



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento **AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE NATURALI E
AMBIENTE**

Dipartimento **TERRITORIO E SISTEMI AGRO-FORESTALI**

Corso di laurea in **SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI**

**EFFETTI REOLOGICI E QUALITATIVI DEI
TRATTAMENTI TERMICI SULLA PUREA DI MELA**

RELATORE:

Prof. Lorenzo Guerrini

CORRELATORE:

Dott. Alessandro Zanchin

LAUREANDO:

Sebastiano Meggio

Matricola n. 2032774

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

INDICE

INDICE	1
RIASSUNTO.....	5
ABSTRACT	6
Capitolo 1	9
INTRODUZIONE	9
1.1 Introduzione al lavoro	9
1.1.1 Obbiettivi	11
1.1.2 Metodo	11
1.1.3 Risultati attesi.....	12
1.2 Base teorica del lavoro	12
1.2.1 Definizioni	12
1.2.2 Applicazione teorica al caso studio	16
1.3 Descrizione da letteratura del comportamento atteso dalla matrice	17
Capitolo 2	18
MATERIALI E METODI	18
2.1 Disegno sperimentale.....	18
2.2 Analisi svolte	19
2.3 Valutazione delle caratteristiche chimico-fisiche della matrice	19
2.3.1 Viscosità.....	19
2.3.2 Solidi solubili e pH.....	19
2.3.3 Colore	20
2.3.4 Sineresi	20
2.4 Valutazione dell'attività enzimatica residua	21

2.5 Analisi dei dati laboratoriali	21
2.6 Preparazione dei campioni	22
2.7 Analisi della viscosità.....	24
2.8 Analisi della sineresi	24
2.9 Analisi del pH, solidi solubili ed umidità	25
2.10 Analisi del colore	26
2.11 Analisi attività enzimatica residua.....	26
2.11.1 Perossidasi (PO)	26
2.11.2 Polifenolossidasi (PPO).....	27
2.11.3 Pectinesterasi (PE).....	28
2.12 Analisi dei dati ottenuti.....	28
Capitolo 3	29
CASO STUDIO	29
3.1 Analisi statistiche	29
3.2 Risultati principali.....	30
3.2.1 Effetto Lotto	30
3.2.2 Variabili non influenzate dall'effetto lotto	31
3.2.3 Viscosità	31
3.2.4 Sineresi	32
3.2.5 pH.....	33
3.2.6 Variabili con significative differenze fra i lotti	34
3.2.7 Colore.....	34
3.2.8 Solidi solubili.....	36
3.2.9 Attività enzimatica residua.....	39
3.3 Discussione	43

Capitolo 4	46
CONCLUSIONI.....	46
BIBLIOGRAFIA.....	49
Documenti scientifici.....	49
Siti web.....	50

RIASSUNTO

Il settore della trasformazione della mela ha un importante peso a livello economico, ambientale ed etico, dal momento che permette di aggiungere valore ad un prodotto considerato dal mercato di più bassa qualità, evitandone perciò il suo spreco. Inoltre, viste le sempre più difficili condizioni produttive ed economiche a livello regionale, nazionale e globale, questa sezione della filiera vive grandi possibilità di espansione. Durante il progetto di tesi l'Università degli Studi di Padova ha collaborato con MelindaLab ed il Consorzio Melinda, uno dei maggiori produttori di mele nel nostro Paese.

Il lavoro di tesi ha l'obiettivo di migliorare l'attuale trattamento termico della purea di mela, prodotto di punta di MelindaLab. Questo trattamento è indispensabile per inattivare gli enzimi responsabili del peggioramento qualitativo della purea durante la shelf-life del prodotto. Perossidasi, polifenolossidasi e pectinesterasi sono naturalmente presenti nella stessa purea e possono causare l'imbrunimento di natura enzimatica, peggiorando le qualità organolettiche e nutrizionali del prodotto. L'obiettivo è quindi applicare una temperatura abbastanza elevata per un tempo sufficiente ad inattivarli. Tuttavia, questo trattamento può comportare modifiche di colore e consistenza del prodotto dovuto al suo riscaldamento, generando così dei danni di natura termica.

Perciò, durante le sperimentazioni si valutano le caratteristiche reologiche, chimiche e fisiche – per determinare i cambiamenti nella struttura della matrice – e, mediante la valutazione dell'attività enzimatica residua, si può determinare la stabilità del prodotto nel suo tempo di conservazione.

Durante le analisi sulla matrice le variabili analizzate sono: viscosità, solidi solubili, colore, pH, sineresi e si è effettuata una determinazione dell'attività residua di perossidasi, polifenolossidasi e pectinesterasi.

I dati ottenuti, successivamente poi rielaborati statisticamente, hanno evidenziato una coppia tempo-temperatura di trattamento adatta a inattivare gli enzimi responsabili di imbrunimenti e, allo stesso tempo, ad avere un ridotto effetto sulle caratteristiche reologiche e qualitative della purea di mela, raggiungendo così l'obiettivo posto dal progetto.

ABSTRACT

The apple processing sector has important economic, environmental, and ethical value weight, since it makes it possible to add value to a product considered by the market to be of lower quality, thus avoiding its waste. Moreover, given the increasingly difficult production and economic conditions at the regional, national, and global levels, this section of the supply chain experiences great possibilities for expansion. During the thesis project, the University of Padua collaborated with MelindaLab and the Melinda Consortium, one of the largest producers of apples in Italy.

The thesis work aims to improve the current heat treatment of apple puree, MelindaLab's flagship product. This treatment is essential to inactivate the enzymes responsible for the quality deterioration of the puree during the shelf-life of the product. Peroxidase, polyphenol oxidase and pectin esterase are naturally present in the puree itself and can cause enzymatic browning, worsening the organoleptic and nutritional qualities of the product. Therefore, the goal is to apply a high enough temperature for a long enough time to inactivate them. However, this treatment may result in changes in color and texture of the product due to its heating, thus generating thermal damage.

Therefore – during experiments – rheological, chemical and physical characteristics are evaluated to determine changes in the matrix structure and, through the evaluation of residual enzyme activity, the stability of the product over its storage time can be determined.

During analysis on the matrix, the variables analyzed are viscosity, soluble solids, color, pH, syneresis, and a determination of the residual activity of peroxidase, polyphenol oxidase, and pectin esterase.

The data obtained, subsequently then statistically re-processed, showed a suitable treatment time-temperature pair to inactivate the enzymes responsible for browning and, at the same time, to have a reduced effect on the rheological and quality characteristics of the apple puree, thus achieving the goal set by the project.

Ringraziamenti

Vorrei dedicare questo spazio a tutti coloro che hanno contribuito alla realizzazione di questo elaborato ed in questi anni mi hanno seguito lungo il mio percorso universitario:

Ringrazio la mia famiglia: mia mamma Annamaria, mio papà Giuseppe, mio fratello Lorenzo, i miei nonni Anna, Antonio e Rita e tutti i parenti. Senza i vostri insegnamenti, la nostra tenacia, il vostro supporto ed i nostri sacrifici tutto questo sarebbe stato impossibile.

