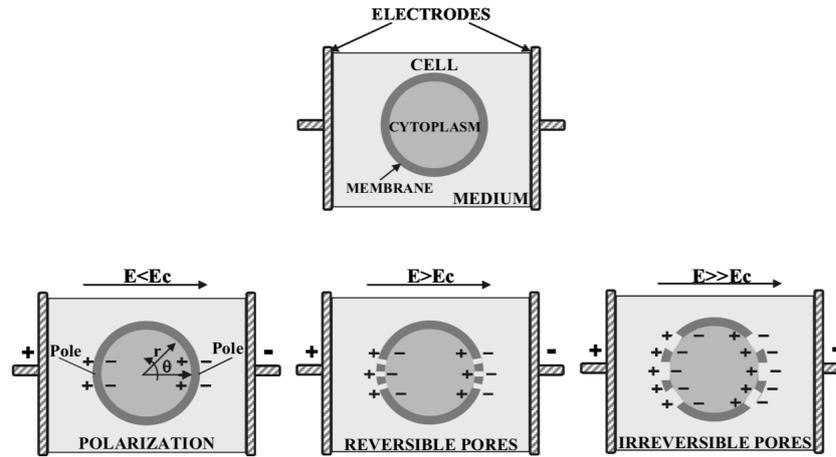


Figura 1.2: Rappresentazione schematica dell'effetto sulla cellula ottenuto con l'applicazione di campi elettrici di diverse intensità, con particolare riguardo all'effetto causato dal superamento o meno di E_c (Pataro et al. 2011).

fase) si può creare un piccolo elenco estremamente esplicativo (Donsì et al. 2010):

- Caricamento e polarizzazione delle membrane cellulari
- Destabilizzazione della membrana cellulare e formazione dei pori
- Espansione, aggregamento e motilità dei pori durante tutta la durata della loro esistenza
- Rilassamento dei pori e conseguente ripristino dell'integrità della membrana (nei casi ove questo sia possibile)

Di seguito sono brevemente riassunti i principali parametri del processo che permettono il controllo e la gestione del trattamento come consigliato da Raso (2017):

- *Potenza del campo elettrico*: Questa si esprime in $kVcm^{-1}$ e corrisponde al rapporto fra il voltaggio utilizzato e la distanza fra gli elettrodi della camera di trattamento ($E = V/d$).
- *Tipo d'impulso*: Gli impulsi possono differire fra di essi in base al tipo di tecnologia che li produce. Queste differenze consistono nella forma che l'impulso ha se rappresentato, ovvero nell'evoluzione del voltaggio per tutta la durata dell'impulso. Le due tipologie principali sono l'impulso a decadimento esponenziale e quello rettangolare. Ve ne sono poi molte altre e hanno importanza in quanto ogni tipo d'impulso può avere effetti leggermente diversi sulla matrice trattata.
- *Tempo di trattamento*: Ovvero il rapporto fra la durata di ogni impulso (ampiezza) e il numero totale d'impulsi applicati, il valore si riporta in μs ($t = n \cdot \tau$).
- *Energia dell'impulso*: Importante nella determinazione del costo energetico del trattamento e quindi nella comparazione con altri metodi. Si misura in $kJkg^{-1}$ e dipende da più fattori quali il voltaggio usato, l'ampiezza degli impulsi, forma e resistenza della camera di trattamento e dalla conducibilità media del prodotto trattato.
- *Frequenza degli impulsi*: Si esprime in Hz e corrisponde al numero di impulsi per secondo di trattamento (per impianti industriali si può arrivare a centinaia di Hertz).

1.2.2 Applicazione dei PEF in campo alimentare

Effetto di inattivazione microbica

Una delle più importanti applicazioni dei PEF è l'inattivazione microbica, come alternativa ai tradizionali trattamenti termici. Essendo una tecnologia non termica permette di evitare degradazioni qualitative del prodotto quali perdita di sostanze termolabili, riduzione del valore nutritivo ecc. Come riporta l'equazione (eq.1.1) l'entità dell'amplificazione del campo elettrico e quindi la facilità con cui una cellula possa subire una elettroporazione irreversibile è inversamente proporzionale al raggio della cellula.

Questo significa che, per le cellule microbiche che sono fra le 100 e le 10 volte più piccole rispetto a quelle vegetali, sono necessari campi elettrici molto maggiori (Donsì et al. 2010). Oltre a questo si aggiungono molti altri fattori e variabili, raggruppati da Raso (2017) come parametri di processo (temperatura, energia del campo applicato...), caratteristiche dei M.O. (specie, ceppo, condizioni di recupero...) e parametri di prodotto (pH del mezzo, attività dell'acqua (A_W), composizione...) i quali influiscono sulla reale efficacia del trattamento nella pastorizzazione.

Effetto sulle cellule vegetali

Se applicati alle cellule vegetali in un range di 0.5-3 kV/cm , i PEF possono risultare un pretrattamento utile per successive fasi di processo che prevedano un trasferimento di massa; favorendo una più facile estrazione di succhi o composti utili, una più rapida disidratazione oppure la funzionalizzazione di prodotti specifici tramite l'ingresso nelle cellule di molecole utili (Donsì et al. 2010).

Una delle applicazioni più studiate del PEF è l'implementazione nel processo estrattivo del succo da matrici vegetali. Tradizionalmente, l'estrazione del succo viene favorita dal danneggiamento delle membrane cellulari, ottenuto tramite le alte temperature, la disidratazione osmotica o il trattamento con enzimi. Tali metodi tuttavia, possono causare la degradazione delle proprietà organolettiche e soprattutto nutrizionali.

Il trattamento con PEF è di fatto in grado non solo di aumentare la diffusività di materia dei soluti nel succo (D_{eff}) ma anche di ridurre sensibilmente l'energia d'attivazione di D_{eff} e quindi la dipendenza dalla temperatura di trattamento (Donsì et al. 2010). I PEF risultano quindi essere una promettente alternativa ai metodi tradizionali in quanto permette di aumentare la resa di estrazione di succo e la concentrazione di soluti in esso disciolti senza incrementare le temperature di processo e apportando modificazioni minime alla composizione chimica del prodotto, preservando quindi tutte le caratteristiche nutrizionali (Puértolas et al. 2012). L'efficacia di questo trattamento è risultata valida secondo molti articoli scientifici, anche se al momento della sperimentazione in scala industriale si riscontrano spesso dei problemi dovuti alla più complessa gestione del trattamento. In linea di principio, secondo Pataro et al. (2011), l'applicazione dei PEF permette un incremento della resa produttiva simile a quello che si ottiene col trattamento enzimatico ma con un processo molto più veloce ed in continuo, pertanto molto più sostenibile dal punto di vista imprenditoriale.

Secondo gli stessi meccanismi di funzionamento, i PEF possono essere sfruttati per l'estrazione di componenti bioattivi ad alto valore aggiunto da matrici vegetali anche di scarto. Come tecnologia non termica infatti, è adatta all'estrazione di composti quali polifenoli, coloranti, vitamine, aromi ovvero sostanze estremamente sensibili alle condizioni di trattamento e alle alte temperature. L'applicazione dei PEF come pretrattamento alla successiva estrazione è stata studiata su innumerevoli prodotti, mostrando in genere aumenti di resa di produzione o riduzione dei costi. Le matrici più studiate a questo fine sono patate, barbabietola rossa e mele.

Alcuni esempi dei prodotti su cui più si è cercato d'implementare il PEF come pretrattamento sono anche quelle matrici vegetali più largamente utilizzate come patate, barbabietola da zucchero e mele.

Sulla polpa di mele, è stato dimostrato come sia possibile un aumento fra il 67-73% della produzione rispetto ad un trattamento con enzimi cellulolitici (Barsotti et al. 1999). Tramite l'applicazione del trattamento PEF direttamente durante la pressatura sono stati ottenuti migliori risultati operando a basse energie (da 0,1 a 0,5 kV/cm) e mantenendo una pressione costante (Bazhal et al. 2001). Per quanto riguarda l'estrazione di composti bioattivi, i PEF sono stati utilizzati per esempio per l'estrazione di betaina (principale colorante rosso alimentare) dalle rape rosse. Fincan et al. (2004) hanno osservato un aumento del 90% nel rilascio di betaina nella prima ora di estrazione contro il 5% nel campione non trattato. Un'applicazione già implementata a livello industriale è relativa all'utilizzo dei PEF nel processo produttivo di patate per l'ottenimento di *chips*. In questo caso lo scopo principale del suo utilizzo è l'intenerimento della struttura del tubero (di norma molto compatta) con vantaggi nelle fasi di pelatura e taglio che risultano semplificate e facilitate (Töpfl 2017)

Infine, un importante campo di applicazione dei PEF è quella relativa ai processi di disidratazione, al fine di ridurre i tempi di processo e pertanto i costi, ma anche le alterazioni chimiche, strutturali e nutrizionali. Pertanto, sono numerosi gli studi che cercano di ottimizzare i parametri dei PEF come pretrattamento a essiccamento, liofilizzazione ecc. (Parniakov et al. 2016).