Grazie ai miei amici di sempre: Alessio, Cristian, Francesco, Ilaria, Melany e Vanessa per tutti i momenti unici condivisi assieme in questi anni. Siete i miei complici, ognuno a suo modo in questo percorso intenso ed entusiasmante, nel bene e nel male.

Grazie a tutti i miei coinquilini: Caterina, Davide, Enrico, Giulia, Letizia, Maria, Matteo e Paolo per avermi fatto vivere un'esperienza unica. Abbiamo condiviso molto tra le mura del nostro appartamento.

Grazie ad Alice, per la tua fiducia e le tue preziose parole. In questi ultimi mesi mi hai saputo ascoltare, trasmettendomi tanta sicurezza e facendomi notare sempre il lato positivo.

Ringrazio MelindaLab per avermi dato la possibilità di svolgere il mio elaborato ed il mio tirocinio formativo in un luogo interessante e dinamico, che mi ha permesso di mettermi in gioco e fare un'esperienza che sarà preziosa per il mio futuro.

Infine, ringrazio tutti coloro che hanno partecipato alla realizzazione di questo progetto. Il vostro contributo, anche se minimo, è stato essenziale.

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1.1 Introduzione al lavoro

Nell'anno 2022 il sistema agro-alimentare italiano ha prodotto, nel suo complesso, un valore, in termini di fatturato, stimato in 621 miliardi di euro, per un peso di circa il 15% sul valore prodotto dall'intera economia. Di questo dato, agricoltura, industria alimentare e delle bevande rappresentano insieme il 40% del totale (Pesce, 2023).

Scendendo nel dettaglio, la produzione agricola vale 70,4 miliardi di euro con il comparto rappresentato dal settore frutticolo che ricopre il 5% del totale (Pupo D'Andrea, 2023).

Osservando i dati, la mela è il principale frutto fresco prodotto in Italia, con 2.256,2 tonnellate prodotte nel 2022. Di queste il 13% viene destinata alla trasformazione industriale, con i quantitativi che variano, però, di anno in anno a seconda della qualità della produzione, dell'andamento dei consumi interni e del flusso delle esportazioni (Del Bravo et al., 2022). Questi frutti sono quelli che non rispettano gli elevati standard merceologici richiesti dal mercato per il consumo fresco, e dalla loro lavorazione si producono principalmente succhi (regolamentati dalla direttiva 2012/12/CE e dal Decreto Legislativo 19 febbraio 2014, n. 20) ma anche altri prodotti, tra cui le puree.

Dal punto di vista normativo non esiste una legge ad hoc per questo tipo di alimenti, ma vengono classificati come prodotti di origine vegetale trasformati. I produttori, però, sono tenuti a rispettare due regolamenti specifici: il Reg. UE 2023/915 per quanto concerne il livello massimo di patulina ed il Reg. UE 1129/2011 per il divieto di utilizzo di sostanze coloranti nei prodotti di frutta trasformata.

Il processo di produzione delle puree di mela all'interno dell'impianto di MelindaLab comincia con l'arrivo in azienda dei frutti freschi, trasportati in bins di materiale plastico dalla capienza di 300 chilogrammi l'uno. Questi arrivano dalle varie sale di lavorazione del Consorzio Melinda, sparse in tutta la Val di Non dove tramite speciali macchine selezionatrici i frutti non idonei alla commercializzazione diretta vengono separati. Scaricati dagli autoarticolati, questi vengono alloggiati all'interno di una speciale macchina pulitrice, che li svuota e – contemporaneamente, per galleggiamento – muove le mele fino alla zona di cernita, dove un operatore scarta manualmente i frutti non idonei. Le mele entrano poi in una seconda lavatrice e, successivamente, nella detorsolatrice che le rifinisce rimuovendo il torsolo. In seguito, si trituran i frutti freschi con un mulino a

coltelli ed il prodotto subisce poi un riscaldamento ad alta temperatura (superiore ad 80 °C) all'interno di uno scambiatore di calore. Quest'ultimo trattamento ha l'obiettivo di allungare la shelf-life del prodotto tramite l'abbattimento della carica microbica (rendendo così il prodotto microbiologicamente sicuro) mantenendo, però, intatta la natura del frutto fresco mediante l'inattivazione degli enzimi nativi causa di imbrunimento. In seguito, una passatrice separa tutti gli elementi di scarto (come bucce o semi) allontanandoli dalla passata. Il semilavorato di base ottenuto può essere – quindi – direttamente confezionato o, per differenziare i prodotti immessi sul mercato, essere ulteriormente caratterizzato con puree di altri frutti. Successivamente la purea ottenuta viene stoccata in apposite cisterne ed i contenitori vengono poi trasferiti alla linea di confezionamento, dove la passata viene pastorizzata e pompata all'interno delle macchine riempitrici-saldatrici. Queste dosano il prodotto all'interno di un vasetto in materiale plastico e ne saldano una capsula in alluminio al di sopra. Uscito dalla macchina questo viene etichettato e raffreddato. Un metal-detector ai raggi-X verifica l'assenza di eventuali corpi estranei e pesa i vasetti. Questi poi raggiungono la macchina confezionatrice, che può assemblarli in confezioni da due, tramite una fascetta in materiale cartaceo, oppure inserirli direttamente nel vassoio di cartone, sempre assemblato dalla macchina. Infine, si procede alla pallettizzazione e trasferimento nei magazzini aziendali, da dove le puree vengono poi distribuite presso i clienti finali.

Come descritto, il processo di inattivazione enzimatica viene effettuato mediante trattamento termico; questo risulta molto efficace ma causa il deterioramento dei composti termo-sensibili. Esistono tecnologie alternative – definite *novel technologies* – che lavorano senza l'utilizzo del calore mediante *nonthermal treatments (NTT)* (Morales-de La Peña et al., 2019), ovvero trattamenti a freddo che riescono a preservare maggiormente le caratteristiche qualitative del trasformato. La principale di queste è l'utilizzo delle *High Hydrostatic Pressure*, in cui al prodotto si applica una pressione di 500 Mpa per 10 minuti, in sostituzione al tradizionale utilizzo del calore. Queste tecnologie però hanno ancora capacità applicative ridotte e costi molto elevati, soprattutto per impianti di grandi dimensioni. Per queste ragioni vengono preferiti ancora quelli a caldo che, pur danneggiando i composti più sensibili del prodotto, garantiscono l'efficacia del trattamento ad un costo accessibile, anche grazie alla continua evoluzione tecnica che rende questi sempre più efficienti.

In conclusione, dal momento che le materie prime utilizzate per la produzione delle puree sono quei frutti non destinate al consumo come prodotti di prima gamma, il settore della

trasformazione della mela assume un'importanza sempre maggiore sia a livello ambientale – per la riduzione agli sprechi di materie prime – sia economico – per il valore aggiunto ad un prodotto considerato di scarto. Infatti, i dati presentati nella prima parte dell'introduzione mostrano che, visto le sempre più difficili condizioni ambientali ed economiche globali, nazionali e regionali, questo settore vive e vivrà sempre più una sua espansione.