L'indice di disintegrazione

In tutti i casi in cui il PEF venga utilizzato per ottimizzare i trasferimenti di massa risulta cruciale identificare una tecnica per quantificare il livello di disintegrazione cellulare (P), ovvero il rapporto fra le cellule elettroporate e le cellule totali (Lebovka et al. 2002). Tale parametro è fondamentale per confrontare risultati ottenuti in diversi studi utilizzando diversi parametri operativi ma anche per avere un migliore controllo del processo industriale e conseguentemente della sua ottimizzazione (Donsì et al. 2010). Le metodiche per valutare l'indice di disintegrazione sono diverse. La valutazione diretta di P tramite un'analisi al microscopio dei tessuti trattati tramite l'utilizzo di coloranti in grado di discriminare le cellule elettroporate da quelle integre. Questa tecnica risulta essere estremamente utile nell'individuazione del meccanismo di funzionamento ma è invece poco standardizzabile e di difficile interpretazione per quanto riguarda la determinazione quantitativa di un danno (Puértolas et al. 2012).

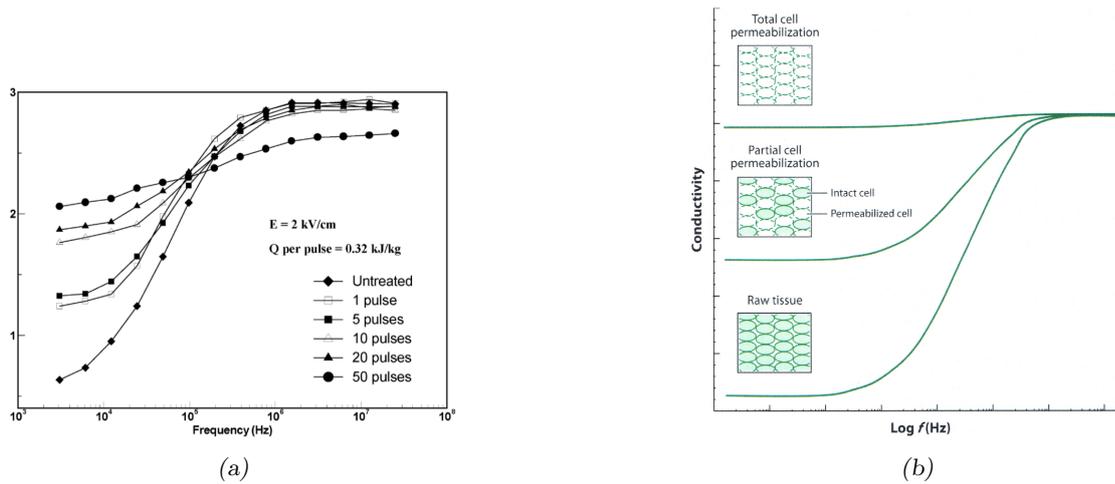


Figura 1.3: (a) Visualizzazione pratica della dipendenza della conducibilità dalla frequenza su campioni di peperoni (forza del campo 2kV/cm , energia per impulso 320J/kg) (Ade-Omowaye, Taiwo et al. 2003). (b) Rappresentazione schematica di Puértolas et al. (2012) per spiegare il principio alla base della modifica di conduttività nei tessuti trattati.

Altro metodo pratico ma non estremamente efficiente è la stima del coefficiente di diffusione del tessuto trattato in base alla seguente formula:

$$P \approx (D - D_i)/(D_d - D_i) \quad (1.2)$$

in cui D indica il coefficiente di diffusione apparente mentre i e d si riferiscono rispettivamente al valore delle cellule intatte e totalmente distrutte. Questo metodo tuttavia, presenta molte incertezze in quanto la sua valutazione può impattare significativamente la struttura dei tessuti che quindi potrebbe subire modifiche (Pataro et al. 2011). Altre tecniche consistono nella quantificazione del liquido perso dai tessuti previa centrifugazione, la valutazione della conducibilità elettrica dei liquidi persi dai tessuti trattati e l'analisi della texture.

Ultimamente però il metodo che viene considerato più attendibile si basa sulla valutazione delle proprietà elettrofisiche del tessuto. L'indice di disintegrazione cellulare, indicato come Z_p può essere misurato in maniera diversa, ma si basa sempre sulla valutazione sperimentale della conducibilità (σ) del tessuto a determinate frequenze. La risposta di un campione alla variazione della frequenza infatti varia a seconda della presenza di membrane cellulari danneggiate come mostrato in figura 1.3a e 1.3b (Donsì et al. 2010; Puértolas et al. 2012)).

Ultimamente però questi sistemi sono stati messi in secondo piano da un più pratico, veloce ed affidabile sistema, il quale si basa sulle proprietà elettrofisiche del tessuto e specialmente delle cellule di esso. Vi sono infatti grosse differenze di risposta ad un campo elettrico da parte di cellule integre o danneggiate, che si devono all'effetto isolante delle membrane cellulari la quali possono essere più o meno danneggiate (Donsì et al. 2010; Puértolas et al. 2012). L'indice di disintegrazione cellulare, in questi casi, si indica come Z_p e vi sono più metodi proposti per la sua valutazione. In ogni caso però questi si basano su una precedente valutazione sperimentale di σ , ovvero della conducibilità del tessuto rispetto ad un certo tipo di frequenza, difatti è stato dimostrato come al

variare di quest'ultima si ha una variazione correlata della conduttività del campione come espresso in figura 1.3a e 1.3b.

1.2.3 Il PEF come pretrattamento alla liofilizzazione

La liofilizzazione è un processo fisico di disidratazione che permette di minimizzare, per quanto possibile, le alterazioni che si hanno sulla matrice, conservandone al massimo le proprietà organolettiche e nutrizionali ma anche la struttura. Questo è possibile grazie alle basse temperature utilizzate (non si supera la T ambiente) e dalla velocissima rimozione dell'acqua (grazie all'eliminazione tramite sublimazione dell'acqua congelata). Il processo operativo di questa tecnologia si articola in un primo rapido congelamento del prodotto a cui segue la disidratazione vera e propria che si attua in camere ipobariche. Infine, si conclude il processo con un confezionamento adeguato (Ratti 2001).

Gli studi riportati in letteratura mostrano come il pretrattamento con PEF possa influire sulla micro- e macrostruttura del prodotto liofilizzato Jalté et al. 2009, Tylewicz, Aganovic et al. 2016, Parniakov et al. 2016, Yali et al. 2018 e Telfser et al. 2019. IN generale, questi studi hanno osservato come l'elettroporazione irreversibile dei tessuti porti ad una maggiore velocità di disidratazione del campione rispetto a quello non trattato, con conseguente risparmio in termini di energia e costi. Inoltre, gli stessi studi hanno evidenziato come il prodotto pretrattato con PEF e liofilizzato presenti un'ammigliore ritenzione della macro- e microstruttura.

Jalté et al. (2009) ha studiato l'influenza del pretrattamento con PEF sulla prima fase della liofilizzazione, cioè il congelamento. Dai risultati è emerso che durante il congelamento di patate, all'aumentare dell'intensità del pretrattamento, quindi di Z_p , corrisponda una diminuzione del tempo di congelamento (con correlazione lineare) senza però variare la temperatura di congelamento (figura 1.4a). Questo effetto ha di conseguenza portato alla diminuzione dei tempi di disidratazione, permettendo di ottenere un prodotto finale di maggiore qualità (in termini di ridotta umidità residua e minor avvizzimento). Gli autori hanno ipotizzato che questo fenomeno sia dovuto alla capacità del PEF di migliorare la diffusione dell'acqua verso l'esterno della cellula (mediante un'elettroporazione irreversibile) che a sua volta favorisce una nucleazione ed un accrescimento dei cristalli extracellulari a scapito di quelli intracellulari, modificando quindi non solo la distribuzione di essi ma anche la loro dimensione. Questo porterebbe quindi a preservare le strutture cellulari dall'aumento di volume ed allo stesso tempo permette di creare una struttura più porosa nel prodotto liofilizzato.

Parniakov et al. (2016) ha invece studiato l'effetto del pretrattamento con PEF sulla seconda fase della liofilizzazione, la sublimazione. Secondo gli autori, il pretrattamento influisce su tre parametri principali del processo: la temperatura minima raggiunta (T_m), il tempo effettivo di congelamento (t_f) e il tempo di disidratazione (t_d). Nel grafico in figura 1.5b si può notare come la pendenza fra i punti di t_f e T_m aumenti all'aumentare di Z_p , ovvero dell'intensità del pretrattamento, corrispondendo alla fase di sublimazione del ghiaccio (fase III). Tenendo quindi conto che la velocità di raffreddamento del campione è proporzionale alla velocità di sublimazione del

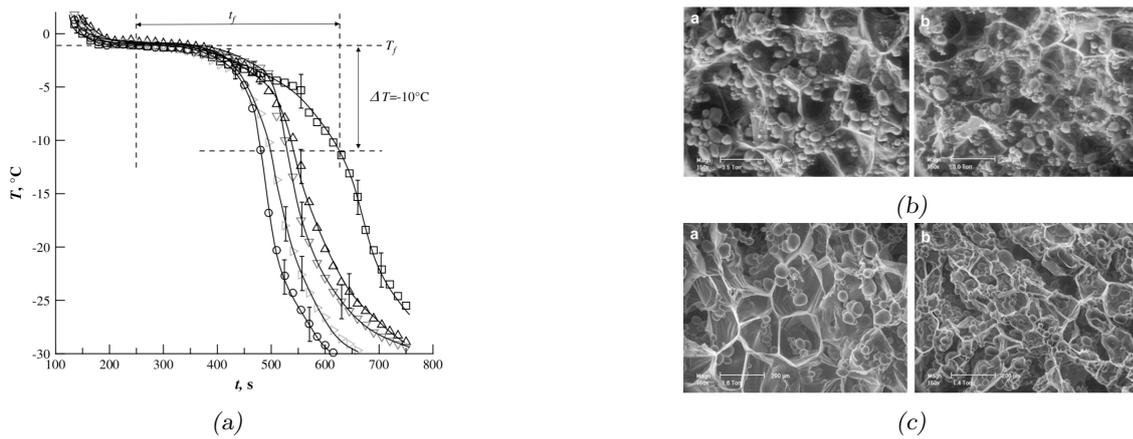


Figura 1.4: (a) Grafico riportante la temperatura ed il tempo di congelamento, ogni curva rappresenta un certo Z_p ; 0(\square), 0,5(\triangle), 0,7(∇), 0,8(\triangleright), 0,98(\circ). (b) Immagine al microscopio SEM di patate pre-trattate (a) o non (b) dopo liofilizzazione. (c) Immagine al microscopio SEM di patate pretrattate (a) o non (b) dopo congelamento.

ghiaccio, si può dedurre che questa venga aumentata dal pretrattamento. Inoltre si può notare che i campioni pretrattati con PEF presentano anche una T_m molto più bassa rispetto a quelli non trattati, dovuta ad un congelamento anche dell'acqua più strettamente legata, risultando in una migliore disidratazione durante l'ultima fase (IV), come può essere osservato in figura 1.5b (Parniakov et al. 2016).

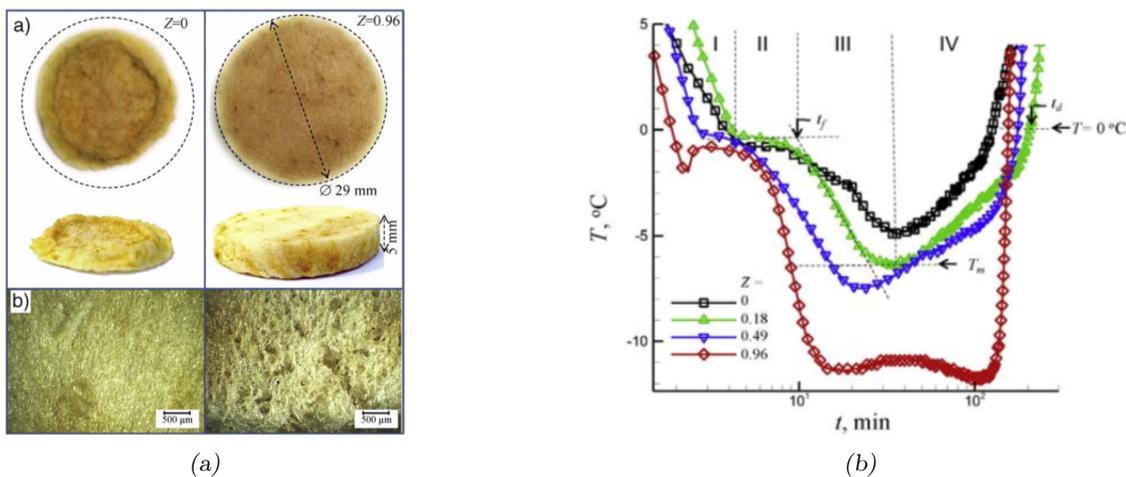


Figura 1.5: (a) Variazioni macro e microscopiche della struttura di mele liofilizzate con diverso Z_p . (b) Evoluzione della temperatura, T , durante la liofilizzazione con diversi valori di Z_p (Parniakov et al. 2016).

Queste modifiche ottenute durante il processo di congelamento e sublimazione possono portare quindi un miglior mantenimento della struttura finale del prodotto come illustrato dalle figure 1.5a, 1.4c, 1.4b e 1.6. Secondo Yali et al. (2018), il miglioramento del processo di liofilizzazione può essere imputato al più veloce spostamento dell'acqua dalla zona più interna del prodotto a quella superficiale, grazie alle modifiche strutturali apportate sulle membrane cellulari, così da permettere che il fronte di sublimazione rimanga negli strati esterni del prodotto.

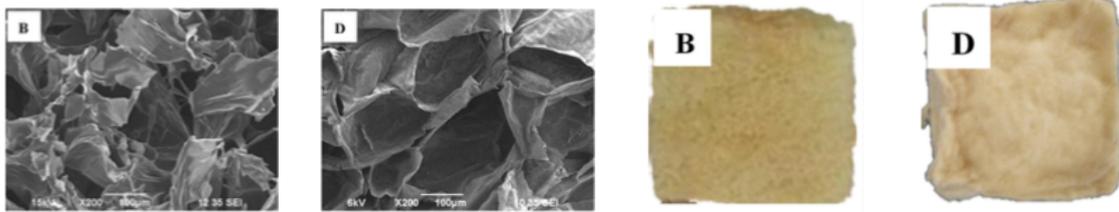


Figura 1.6: Le prime due foto mostrano la microstruttura dei campioni di mela, (B) pretrattato con PEF e (D) senza pretrattamento, le altre due foto mostrano invece la macrostruttura dei due stessi campioni (Yali et al. 2018).

Influenza sul processo di reidratazione

Nonostante le ricerche pubblicate sull'effetto dei PEF sulla disidratazione, non ci sono ancora risultati chiari su come questo influisca sulla capacità di reidratazione del prodotto (Tylewicz, Aganovic et al. 2016). Vi sono infatti risultati contrastati fra vari articoli che riscontrano alle volte un miglioramento nel processo di reidratazione (Eshtiaghi et al. 1994) dovuti all'uso dei PEF mentre altri studi evidenziano una correlazione negativa (Ade-Omowaye, Angersbach et al. 2001) o assente (Gachovska et al. 2009). Questa discordanza può essere giustificata tenendo conto che vi sono innumerevoli metodi di disidratazione di un alimento (disidratazione osmotica, liofilizzazione, essiccamento ad aria forzata...) i quali possono interagire diversamente con le modifiche strutturali apportate dai PEF. Il processo di reidratazione è un complesso insieme di trasferimenti di acqua dalla fase liquida al campione, attraverso le microporosità presenti, e una migrazione di soluti dal campione alla soluzione in cui è immerso (Tylewicz, Aganovic et al. 2016).

Grazie all'analisi calorimetrica, Tylewicz, Aganovic et al. (2016) hanno osservato che all'aumentare dell'intensità del campo utilizzato (ma non all'aumentare degli impulsi) si assisteva ad un abbassamento della temperatura di congelamento e del contenuto in acqua congelabile (tramite una correlazione lineare). Essendo questi due parametri in genere dipendenti dalla concentrazione dei soluti, gli autori hanno ipotizzato che il PEF abbia causato un'elettroporazione irreversibile non solo della membrana cellulare ma anche della membrana del vacuolo permettendo un generale incremento della concentrazione delle sostanze.