Per questo, MelindaLab (assieme al Consorzio Melinda, uno dei maggiori produttori di mele a livello nazionale) collaborano con l'Università degli Studi di Padova per trovare soluzioni innovative in grado di migliorare le qualità organolettiche e tecnologiche dei loro prodotti, nel caso specifico le puree di mela, per garantire un livello qualitativo sempre maggiore ai consumatori.

1.1.1 Obbiettivi

Lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di presentare e valutare le attività svolte presso i laboratori dell'Università degli Studi di Padova, identificando l'effetto della temperatura, del tempo di trattamento e della loro interazione, sulle caratteristiche chimico-fisiche della purea sottoposta al trattamento termico tramite la valutazione delle proprietà reologiche e la misura dell'attività enzimatica residua. Si vuole individuare, così, la migliore coppia tempo-temperatura da applicare nell'operazione unitaria di riscaldamento – essenziale all'inattivazione degli enzimi naturalmente presenti nei frutti freschi e deleteri nei confronti dei prodotti trasformati – influenzando, però, il meno possibile le caratteristiche organolettiche e qualitative del prodotto trasformato. Quindi, si vuole andare ad ottimizzare un'operazione unitaria già effettuata in azienda rendendola più delicata ma in egual modo efficiente, migliorando così la qualità nutrizionale ed organolettica del prodotto finito.

1.1.2 Metodo

Il metodo utilizzato durante il progetto si basa sull'utilizzo di diverse combinazioni tempo-temperatura per identificare quella migliore da utilizzare nel trattamento termico di inattivazione enzimatica. Per la costruzione della metodologia di analisi si fa riferimento a (Guerra et al., 2012).

Nell'articolo, i ricercatori utilizzano tre differenti metodologie per la triturazione dei frutti freschi, per il momento di applicazione del trattamento termico e per l'aggiunta dell'antiossidante (nel caso specifico acido ascorbico).

Il piano utilizzato durante le prove sperimentali è stato realizzato a partire dai dati forniti da MelindaLab, in relazione alle combinazioni tempo-temperatura utilizzate negli impianti produttivi, e sui dati contenuti all'interno del lavoro scientifico precedentemente citato.

1.1.3 Risultati attesi

Dalle sperimentazioni ci si attende un'importante diminuzione dell'attività enzimatica, dovute alle alte temperature di riscaldamento, ma sempre come effetto del trattamento termico, anche una parziale solubilizzazione delle pectine. Questo comporta una sineresi del prodotto, con la formazione di una fase liquida poco apprezzata dal consumatore e, quindi, un peggioramento delle caratteristiche sensoriali.

Le prove si pongono come obiettivo di strutturare un processo adeguato a mantenere elevata l'efficienza del trattamento ma, allo stesso tempo, renderlo più soft nei confronti della matrice.

1.2 Base teorica del lavoro

Nella prima fase del progetto è di fondamentale importanza la selezione e la ricerca dei dati resi disponibili dalla letteratura scientifica. La valutazione dello stato dell'arte ha giocato un ruolo fondamentale nelle successive fasi di analisi della matrice, dal momento che è stato spesso un punto di partenza per le sperimentazioni svolte.

1.2.1 Definizioni

Di seguito le principali definizioni delle caratteristiche analizzate nelle sperimentazioni svolte:

- *Viscosità:*

"È una misura della resistenza di un fluido al flusso." (PricetonEdu – Viscosity)

Descrive l'attrito interno di un fluido in movimento. Un fluido con elevata viscosità resiste al movimento perché la sua composizione molecolare gli conferisce molto attrito interno, mentre un fluido con bassa viscosità scorre facilmente perché la sua composizione molecolare comporta pochissimo attrito quando è in movimento. Nelle puree di mela (assieme alla frazione liquida derivata dalla sineresi) crea il profilo tattile percepito all'assaggio;

- *Grado Brix:*

È una misura delle sostanze allo stato solido dissolte in un liquido. Un grado Brix (simbolo °Bx) corrisponde a 1 parte di sostanza solida (peso secco) dissolta in 99

parti di solvente per ottenere 100 parti totali di soluzione. Per esempio, una soluzione a 25°Bx contiene 25 grammi di sostanze solide e 75 grammi di liquido ottenendo così un totale di 100 g di soluzione finale. (Wikipedia - Brix). Nelle puree di mela è una misura del grado zuccherino, importante dal punto di vista organolettico e nutrizionale.

- **Colore (CIELAB):**

La sua valutazione risulta essenziale per la qualità del prodotto, dal momento che gli acquirenti valutano questo aspetto come primo parametro al momento del consumo, ancor prima delle qualità organolettiche.

Il sistema di colore CIELAB, o CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) L^* a^* b^* , rappresenta la relazione quantitativa dei colori su tre assi: il valore L^* indica la luminosità, mentre a^* e b^* sono le coordinate di cromaticità.

Nel diagramma dello spazio-colore, L^* è rappresentato su un asse verticale con valori da 0 (nero) a 100 (bianco). Il valore a^* indica la componente rosso-verde di un colore, dove $+a^*$ (positivo) e $-a^*$ (negativo) indicano rispettivamente i valori rosso e verde. Le componenti giallo e blu sono rappresentate sull'asse b^* come valori $+b^*$ (positivo) e $-b^*$ (negativo), rispettivamente. Al centro del piano si trova il neutro o acromatico. La distanza dall'asse centrale rappresenta la cromia (C^*), o saturazione del colore. L'angolo sugli assi di cromaticità rappresenta la tonalità (h°) (Ly et al., 2020).

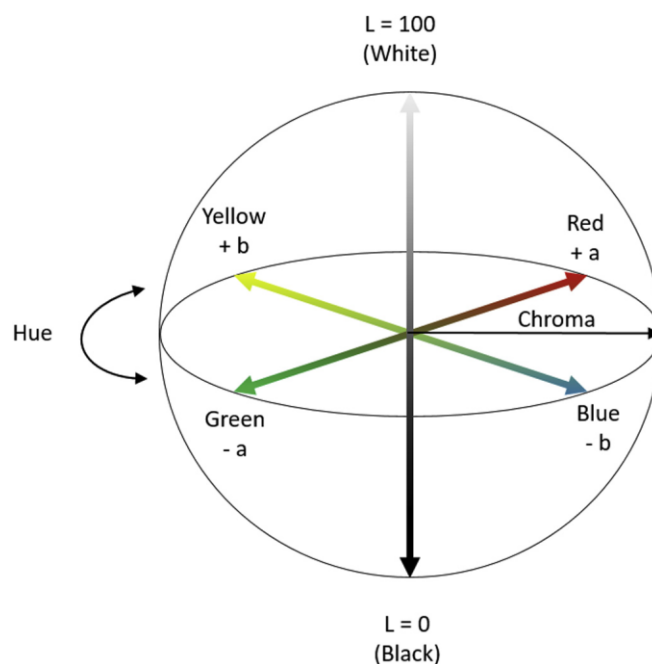


Figura 1.1 Rappresentazione grafica dello spazio CIELAB (Ly et al., 2020)

- *Sineresi:*

La sineresi si definisce come un restringimento di un gel ed avviene contemporaneamente all'espulsione del liquido o alla separazione del siero dallo stesso. Questo fenomeno è correlato all'instabilità della rete del gel (determinata dalla solubilizzazione delle pectine nella matrice), che comporta la perdita della capacità di trattenere tutta la fase del siero all'interno della matrice. (Vareltzis et al., 2016)

- *pH:*

Misura quantitativa dell'acidità o basicità di soluzioni acquose o altre soluzioni liquide.