Questa ipotesi è stata avallata anche dai dati ottenuti con la risonanza magnetica nucleare a bassa risoluzione (LF-NMR), la quale restituisce informazioni più dettagliate su quali siano i reali movimenti dell'acqua all'interno delle cellule a reidratazione avvenuta. E' stato osservato un aumento di tempo di rilassamento dei protoni dell'acqua presente nel vacuolo e negli spazi extracellulari, suggerendo una disintegrazione delle membrane cellulari e quindi l'acqua era in grado di muoversi più liberamente negli spazi più ampi non più delineati dalle membrane cellulari. Questo quindi riconferma la modifica strutturale apportata col pretrattamento PEF e con un approfondimento degli studi potrebbe portare ad ulteriori informazioni utili a capire le reali interazione fra la reidratazione ed il trattamento PEF (Tylewicz, Aganovic et al. 2016).

Capitolo 2

Materiali e metodi

2.1 Preparazione del campione

Le fragole sono state acquistate presso il mercato ortofrutticolo locale e sono state conservate in cella frigorifera a $+4 \pm 1$ °C per massimo una settimana. Prima di ogni trattamento le fragole, selezionate sulla base della loro dimensione ed omogeneità, sono state lavate, e dopo rimozione del peduncolo sono state suddivise in tre gruppi; il campione di controllo, e due campioni da sottoporre al trattamento con PEF.

2.2 Trattamento con campi elettrici pulsati (PEF)

Il trattamento è stato effettuato con il prototipo a disposizione nei laboratori del CIRI-Agroalimentare. La cella di trattamento è delle dimensioni di $5 \times 5 \times 5$ cm, con i due elettrodi in acciaio inossidabile (con una superficie di contatto di 5×5 cm) posti superiormente e sul fondo della cella. La corrente elettrica è stata erogata da un generatore di impulsi elettrici alternati (Alimentatore S-P7500 60A, 8kV, Alintel srl., Bologna), il controllo e la misura degli impulsi è garantita da un software su PC collegato allo strumento. Lo strumento è stato settato a 50Hz, con impulsi di forma rettangolare con lunghezza di $20 \mu s$, per una durata complessiva di un secondo di trattamento.

Tre fragole sono state poste nella camera di trattamento riempita in seguito con una soluzione di cloruro di sodio preparata in acqua distillata e dotata di conducibilità elettrica simile a quella delle fragole ($1.6 mS/cm$ misurata con conduttimetro EC-Meter basic 30+, Crison). I trattamenti sono stati eseguiti con un'intensità del campo elettrico di 100 e $200 V/cm$ a una temperatura di $25^\circ C$. Tali valori sono stati selezionati come trattamenti in grado di generare un'elettroporazione reversibile ($100 V/cm$) ed irreversibile ($200 V/cm$) nel tessuto di fragola sulla base di precedenti sperimentazioni. Dopo il trattamento le fragole sono state asciugate velocemente e tagliate a metà.

2.3 La liofilizzazione

In seguito al pretrattamento PEF, le fragole sono state congelate rapidamente con un abbattitore di temperatura fino a raggiungere -18°C al cuore del prodotto. Successivamente i campioni sono stati liofilizzati tramite un liofilizzatore Mod. LIO2000P (5Pascal). Dopo la liofilizzazione le singole metà di ogni fragola sono state confezionate sottovuoto al fine di evitare il riassorbimento dell'umidità atmosferica.



Figura 2.1: Foto dei campioni appena confezionati.

2.4 Reidratazione

Le prove di reidratazione sono state svolte immergendo completamente le fragole liofilizzate in acqua distillata per diversi tempi (0.5, 5, 15, 30, 60 minuti) che sono stati selezionati sulla base di prove preliminari e sulla base della letteratura scientifica (Meda et al. 2005). Dopo ogni tempo di reidratazione, ogni campione è stato mantenuto per 5min su una superficie inclinata e perforata per permettere una ridistribuzione dell'acqua al suo interno. Infine, i campioni sono stati tamponati in superficie con carta assorbente per eliminare l'acqua in eccesso e pesati. La reidratazione dei campioni è stata svolta su tre campioni per ogni tempo ad una temperatura ambiente di $20\text{-}22^{\circ}\text{C}$. Per valutare la cinetica di reidratazione è stato utilizzato il coefficiente di reidratazione - RC (Meda et al. 2005) definito come segue:

$$RC = \frac{W_r - W_{fd}}{W_0 - W_{fd}} \cdot 100 \quad (2.1)$$

in cui W_r corrisponde al peso del campione reidratato, W_{fd} al peso del campione liofilizzato e W_0 al peso del campione prima della liofilizzazione.

Le tre fasi principali della reidratazione sono riportate nelle immagini 2.2c, 2.2a e 2.2b le quali mostrano nell'ordine; dei campioni mantenuti in completa immersione nei becker tramite garze apposite, un campione in sosta per 5min dopo reidratazione ed infine un campione a processo ultimato.

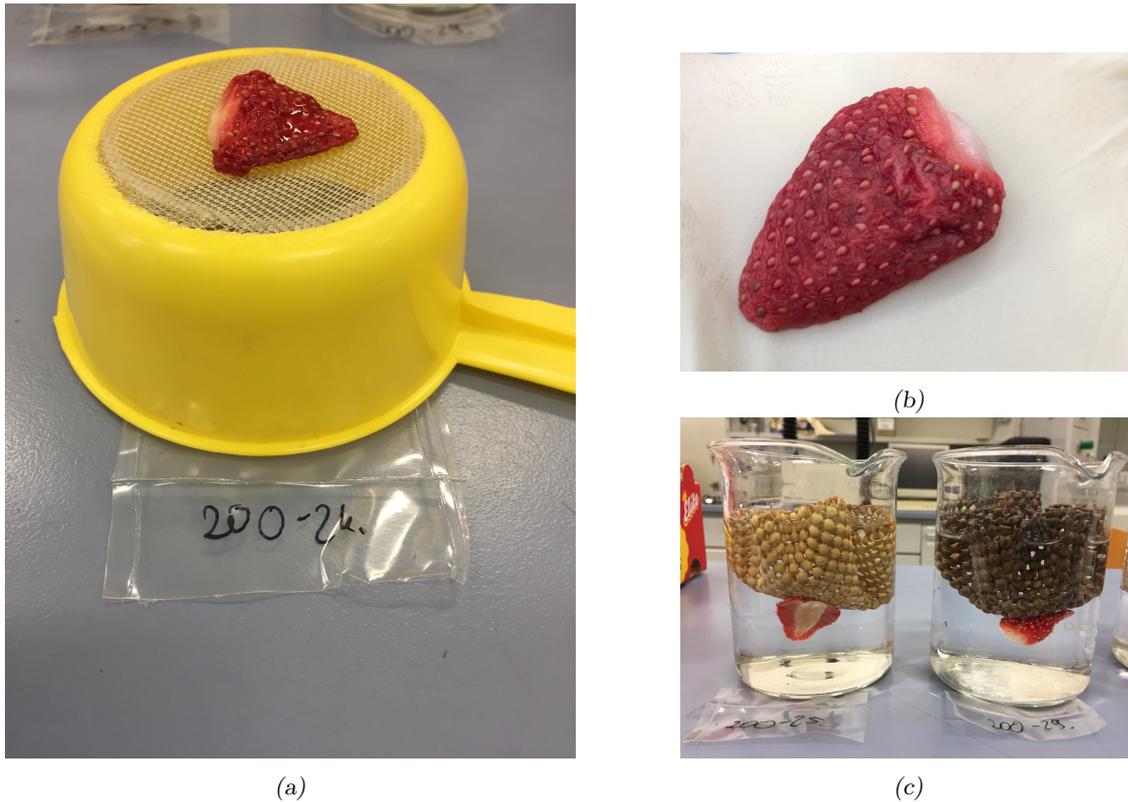


Figura 2.2: Le 3 immagini mostrano le diverse fasi del processo di reidratazione.

2.5 Determinazioni analitiche

2.5.1 Vitalità cellulare

La vitalità cellulare in seguito ai trattamenti PEF è stata valutata per mezzo di un microscopio ottico a fluorescenza (Eclipse Ti-U, Nikon Co, Japan) (figura 2.3b) utilizzando il colorante fluoresceina diacetato (FDA, Sigma-Aldrich, USA, $\lambda_{exc} \frac{1}{4} 495nm$, $\lambda_{em} \frac{1}{4} 518nm$). La soluzione è stata ottenuta sciogliendo 0,0021g di FDA in 50ml di acqua distillata (10^{-4} M). Per ogni campione sono state tagliate delle fette dello spessore di 1-2mm tramite un bisturi, poste in immersione nella soluzione FDA per 5min e successivamente risciacquate in acqua distillata. Dopodiché si è proceduto all'acquisizione delle immagini al microscopio. Per ogni campione sono state acquisite un totale di 8-10 immagini differenti.

2.5.2 Attività dell'acqua (A_W)

L'attività dell'acqua è stata misurata con l'ausilio di un AcquaLab (Mod. Series 3 TE, Decagon) appositamente tarato con uno standard ad A_W di 0,985. L'analisi è stata eseguita sminuzzando il campione in piccoli pezzi, con l'obiettivo di ottenere una misurazione più realistica possibile eliminando le differenze di A_W fra il centro e gli strati esterni (figura 2.3a).

Questa fase di preparazione del campione si è svolta il più velocemente possibile per minimizzare la perdita d'acqua nell'ambiente e si è conclusa ponendone una quantità sufficiente a coprire completamente il fondo delle apposite capsule di plastica per la misurazione.



Figura 2.3: (a) Particolare delle capsule per l'analisi dell' A_w , (b) Microscopio ottico (Eclipse Ti-U, Nikon Co, Japan; Immagine acquisita in laboratorio).

2.5.3 Contenuto in acqua

Il contenuto in acqua è stato valutato mediante essiccamento in stufa a 70°C fino al raggiungimento di un peso costante (figura 2.4b). Circa 3g di campione sono stati pesati all'interno di vaschette in alluminio (figura 2.4a) precedentemente tarate con l'utilizzo di una bilancia analitica (Kern ABS 320-4N, precisione 0.0001g; KERN & SOHN GmbH, Germania).

La percentuale di sostanza secca contenuta in ogni campione è stata calcolata con la seguente equazione:

$$\%S.S. = \frac{S - T}{F - T} \cdot 100 \quad (2.2)$$

Dove:

- T è il peso della navicella in alluminio dentro cui viene posto il campione.
- F è il peso del campione e della navicella prima dell'essiccazione.
- S è il peso del campione e della navicella dopo l'essiccazione.

Per differenza ($100 - \%S.S.$) è stato possibile determinare la percentuale di contenuto in acqua di ogni campione ($\% \text{H}_2\text{O}$).

2.6 Analisi termiche tramite calorimetria differenziale a scansione (DSC)

La calorimetria differenziale a scansione è la principale tecnica di analisi termica utilizzabile per caratterizzare molti tipi di materiali. Il principio di base consiste nel ricavare informazioni sul materiale riscaldandolo o raffreddandolo in maniera controllata. In particolare il DSC si basa sulla

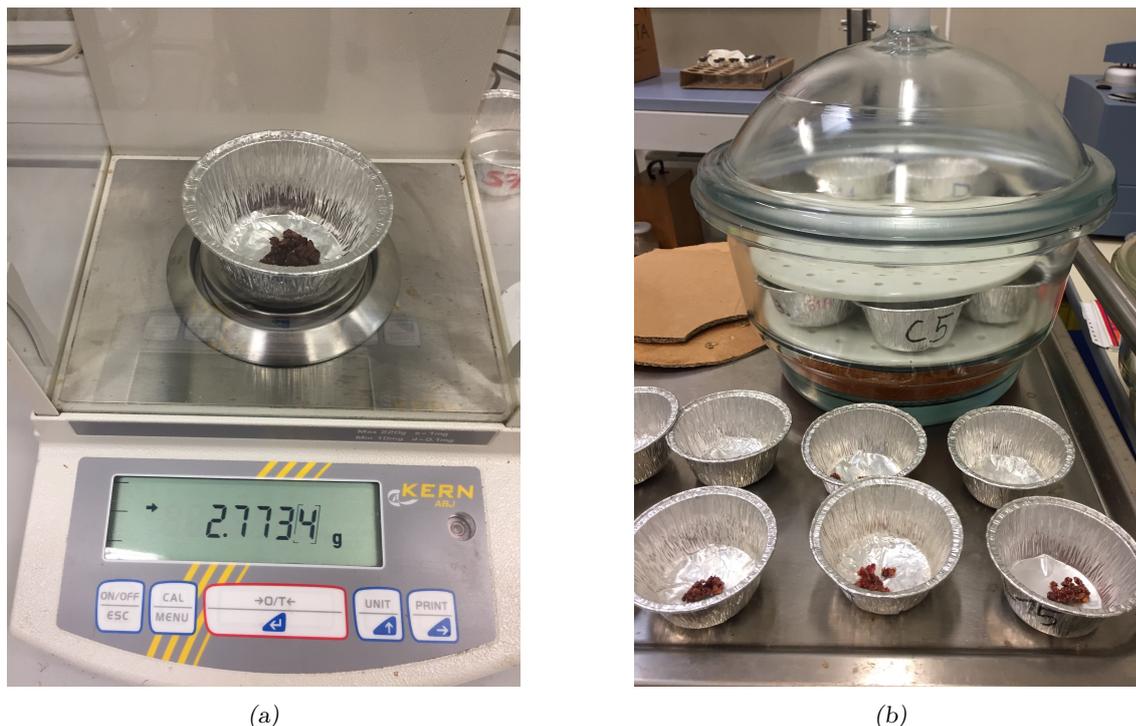


Figura 2.4: Fasi di determinazione del contenuto in acqua.

misura della differenza di flusso termico tra il campione in esame e uno di riferimento (capsula in alluminio vuota) mentre i due sono vincolati a una temperatura variabile definita da un programma prestabilito.

L'analisi calorimetrica è stata svolta attraverso l'uso di un calorimetro differenziale a scansione modello DSC Q20 (TA Instrument, Germany) (figura 2.5a). Il DSC è dotato di un'unità di raffreddamento (TA-Refrigerated Cooling System90). La calibrazione di temperature ed entalpie di fusione è stata condotta con acqua distillata (p.f. $0,0^{\circ}\text{C}$), indio (p.f. $156,60^{\circ}\text{C}$) e zinco (p.f. $419,47^{\circ}\text{C}$); il flusso di calore è stato calibrato usando il calore di fusione dell'indio ($\Delta H = 28,71\text{J/g}$). Per la calibrazione, la stessa velocità di riscaldamento usata per le misurazioni dei campioni è stata applicata sotto un flusso di azoto secco 50mL/min . Circa $20\text{-}30\text{mg}$ di ogni campione sono stati pesati in capsule di alluminio di $50\mu\text{l}$, chiuse ermeticamente prima della misurazione (figura 2.5c). Una capsula vuota è stata utilizzata come riferimento. Le curve sono state ottenute prima congelando i campioni fino a -80°C e successivamente aumentandola da -80°C a 90°C con una velocità di scansione di 5°C/min . Per ogni campione sono state eseguite tre misurazioni. Dalle curve ottenute sono stati determinati i parametri di entalpia relativa all'acqua congelabile (J/g) e di temperatura di transizione vetrosa (T_g) ($^{\circ}\text{C}$).

Il contenuto in acqua congelabile FW ($\text{g}/100\text{g}$) è stato calcolato secondo l'eq. 2.3. riportata da Tylewicz, Aganovic et al. (2016):

$$FW = \frac{\Delta H}{\Delta H_m} \quad (2.3)$$

dove ΔH è l'entalpia di fusione (J/g) dell'acqua per grammo di campione e ΔH_m è l'entalpia

di fusione dell'acqua pura a 0°C (325 J/g).