Il termine, ampiamente utilizzato in chimica, biologia e agronomia, traduce i valori della concentrazione degli ioni idrogeno – che normalmente variano tra circa 1 e 10^{-14} grammo-equivalenti per litro – in numeri compresi tra 0 e 14. Nell'acqua pura, che è neutra (né acida né alcalina), la concentrazione degli ioni idrogeno è di 10^{-7} grammo-equivalenti per litro, che corrisponde a un pH di 7.

Una soluzione con un pH inferiore a 7 è considerata acida, una soluzione con un pH superiore a 7 è considerata basica o alcalina (Britannica – pH)

La sua valutazione è essenziale per determinare la sicurezza e la qualità organolettica delle puree di mela.

- *Enzimi coinvolti:*

- *Perossidasi:*

La perossidasi (PO) è un enzima chiave che causa l'imbrunimento di frutta e verdura, catalizzando l'ossidazione dei fenoli, tramite il perossido di diidrogeno, e portando infine all'imbrunimento di frutta e verdura (Li et al., 2018).

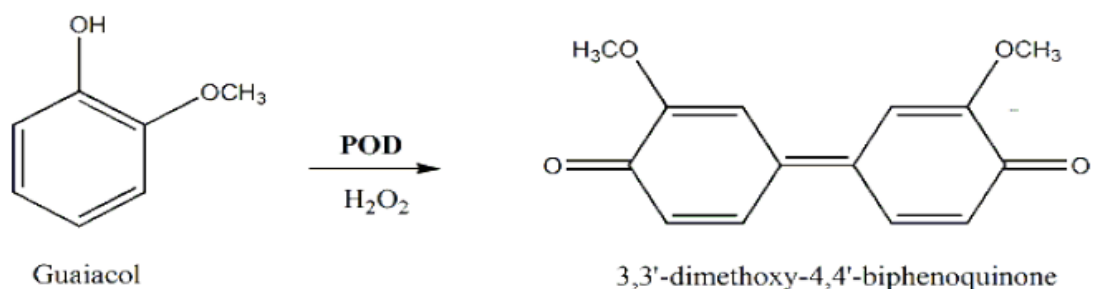


Figura 1.2 Esempio di reazione della PO (Furumo and Furutani, 2008)

- *Polifenolssidasi:*

La polifenolossidasi (PPO) catalizza l'ossidazione di una varietà di composti fenolici e genera chinoni reattivi che subiscono ulteriori reazioni, portando alla formazione di pigmenti marroni, come le melanine (Gacche et al., 2006).

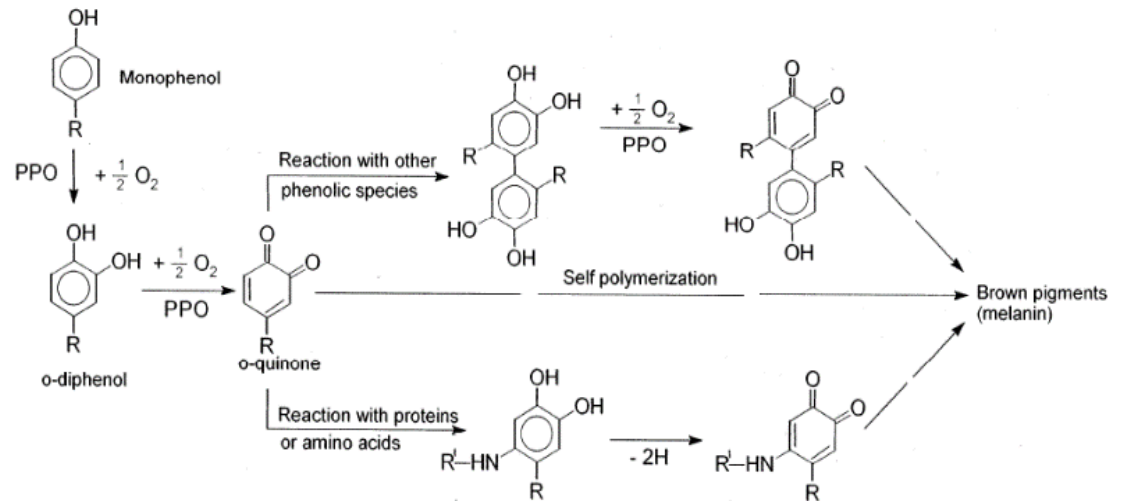


Figura 1.3 Esempio di reazione della PPO (Gacche et al., 2006)

- *Pectinesterasi:*

Questo enzima catalizza l'idrolisi dei legami metile-estere nella pectina, che è uno dei principali componenti della parete delle cellule vegetali, producendo metanolo e ossidando il gruppo metile a carbossile libero (Salas-Tovar et al., 2017)

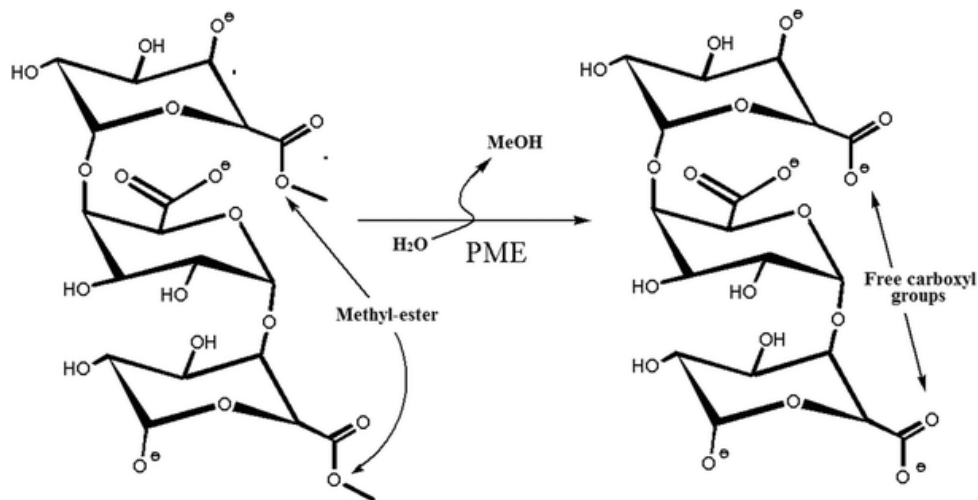


Figura 1.4 Esempio di reazione della PE (Salas-Tovar et al., 2017)