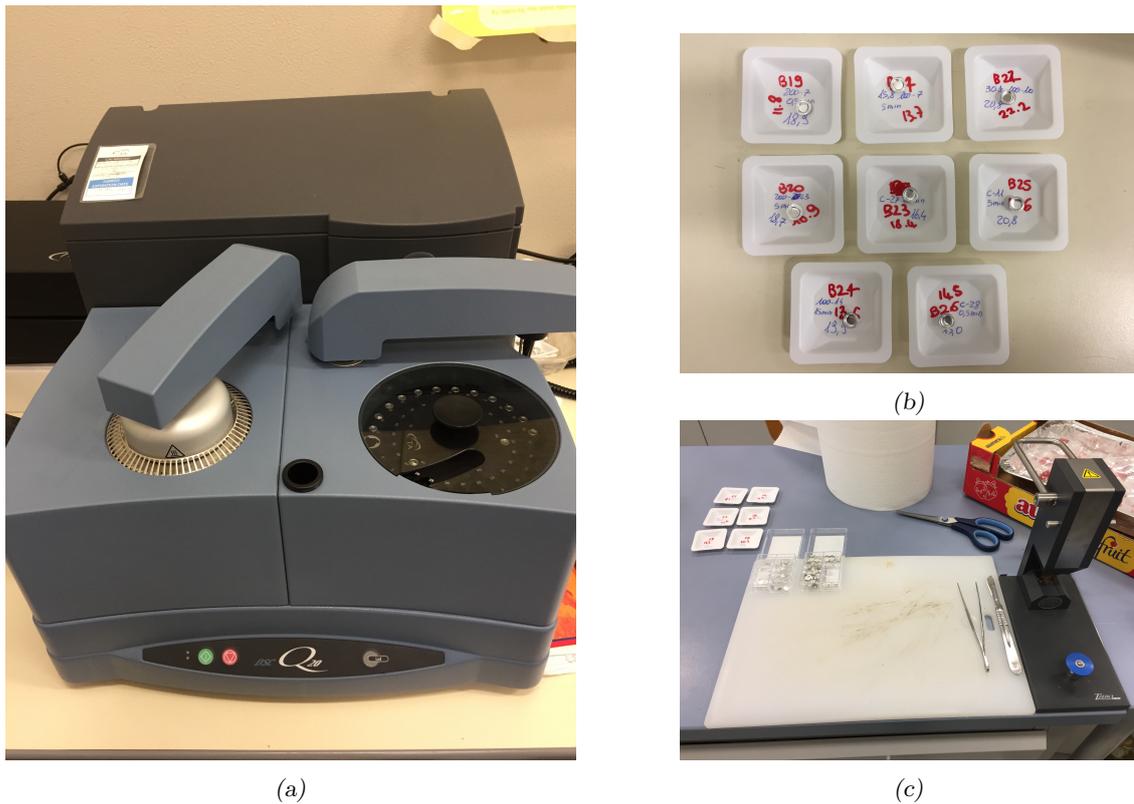


Figura 2.5: In foto la strumentazione ed i campioni relativi all'analisi con calorimetro (DSC).

2.6.1 Analisi dei dati

Per valutare la significatività delle differenze tra i dati è stato utilizzato l'ANOVA con test post hoc di Tukey ($p < 0.05$). Le cinetiche di reidratazione sono state modellate secondo l'equazione proposta da Meda et al. (2005):

$$RC = \frac{(RC)_{\infty} t}{(t_{1/2} + t)} \quad (2.4)$$

In cui RC è l'indice di reidratazione calcolato tramite l'eq. 2.1, $(RC)_{\infty}$ è RC massimo, e $t_{1/2}$ è il tempo necessario per raggiungere metà di $(RC)_{\infty}$. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite tramite il Software Statistica 8.0 (Statsoft, USA).

Capitolo 3

Risultati e discussione

3.1 Analisi dati reidratazione

3.1.1 Vitalità cellulare

La figura 3.1 mostra le immagini acquisite al microscopio ottico a fluorescenza dei tre campioni di fragola dopo trattamento con PEF rispetto al campione non trattato. Quando le cellule sono vitali sono caratterizzate da una colorazione verde brillante, come si può osservare nel campione di controllo. Il campione PEF 100 mostra una colorazione verde simile a quella del controllo. Questo conferma che l'applicazione del trattamento con PEF a $100V/cm$ ha consentito alle membrane di mantenere la loro funzionalità e alle cellule di rimanere vive. Al contrario, dopo l'applicazione di $200V/cm$, si osserva una completa perdita di vitalità dovuta al danneggiamento irreversibile delle membrane cellulari. Questi risultati confermano quelli ottenuti da Tylewicz, Tappi et al. (2019).

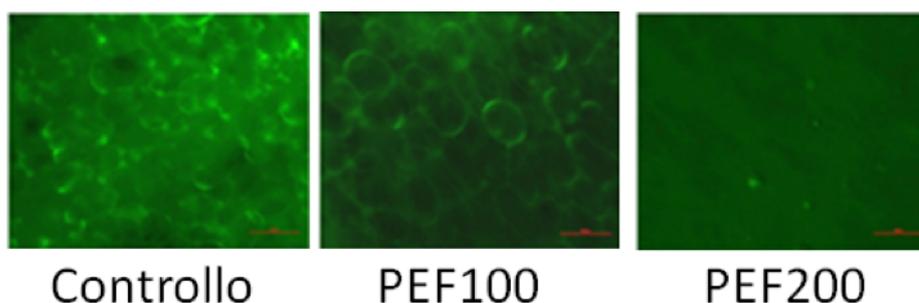


Figura 3.1: Immagini acquisite al microscopio a fluorescenza dei tre campioni trattati con FDA.

3.1.2 Cinetica di reidratazione

I coefficienti di reidratazione (RC) calcolati secondo l'equazione 2.1 per ogni campione in funzione del tempo sono riportati in Fig. 3.2. Fino a 15 minuti di reidratazione, RC era compreso tra 8 e 13 senza differenze significative tra i tre campioni. Dopo 30 e 60min invece, il campione PEF 200 mostrava valori significativamente più alti rispetto agli altri due. Al termine della reidratazione,

	$(RC)_{\infty}$	SE	$t_{1/2}$	SE	R^2
Controllo	16.43	2.31	6.03	3.26	0.672
PEF 100	14.75	2.04	7.09	3.51	0.711
PEF 200	25.17	3.44	9.77	4.35	0.738

Tabella 3.1: Parametri calcolati tramite l'eq. 2.4 per i tre diversi campioni di fragola reidratati con i relativi errori standard (SE) e coefficiente di determinazione (R^2)

RC corrispondeva a $23,4 \pm 2.1$ per il campione PEF 200 e a 16.7 ± 2.5 e 16.0 ± 1.2 rispettivamente per i campioni PEF 100 e controllo. I tempi di reidratazione sono risultati significativamente più lunghi rispetto a quelli riportati da Meda et al. (2005) per campioni simili a temperatura ambiente. Tuttavia, il potenziale danno meccanico promosso dal confezionamento sottovuoto dei campioni subito dopo la liofilizzazione effettuato nella presente sperimentazione potrebbe aver avuto un effetto sulla struttura delle fragole influenzandone la cinetica di reidratazione. L'equazione 2.4 è stata utilizzata per modellare i dati ottenuti sperimentalmente. Tramite tale modello sono stati calcolati i parametri di coefficiente di reidratazione massimo $(RC)_{\infty}$ e il tempo per raggiungere la metà di RC max. I parametri ottenuti sono riportati nella tabella 3.1.

Come si può osservare, per il campione PEF 200 il parametro $(RC)_{\infty}$ risultava significativamente maggiore rispetto agli altri due, indicando una maggiore capacità di assorbire acqua. Tale risultato potrebbe essere relativo al maggior danneggiamento delle strutture cellulari causato dall'applicazione del voltaggio maggiore.

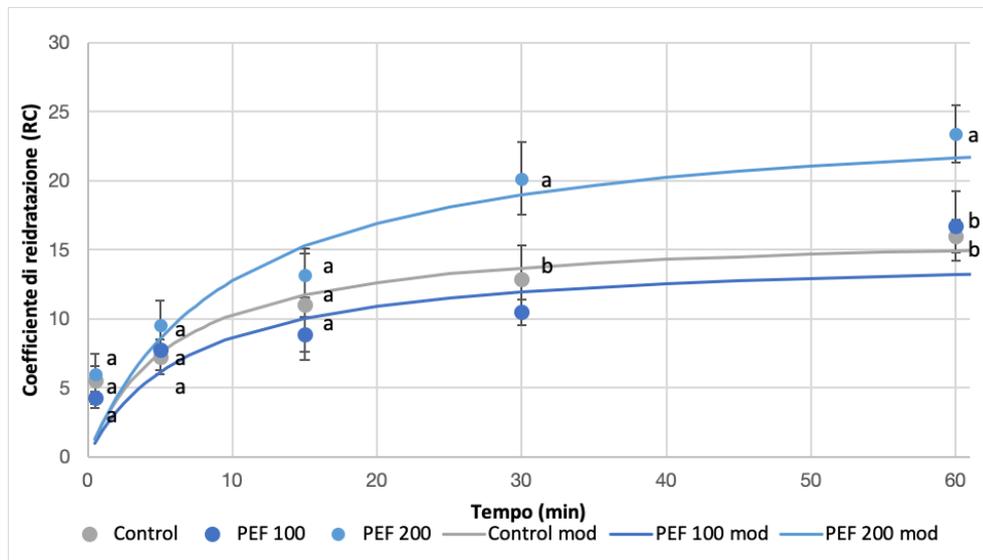


Figura 3.2: Coefficienti di reidratazione (RC) dei campioni in funzione del tempo. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ($p < 0.05$) fra i campioni per ogni tempo di reidratazione.