1.2.2 Applicazione teorica al caso studio

Come descritto in (Guerra et al., 2012), per la produzione della purea di frutta e l'inattivazione degli enzimi vengono attualmente adottati due principali metodi industriali: l'estrazione a caldo (Hot extraction, HE) e l'estrazione a freddo (Cold extraction, CE). Nel metodo HE, sussiste una breve distanza tra il frantoio e l'ingresso del cuocitore – e di conseguenza – il prodotto si riscalda insieme a semi, bucce e piccioli. Il macchinario utilizzato per la triturazione dei frutti freschi può essere un mulino a coltelli (od uno similare), dal momento che non si necessita la separazione fra liquido e solido (come nella produzione del succo) ma si mantiene l'integrità fisica della mela. I frutti freschi triturati avanzano per mezzo di una coclea di alimentazione ed il calore viene scambiato mediante iniezione diretta di vapore. Con questo metodo il colore, il sapore, le impurità, le muffe, i residui di fitofarmaci e le sostanze chimiche presenti sulle bucce vengono trasferiti nella polpa, con una perdita di sapore. Inoltre, il vapore alimentare utilizzato non dev'essere contaminato per evitare problemi di sicurezza nel prodotto. Il vantaggio di questa tecnologia dovrebbe essere una rapida inattivazione dell'enzima, e di conseguenza una maggiore viscosità del prodotto finito.

Nel caso della CE il prodotto viene riscaldato senza semi, bucce e piccoli, che vengono separati immediatamente dopo la triturazione. Il frantoio è situato all'ingresso dell'estrattore e vicino alla successiva sezione di inattivazione enzimatica, in modo da non esporre la purea a condizioni ossidanti per lunghi periodi, anche se ciò è inevitabile. La polpa raffinata viene riscaldata attraverso uno scambiatore di calore indiretto, che può a superficie raschiata (o "Votator") o a fascio tubiero. In questo modo non vengono trasferiti nella polpa colori, sapori, impurità, muffe, residui di fitofarmaci o sostanze chimiche indesiderate. D'altra parte, rispetto all'HE, questo processo presenta un ritardo di alcuni minuti tra la frantumazione della frutta e l'inattivazione enzimatica, con possibili maggiori problemi di imbrunimento ed una minore viscosità del prodotto.

I processi appena descritti hanno l'obiettivo di evitare la formazione di composti bruni in seguito all'attività delle perossidasi e polifenolossidasi, che attaccano i principali fenoli della mela. Come descritto in (Vrhovsek et al., 2004) nella varietà Golden Delicious questi composti sono caratterizzati per l'88% da flavonoidi (77% flavanoli, 8% flavonoli, 3% diidrocalconi) e per il 12% da acidi idrossicinnamici.

Per quanto riguarda le pectinesterasi la loro azione si concentra sulle pectine. Queste sono polisaccaridi dell'acido galatturonico, con forti capacità leganti delle strutture costituenti la parete cellulare. La loro de-metilazione (a carico dell'enzima) espone le

cariche negative del gruppo carbossilico (Salas-Tovar et al., 2017), impedendo l'interazione fra le catene polisaccaridiche e diminuendo la formazione del gel pectico, con la conseguente sineresi della fase liquida, indesiderata dal consumatore.

1.3 Descrizione da letteratura del comportamento atteso dalla matrice

Da una valutazione della letteratura scientifica disponibile, possiamo prevedere i risultati attesi delle prove effettuate:

- *Caratteristiche chimico-fisiche:*

Il trattamento termico è ampiamente utilizzato per migliorare la qualità e la sicurezza dei prodotti a base di frutta e verdura, ma questo processo può causare una sostanziale ossidazione e reazioni di imbrunimento, che a loro volta possono degradare le caratteristiche nutrizionali e organolettiche (Buergy et al., 2020).

Dalla purea di mela ci si attende un comportamento pseudoplastico (Kim et al., 2021), con una solubilizzazione delle pectine durante il trattamento termico (misurate mediante il grado Brix sulla fase liquida) ed una successiva disgregazione del tessuto in relazione al processo meccanico subito dalla matrice. L'entità di questi effetti definisce, poi, la texture della purea (Buergy et al., 2021). Dai trattamenti previsti ci si aspetta, quindi, un mantenimento della consistenza, ma un aumento del grado Brix (Guerra et al., 2012).

Per quanto riguarda il colore, si prevede un imbrunimento a causa dell'entità del trattamento termico. A partire dai dati ottenuti dal sistema CIE, calcoliamo il parametro TCD (Total Color Difference) e – poiché una differenza di colore totale (TCD) superiore a valori tra 2 e 3 è percepibile dagli esseri umani – ci si attende un cambiamento di colore con un valore di $TCD > 2,5$ (Guerra et al., 2012).

- *Attività enzimatica residua:*

Per quanto riguarda questo aspetto l'entità del trattamento termico è ampiamente superiore alla temperatura di inattivazione degli enzimi; quindi, ci si aspetta una loro attività residua assente (Guerra et al., 2012). Infatti, le attività di PPO e PO risultano completamente inattivate dopo il riscaldamento, sia in presenza che in assenza di ossigeno e ciò significa che questo non è un fattore influenzante. Inoltre, l'inattivazione degli enzimi ossidativi può aiutare a ritardare i cambiamenti di colore, sapore e proprietà salutistiche, aumentando al contempo la stabilità durante la conservazione e la shelf-life del prodotto (Kim et al., 2021).

Capitolo 2

MATERIALI E METODI

Nel seguente capitolo si procederà descrivendo, nel dettaglio, le procedure ed i materiali utilizzati durante la fase laboratoriale del progetto, svolte nel mese di febbraio 2024.

Si elencheranno le metodiche utilizzate in tutte le fasi delle sperimentazioni: in primo luogo la preparazione dei campioni, poi la valutazione di tutte le caratteristiche fisico-chimiche ed – a seguire – l'analisi dell'attività enzimatica residua ed infine l'elaborazione dei dati ottenuti.

2.1 Disegno sperimentale

Il piano sperimentale utilizzato durante le analisi è stato un CCD (*Central Composite Design*), (Delli Compagni et al., 2016) a dodici prove ripetute per tre volte, quindi trentasei in totale. Questo disegno permette di ottenere dati statisticamente significativi, con un numero di esperimenti limitato e, quindi, una più efficiente gestione delle risorse a disposizione. La matrice utilizzata durante il lavoro è quella riportata nella tabella sottostante. Il valore centrale (12 min, 95 °C) è stato ripetuto 4 volte per ogni lotto.

Tabella 2.1 Disegno sperimentale e valori utilizzati durante le prove per i due fattori testati

Test (N°)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	8	90.0
2	16	90.0
3	8	100.0
4	16	100.0
5	12	95.0
6	12	95.0
7	6.3	95.0
8	17.6	95.0
9	12	87.9
10	12	102.1
11	12	95.0
12	12	95.0

2.2 Analisi svolte

La materia prima di partenza per gli esperimenti svolti sono mele di cultivar Golden Delicious provenienti dal Consorzio Melinda e conservate presso i laboratori dell'Università degli Studi di Padova.

Queste vengono pesate, pelate, detorsolate e meccanicamente trasformate in purea. Lo strumento utilizzato per quest'ultima operazione è il mixer termico Hotmix PRO Master 5 Star, che permette di automatizzare – dopo il corretto inserimento dei parametri di lavorazione – gran parte del processo di trasformazione dei frutti freschi.

2.3 Valutazione delle caratteristiche chimico-fisiche della matrice

Come descritto nel precedente paragrafo, durante gli esperimenti si produce la purea di mele a partire dai frutti freschi di cultivar Golden Delicious.

Di questa matrice, poi, si analizzano: viscosità, solidi solubili e pH, colore, sineresi, ed attività enzimatica residua di perossidasi, polifenolossidasi e pectinesterasi.

Infine, tutti i dati ottenuti sperimentalmente vengono rielaborati tramite vari software tra cui, il più importante, Microsoft Excel.

2.3.1 Viscosità

La prima analisi effettuata sulla matrice è la prova della viscosità, misurata con un viscosimetro rotazionale AntonPaar ViscoQC 300L. Il suo funzionamento è semplice: l'operatore seleziona il numero di giri a cui lo strumento opera, e questo – a seconda del valore – imprime una determinata forza rotante ad un ago (nel caso specifico tipologia L4) immerso nella matrice. A seconda della resistenza alla rotazione opposta da quest'ultimo, si riesce a determinare la viscosità della purea. Nei successivi paragrafi si dettaglieranno le caratteristiche nel suo utilizzo durante gli esperimenti. I dati ottenuti dalla macchina vengono successivamente interpolati con un modello che, in base alle caratteristiche dello strumento, corregge il valore ottenuto sperimentalmente e fornisce la misura reale di viscosità.

2.3.2 Solidi solubili e pH

Per la valutazione del pH e dei solidi solubili – utilizzando il grado Brix – si parte da una filtrazione della purea, mediante un filtro-carta, per ottenere una matrice liquida utilizzabile dal rifrattometro da banco e dal pH-metro.

Infatti, per la natura di questi parametri è impossibile misurare direttamente il valore dalla purea, ma si rende necessario ottenere un liquido per evitare l'interferenza dei soluti nella matrice.

È necessario effettuare questa operazione prima del raffreddamento della purea, in modo da facilitare la separazione fra fase solida e liquida.

Gli strumenti utilizzati sono stati un pH-metro XS Instruments Vio ed un rifrattometro digitale Hanna Instruments HI 96811.

2.3.3 Colore

Dopo una sosta della purea di trenta minuti, si procede alle valutazioni sul colore. In laboratorio si fotografano i campioni tramite macchina fotografica digitale. Questa fase verrà approfondita in dettaglio nei successivi paragrafi.

Successivamente si realizza la rielaborazione delle immagini mediante il software Food Image Inspector per valutare il colore della fotografia tramite lo spazio colore CIELab.

I dati vengono poi confrontati mediante la formula del Total Color Difference (TCD), come descritto nel Paragrafo 1.2.1, e nella seguente equazione:

$$TCD = \sqrt{(L^* - L_s^*)^2 + (a^* - a_s^*)^2 + (b^* - b_s^*)^2}$$

dove:

L^* = luminosità della purea dopo il trattamento termico;

L_s^* = luminosità della purea non cotta (controllo);

a^* = valore di rosso della purea dopo il trattamento termico;

a_s^* = valore di rosso della purea non cotta (controllo);

b^* = valore di giallo della purea dopo il trattamento termico;

b_s^* = valore di giallo della purea non cotta (controllo).

2.3.4 Sineresi

La valutazione della sineresi, frutto di una tecnica sviluppata appositamente per il progetto in analisi, si realizza in due parti: una laboratoriale ed una successiva rielaborazione dei dati. Durante le prove sperimentali si preparano dei coppapasta dove si lascia la purea per ventiquattr'ore in sosta. Successivamente, si fotografano i risultati con uno speciale strumento per la macchina fotografica, in modo da rendere omogenee le fotografie. Questa procedura verrà dettagliatamente descritta nei successivi paragrafi. Le immagini vengono successivamente elaborate con due software open access: ImageJ, impiegato per segmentare solamente l'area utile alla successiva analisi

effettuata con Apeer.com, strumento di Intelligenza Artificiale utilizzato per la segmentazione semantica delle immagini.

2.4 Valutazione dell'attività enzimatica residua

L'attività enzimatica residua si misura attraverso un'analisi spettrofotometrica della componente liquida estratta dalla purea di mela. Infatti, la prima operazione da svolgere è la separazione – tramite filtro-carta – del siero.

Le analisi spettrofotometriche si realizzano tramite il sistema dello standard interno, nel quale una molecola con una struttura simile a quella dell'analita (e conseguentemente una lunghezza d'onda d'assorbimento paragonabile) viene aggiunta in quantità nota alla soluzione.

Nello caso specifico queste molecole sono substrati degli enzimi e, conseguentemente, la loro attività è stata calcolata in base alla quantità di prodotti di degradazione derivati, individuata grazie alla trasmittanza dei campioni alla lunghezza d'onda emessa dallo strumento, cioè quella impostata.

Lo spettrofotometro utilizzato durante le sperimentazioni è un Jenway 6300. L'apparecchio lavora nello spettro del visibile ed è dotato di un sistema ottico a singolo raggio, con un range da 320 a 1000 nm. La risoluzione è di 1 nm e l'accuratezza ± 2 nm. Per la sua natura costruttiva si rende necessario – durante la misurazione dell'attività enzimatica residua – tarare lo spettrofotometro utilizzando la funzione “autozero”, assegnando il valore di 0 nm al bianco. In tal modo alla lettura dei campioni lo strumento è già tarato, fornendo come risultato il valore di trasmittanza netto.

2.5 Analisi dei dati laboratoriali

Infine, tutti i dati ottenuti dalle varie analisi descritte si raccolgono in un documento Excel dove si effettuano tutte le analisi statistiche, in particolare il calcolo di medie, deviazione standard ed analisi della varianza (ANOVA). Nello specifico, l'ANOVA (dall'inglese Analysis of Variance) è un insieme di tecniche statistiche facenti parte della statistica inferenziale che permettono di confrontare due o più gruppi di dati paragonando la variabilità interna a questi gruppi con la variabilità tra gli stessi. Il test permette di verificare l'ipotesi di uguaglianza tra due o più medie di popolazioni attraverso l'analisi delle varianze campionarie.

La seconda analisi statistica utilizzata per l'analisi dei dati è la Response Surface Methology (RSM), descritta dettagliatamente nel Capitolo 3. Dalla rielaborazione statistica dei valori ottenuti durante la fase laboratoriale si ottengono tutti i grafici utili ad

una migliore comprensione dei risultati degli esperimenti. Questi verranno presentati dettagliatamente sempre nel Capitolo 3.