3.2 Contenuto in acqua

I campioni di fragola freschi avevano un contenuto di acqua iniziale di circa il 90%. Dopo liofilizzazione, tale valore si era abbassato fino a circa il 2-3% per tutti e tre i campioni. La figura 3.3 riporta il contenuto di acqua dei campioni in funzione del tempo di reidratazione. Dopo i primi

0.5min di immersione, il contenuto di acqua è aumentato notevolmente; il campione PEF 200 mostrava un valore di 54%, significativamente più alto ($p < 0.05$) rispetto agli altri due campioni (valori compresi tra 36 e 39%). Con l'aumentare del tempo di immersione, il contenuto di acqua dei campioni è aumentato progressivamente. La differenza tra il campione PEF 200 e gli altri due è diminuita nel tempo, tuttavia tale campione ha mantenuto quasi sempre valori significativamente più alti. Al termine della reidratazione, il contenuto di acqua era compreso tra il 72 e l'80%. Tale valore è risultato non aumentare anche prolungando il tempo di immersione, pertanto a seguito di liofilizzazione, tutti e tre i campioni non sono stati in grado di riassorbire durante la reidratazione la quantità di acqua persa rispetto al campione fresco, probabilmente a causa dei cambiamenti strutturali subiti.

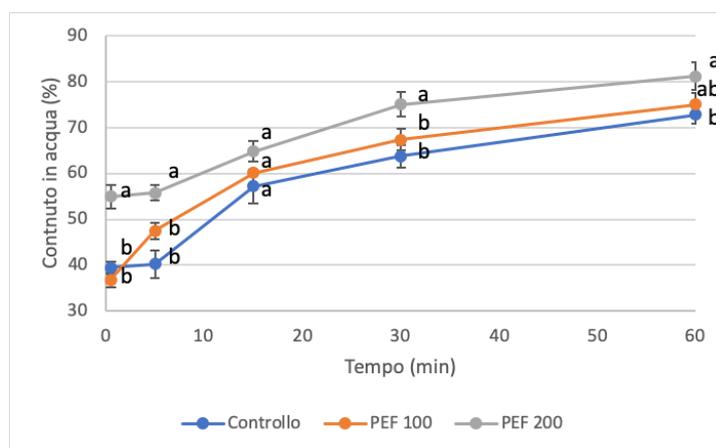


Figura 3.3: Contenuto in acqua (%) dei campioni in funzione del tempo di reidratazione. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ($p < 0.05$) fra i campioni per ogni tempo di reidratazione.

3.2.1 Analisi dell'acqua (A_W)

La figura 3.4 riporta i valori di attività dell'acqua dei tre campioni di fragola in funzione del tempo di reidratazione. I valori di tale parametro nei campioni liofilizzati erano compresi tra 0.520 e 0.560. Durante la reidratazione è stato osservato un andamento simile a quello del contenuto in acqua. L'aumento maggiore si è verificato nei primi 0.5min, dopodiché i valori sono aumentati progressivamente fino a raggiungere valori compresi tra 0.972 e 0.985. Il campione PEF 200 ha mostrato costantemente valori significativamente più alti rispetto al campione di controllo, mentre il campione PEF 100 ha mostrato valori intermedi tra i due.

3.2.2 Calorimetria differenziale a scansione

La tabella 3.2 riporta il contenuto in acqua congelabile misurato nei campioni in funzione del tempo di trattamento e calcolato secondo l'equazione 2.3. Dopo i primi 0.5min di immersione in acqua, nonostante il notevole aumento di contenuto di acqua riportato in Fig. 3.2, l'acqua congelabile non è stata rilevata. Pertanto, si può supporre che l'acqua assorbita sia strettamente legata ai componenti cellulari, non essendo sufficientemente libera da congelare. A partire da 5min di reidratazione

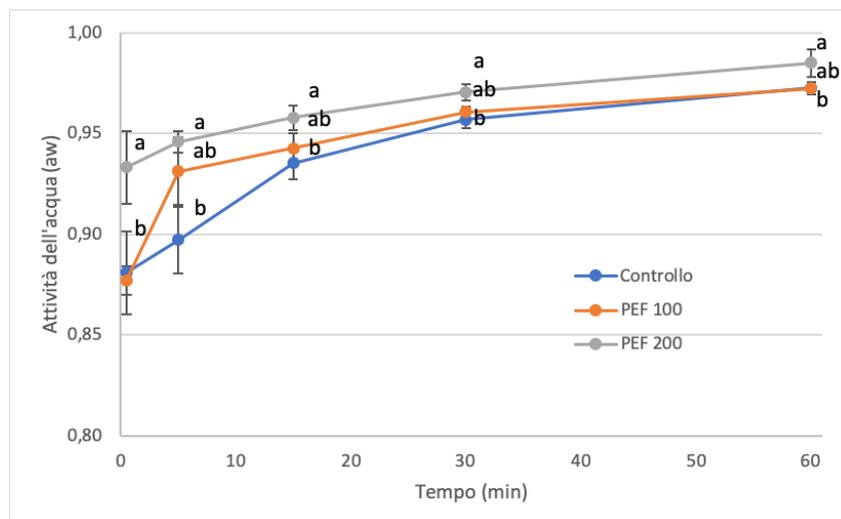


Figura 3.4: Attività dell'acqua dei campioni in funzione del tempo di reidratazione. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ($p < 0.05$) fra i campioni per ogni tempo di reidratazione.

Tempo (min)	Contenuto in acqua congelabile FW (g/100g)					
	Controllo		100V/cm		200V/cm	
0.5	-	-	-	-	-	-
5	0.93b	± 0.54	10.61a	± 4.34	6.53a	± 2.50
15	13.64ab	± 1.34	16.16a	± 0.19	11.83b	± 0.06
30	16.33b	± 0.78	24.86a	± 1.51	19.38b	± 0.67
60	37.93a	± 8.47	41.62a	± 10.22	43.82a	± 3.13

Tabella 3.2: Contenuto in acqua congelabile (g/100g acqua) dei campioni in funzione del tempo di reidratazione.

invece, il contenuto di acqua congelabile è stato quantificato ed è aumentato all'aumentare del tempo, fino a raggiungere valori compresi tra 37 e 44 g/100g. Fino a 30min, il campione PEF 100 ha mostrato quasi sempre valori più elevati rispetto agli altri campioni. Tuttavia, al termine del processo di reidratazione, non sono state osservate differenze significative. Tylewicz, Aganovic et al. (2016) hanno osservato la diminuzione del contenuto di acqua congelabile in mele reidratate dopo pretrattamento con PEF e liofilizzazione all'aumentare del voltaggio applicato. Tuttavia, l'intensità del campo elettrico applicato in tale studio (0.3-1.2 kV/cm) risultava più elevata rispetto a quello utilizzata nella presente ricerca (0.1 e 0.2 kV/cm).

La fig. 3.5 riporta le temperature di transizione vetrosa (T_g) dei campioni in funzione del tempo di reidratazione. Tale parametro rappresenta un'importante informazione relativa alla stabilità di un campione. Come si può osservare, per tutti i campioni fino a 15min, la T_g ha mostrato valori di circa 20°C, mentre dopo 30 e 60min, essi risultavano compresi tra -50 e -60°C. Non sono state riscontrate differenze significative tra i tre campioni in nessuno dei punti considerati.