2.6 Preparazione dei campioni

La prima fase delle sperimentazioni è la preparazione della purea di mela a partire da mele di cultivar Golden Delicious, fornite da MelindaLab a cui sono state consegnate dal Consorzio Melinda. In laboratorio abbiamo ricevuto tre lotti differenti (24017, 24018 e 24019) che indicano l'anno di arrivo in azienda ed il numero progressivo di consegna.

I frutti sono stati conservati in cella frigorifera ad una temperatura tra i 2 ed i 4 °C dalla raccolta fino al momento della trasformazione nei magazzini del Consorzio Melinda. Anche nei laboratori dell'Università degli Studi Padova le condizioni di stoccaggio descritte sono rimaste invariate.

In primo luogo, si selezionano i frutti freschi (scartando quelli marci o difettosi), si pelano, poi si rimuove il picciolo, si detorsolano ed infine si pesano fino ad averne 1.5-2.0 kg, come i valori indicati nella tabella sottostante (Tab. 2.1). Si procede aggiungendo 400 mg/kg di acido ascorbico come antiossidante, da una soluzione al 20%_{m/V}.

Le mele poi, mediante il mixer termico Hotmix PRO Master 5 Star, si trituran a 3000 rpm per quindici minuti, senza riscaldamento. Successivamente, la massa triturata rimane in sosta durante la fase di riscaldamento fino alla temperatura target.

Si completano le operazioni di produzione della purea mantenendo la massa alle temperature e per i tempi indicati dello schema del disegno sperimentale e riportato nella matrice sottostante. Durante questo periodo, la massa viene movimentata con un'apposita spatola in materiale plastico che ruota a 300 rpm.

Per ogni campione (cioè, una specifica combinazione tempo-temperatura) si passa quindi alla seconda fase delle analisi, cioè alla valutazione delle caratteristiche del prodotto descritte nei paragrafi successivi.

Tabella 2.1 Dati di partenza per la preparazione dei campioni di purea, dettagliati per lotto

LOTTO	N°	t min	t sec	T °C	Mele intere (g)	Mele trasf. (g)	mL A.A.	t (sec) T _{amb} a T _{target}
24017	9	12	0	88	1782,0	1328,0	2,7	183,0
24017	1	8	0	90	1953,0	1499,4	3,0	302,0
24017	2	16	0	90	1832,2	1387,9	2,8	300,0
24017	5	12	0	95	1755,3	1305,1	2,6	328,0
24017	6	12	0	95	1872,0	1373,1	2,7	286,0
24017	7	6	20	95	1816,6	1306,4	2,6	246,0
24017	8	17	40	95	1852,0	1406,5	2,8	247,0
24017	11	12	0	95	1939,6	1409,9	2,8	279,0
24017	12	12	0	95	1961,7	1836,3	3,7	369,0
24017	3	8	0	100	1841,1	1387,3	2,8	435,0
24017	4	16	0	100	1858,0	1298,0	2,6	327,0
24017	10	12	0	102	1836,3	1450,7	2,9	349,0

24018	9	12	0	88	1858,9	1414,4	2,8	182,0
24018	1	8	0	90	1773,2	1320,9	2,6	201,0
24018	2	16	0	90	1748,7	1256,1	2,5	210,0
24018	5	12	0	95	1785,6	1331,1	2,7	254,0
24018	6	12	0	95	1816,1	1392,1	2,8	303,0
24018	7	6	20	95	1872,1	1342,4	2,7	286,0
24018	8	17	40	95	1790,1	1275,5	2,6	243,0
24018	11	12	0	95	1837,7	1366,5	2,7	275,0
24018	12	12	0	95	1892,8	1409,1	2,8	263,0
24018	3	8	0	100	1856,4	1364,5	2,7	406,0
24018	4	16	0	100	1871,4	1408,5	2,8	450,0
24018	10	12	0	102	1872,2	1391,3	2,8	> 450,0

24019	9	12	0	88	1902,1	1420,0	2,8	195,0
24019	1	8	0	90	2026,4	1444,7	2,9	360,0
24019	2	16	0	90	1915,0	1433,1	2,9	252,0
24019	5	12	0	95	1917,2	1365,7	2,7	399,0
24019	6	12	0	95	1953,4	1388,0	2,8	644,0
24019	7	6	20	95	1962,3	1380,9	2,8	325,0
24019	8	17	40	95	1915,4	1363,1	2,7	379,0
24019	11	12	0	95	1921,4	1412,2	2,8	354,0
24019	12	12	0	95	1957,7	1505,9	3,0	451,0
24019	3	8	0	100	1942,4	1415,8	2,8	480,0
24019	4	16	0	100	1925,4	1386,8	2,8	506,0
24019	10	12	0	101	1936,4	1346,9	2,7	563,0

2.7 Analisi della viscosità

Si procede innanzitutto con la preparazione di un campione per l'analisi con il viscosimetro rotazionale AntonPaar ViscoQC 300L. Si pesano circa all'incirca cinquecento grammi di purea all'interno di una brocca in materiale plastico e – contemporaneamente – si misura sempre la temperatura, per l'effetto che questa ha sulla consistenza. Il suo valore è, tendenzialmente, compreso tra i 35 e i 40 °C.

Successivamente, si tara il dispositivo per la misura e, nel caso specifico delle analisi svolte, si impostano 50 rpm (rotazioni per minuto). Iniziata la misura si attendono 45 secondi (o comunque un valore stabile di viscosità) prima di leggere il valore, ripetendo la misura per tre volte.

2.8 Analisi della sineresi

Il procedimento utilizzato durante le fasi laboratoriali non deriva da una metodica ufficiale ma si è sviluppata appositamente una metodologia innovativa per il progetto sperimentale in analisi che avesse come risultato un impatto visivo sulla percezione da parte del consumatore della sineresi.

Nella prima fase si preparano i supporti per le sperimentazioni: su una superficie piana si fissa un foglio da disegno Fabriano F2 ruvido precedentemente stampato come in Figura 2.1. Si procede quindi posizionando al centro un coppapasta in acciaio inox (diametro 6 cm, altezza 5 cm) dove, dopo la taratura, si inseriscono esattamente ottanta grammi di purea. Si ripete l'operazione per le tre prove di ogni campione. Si lascia riposare la purea per ventiquattr'ore e, al termine, si procede fotografando il risultato a luminosità ed impostazioni dello strumento fisse, come in Figura 2.1.

Come precedentemente descritto, queste immagini sono poi rielaborate: in una prima fase, tramite il programma *ImageJ*, si procede ritagliando l'immagine lungo il perimetro del cerchio più esterno in modo da standardizzare tutte le fotografie. Successivamente, si utilizza un software online (*Apeer.com*) per la segmentazione semantica: evidenziando il contorno della superficie del foglio ricoperta dal liquido, l'Intelligenza Artificiale ne calcola direttamente il valore dell'area, escludendo lo sfondo dell'immagine. Questo permette di ottenere dei precisi valori di sineresi, anche se ogni campione ha una differente area di diffusione del siero dalla purea. I risultati dell'analisi ottenuti dall'elaborazione hanno come unità di misura il pixel²; quindi, si procede al confronto fra le diverse aree di diffusione del liquido trasformando i seguenti valori in aree percentuali rispetto alla superficie totale del foglio.