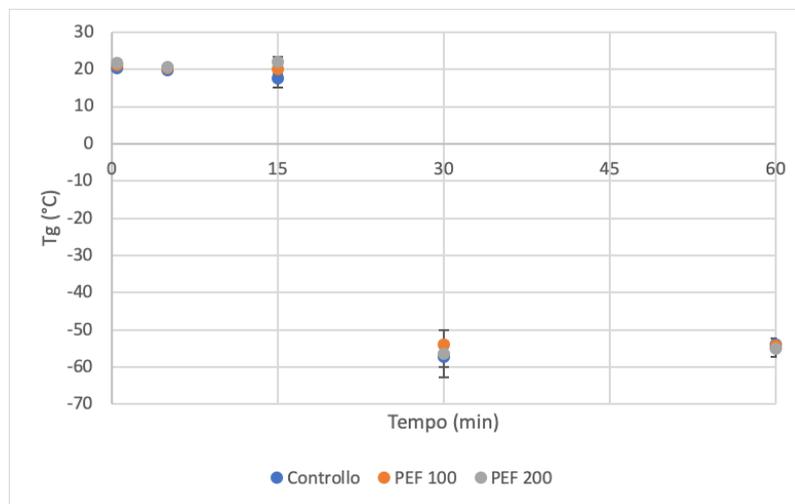


Figura 3.5: Temperatura di transizione vetrosa ($^{\circ}\text{C}$) in funzione del tempo di reidratazione.

Capitolo 4

Conclusioni

Il presente lavoro di tesi aveva lo scopo di valutare l'effetto del trattamento con campi elettrici pulsati sulle cinetiche di reidratazione di fragole liofilizzate.

Le analisi al microscopio a fluorescenza hanno confermato come i due trattamenti applicati, a 100 e 200V/cm, promuovevano rispettivamente un'elettroporazione reversibile ed irreversibile.

I parametri di reidratazione calcolati tramite modellazione matematica per la descrizione della cinetica di assorbimento di acqua, hanno permesso di caratterizzare le differenze tra i campioni. In particolare, il campione trattato a 200V/cm ha mostrato una maggior capacità di reidratazione raggiungendo valori di peso, contenuto in acqua ed attività dell'acqua maggiori rispetto al campione di controllo.

Al contrario, il campione trattato a 100V/cm ha mostrato valori simili al campione di controllo. Con le analisi effettuate tramite calorimetria differenziale a scansione sono stati valutati i parametri di contenuto in acqua congelabile e temperatura di transizione vetrosa. Tuttavia, non sono emerse differenze significative tra i campioni.

Per approfondire i risultati ottenuti in questa sperimentazione, sarebbe necessario valutare l'effetto del trattamento sulle caratteristiche qualitative delle fragole reidratate, quali per esempio colore e texture.

Inoltre, è prevista in una fase successiva della sperimentazione l'analisi tramite NMR imaging, per poter valutare l'influenza del trattamento sulla distribuzione spaziale dell'acqua all'interno del campione durante la reidratazione.

Bibliografia

- Ade-Omowaye, BIO, A Angersbach, KA Taiwo e D Knorr (2001). «Use of pulsed electric field pre-treatment to improve dehydration characteristics of plant based foods». In: *Trends in Food Science & Technology* 12.8, pp. 285–295.
- Ade-Omowaye, BIO, KA Taiwo, NM Eshtiaghi, A Angersbach e D Knorr (2003). «Comparative evaluation of the effects of pulsed electric field and freezing on cell membrane permeabilisation and mass transfer during dehydration of red bell peppers». In: *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 4.2, pp. 177–188.
- Barsotti, L e JC Cheftel (1999). «Food processing by pulsed electric fields. II. Biological aspects». In: *Food Reviews International* 15.2, pp. 181–213.
- Bazhal, MI, NI Lebovka e E Vorobiev (2001). «Pulsed electric field treatment of apple tissue during compression for juice extraction». In: *Journal of Food Engineering* 50.3, pp. 129–139.
- Donsì, Francesco, Giovanna Ferrari e Gianpiero Pataro (2010). «Applications of pulsed electric field treatments for the enhancement of mass transfer from vegetable tissue». In: *Food Engineering Reviews* 2, pp. 109–130.
- Eshtiaghi, MN, R Stute e D Knorr (1994). «High-pressure and freezing pretreatment effects on drying, rehydration, texture and color of green beans, carrots and potatoes». In: *Journal of Food Science* 59.6, pp. 1168–1170.
- FAO (2000-2017). *Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT database*. URL: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. (accessed: 18.01.2019).
- Fincan, Mustafa, Francesca DeVito e Petr Dejmek (2004). «Pulsed electric field treatment for solid–liquid extraction of red beetroot pigment». In: *Journal of Food Engineering* 64.3, pp. 381–388.
- Gachovska, Tanya K, Marian V Simpson, Michael O Ngadi e GSV Raghavan (2009). «Pulsed electric field treatment of carrots before drying and rehydration». In: *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89.14, pp. 2372–2376.
- Hancock, J.F. (1999). *Strawberries*. Agriculture Series. CABI Pub. Cap. 3, 5, 6, 7, ISBN: 9780851992648.
- Jalté, Mounia, Jean-Louis Lanoiselle, Nikolai I Lebovka e Eugène Vorobiev (2009). «Freezing of potato tissue pre-treated by pulsed electric fields». In: *LWT-Food Science and Technology* 42.2, pp. 576–580.

- Lebovka, NI, MI Bazhal e E Vorobiev (2002). «Estimation of characteristic damage time of food materials in pulsed-electric fields». In: *Journal of Food Engineering* 54.4, pp. 337–346.
- Lelieveld, H.L.M., S. Notermans e S.W.H. De Haan (2007). *Food Preservation by Pulsed Electric Fields: From Research to Application*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Elsevier Science. ISBN: 9781845693831.
- Meda, Laetitia e Cristina Ratti (2005). «Rehydration of freeze-dried strawberries at varying temperatures». In: *Journal of Food Process Engineering* 28.3, pp. 233–246.
- Parniakov, Oleksii, Olivier Bals, Nikolai Lebovka e Eugene Vorobiev (2016). «Pulsed electric field assisted vacuum freeze-drying of apple tissue». In: *Innovative food science & emerging technologies* 35, pp. 52–57.
- Pataro, Gianpiero, Giovanna Ferrari e Francesco Donsì (2011). «Mass transfer enhancement by means of electroporation». In: *Mass Transfer in Chemical Engineering Processes*. IntechOpen.
- Puértolas, E1, E Luengo, I Álvarez e J Raso (2012). «Improving mass transfer to soften tissues by pulsed electric fields: fundamentals and applications». In: *Annual review of food science and technology* 3, pp. 263–282.
- Raso, Javier (2017). *Microbial Inactivation by PEF*. proceeding della IV PEF School; 4th School on Pulsed Electric Field Applications in Food and Biotechnology.
- Ratti, Cristina (2001). «Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review». In: *Journal of food engineering* 49.4, pp. 311–319.
- Salunkhe, D.K. e S.S. Kadam (1995). *Handbook of Fruit Science and Technology: Production, Composition, Storage, and Processing*. Food Science and Technology. Taylor & Francis, pp. 315–334. ISBN: 9780824796433.
- Silve, Aude (2017). *Basic Principles of Electroporation*. proceeding della IV PEF School; 4th School on Pulsed Electric Field Applications in Food and Biotechnology.
- Sitzmann, Werner, Eugene Vorobiev e Nikolai Lebovka (2016). «Applications of electricity and specifically pulsed electric fields in food processing: Historical backgrounds». In: *Innovative food science & emerging technologies* 37, pp. 302–311.
- Telfser, Anna e Federico Gómez Galindo (2019). «Effect of reversible permeabilization in combination with different drying methods on the structure and sensorial quality of dried basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves». In: *LWT* 99, pp. 148–155.
- Töpfl, Stefan (2017). *Industrial Application of PEF in Food and Bioprocessing*. proceeding della IV PEF School; 4th School on Pulsed Electric Field Applications in Food and Biotechnology.
- Tylewicz, Urszula, Kemal Aganovic, Marianna Vannini, Stefan Toepfl, Villiam Bortolotti, Marco Dalla Rosa, Indrawati Oey e Volker Heinz (2016). «Effect of pulsed electric field treatment on water distribution of freeze-dried apple tissue evaluated with DSC and TD-NMR techniques». In: *Innovative food science & emerging technologies* 37, pp. 352–358.
- Tylewicz, Urszula, Silvia Tappi, Jessica Genovese, Massimo Mozzon e Pietro Rocculi (2019). «Metabolic response of organic strawberries and kiwifruit subjected to PEF assisted-osmotic dehydration». In: *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, p. 102190.

- Weaver, James C e Yu A Chizmadzhev (1996). «Theory of electroporation: a review». In: *Bioelectrochemistry and bioenergetics* 41, pp. 135–160.
- Yali, Wu e Zhang Dongguang (2018). «Effect of Pulsed Electric Field on Collapse Phenomenon of Apple Tissue in Vacuum Freeze Drying». In: *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. Vol. 392. 5. IOP Publishing, p. 052007.