Figura 2.1 Coppapasta e cartoncino per la valutazione della sineresi, a sinistra; supporto per la macchina fotografica con illuminazione costante, a destra.

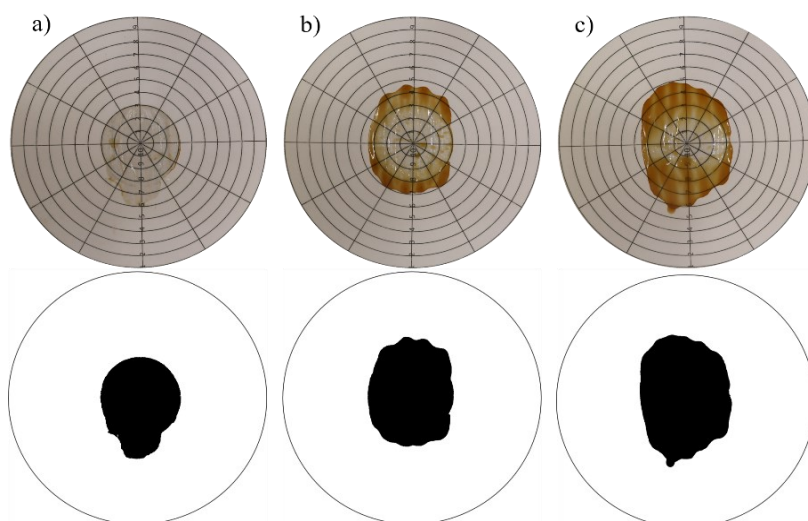


Figura 2.2 Fotografie dei risultati ottenuti dopo 24 ore e risultati della segmentazione semantica tramite Intelligenza Artificiale

2.9 Analisi del pH, solidi solubili ed umidità

Come descritto nel precedente capitolo, per la misura del pH e la valutazione dei solidi solubili, prima di poter misurare questi valori si rende necessaria una separazione di parte del siero dalla purea. Questo si effettua mediante filtro-carta che permette di separare parte della frazione liquida. L'operazione si svolge quando la purea è ancora calda, dal momento che la temperatura maggiore favorisce la separazione fra le due fasi. La misura si effettua posizionando una goccia di siero sul prisma del rifrattometro e, automaticamente, questo fornisce la misura del contenuto zuccherino in gradi Brix. Per la misura del pH, si immerge la sonda dello strumento nella matrice liquida attendendo poi il risultato dallo stesso.

L'umidità si misura utilizzando una stufa da laboratorio, dove si lasciano i campioni a 105 °C per 24 ore. Si pesa la purea sia prima che dopo l'essiccazione e dalla differenza si calcola l'umidità del prodotto.

2.10 Analisi del colore

Durante le analisi si raccolgono i dati utili alle valutazioni mediante fotografie alla matrice. Si versa la purea ancora calda su una piastra di Petri, distribuendo omogeneamente il campione. Dopo una sosta della purea di trenta minuti, si pone la piastra all'interno di una camera nera, illuminata da una fonte luminosa bianca. In questo modo l'ambiente di analisi non subisce variazioni date dalle condizioni esterne, riducendo così l'errore delle sperimentazioni. Infine, si fotografa ogni piastra tre volte, per avere più di un dato su cui lavorare. La successiva analisi del colore si effettua utilizzando il software Food Image Inspector, che separa le immagini segmentando in base ai colori dei pixels tramite il sistema CIELab, e fornendo il valore di TCD.

2.11 Analisi attività enzimatica residua

Come descritto nel capitolo precedente l'analisi dell'attività residua si valuta tramite spettrofotometria. Si descriveranno ora nel dettaglio le metodiche utilizzate nella valutazione, con un focus specifico per ogni enzima.

2.11.1 Perossidasi (PO)

Per la valutazione dell'attività residua della perossidasi (PO) il procedimento prevede un'estrazione dedicata. Si prelevano 10 g di purea e si aggiungono 20 mL di soluzione estraente composta da: albumina di siero bovino, Triton X-100 (tensioattivo non ionico), e tampone fosfato (per stabilizzare la soluzione intorno a pH 5), e segue poi una filtrazione con filtro-carta. Si procede, successivamente, preparando le cuvette per l'analisi spettrofotometrica:

- Il campione
 - 500 µL di estratto, 1 mL 0,05 M tampone fosfato, 1 mL ABTS 0,0091 M (standard interno), e 0,500 mL di perossido di diidrogeno con concentrazione di 1,5 %_{V/V} (catalizzatore dell'enzima);
- Il bianco
 - 1,5 mL di acqua, 0,5 mL di perossido di diidrogeno e 1,0 mL fosfato di potassio.

Si procede poi impostando lo spettrofotometro sulla lunghezza d'onda di 405 nm, utile a rilevare (tramite assorbimento specifico) un prodotto derivato dalla degradazione dell'ABTS da parte della perossidasi. Si lascia il campione nello spettrofotometro per dieci minuti, e questo ripete le letture ogni trenta secondi in maniera automatica.

Successivamente si convertono questi dati per ottenere i valori di attività enzimatica residua: $PO = \text{Dato spettrofotometro} \times 4$

L'unità di misura utilizzata durante le sperimentazioni è: ABS/g*min, ovvero, differenza di assorbanza per grammo di campione al minuto.

I dati ottenuti vengono raccolti in un foglio Excel e successivamente rielaborati statisticamente.

2.11.2 Polifenolossidasi (PPO)

Similarmente, anche per la valutazione dell'attività della polifenolossidasi (PPO) si realizza un'estrazione dedicata. Si prelevano 10 g di purea e si aggiungono 20 mL di soluzione estraente composta da: soluzione tampone (formata da fosfato di sodio monobasico al 64% e dibasico al 36%), idrossido di sodio, Triton X-100 0,5%_{v/v} (tensioattivo non ionico) e segue poi una filtrazione con filtro-carta. Si procede, successivamente, preparando le cuvette per l'analisi spettrofotometrica:

- Il campione:
 - 0,5 mL di estratto e soluzione tampone, 2,5 mL L-DOPA 0,0015 M (standard interno);
- Il bianco:
 - 0,5 mL di acqua, soluzione tampone (fosfato di sodio monobasico e dibasico), 2,5 mL L-DOPA 0,0015 M.

Si procede, poi, impostando lo spettrofotometro sulla lunghezza d'onda di 480 nm e si lascia il campione nello spettrofotometro per dieci minuti, che ripete le letture ogni trenta secondi in maniera automatica.

Successivamente si convertono questi dati per ottenere i valori di attività enzimatica residua: $PPO = \text{Dato spettrofotometro} \times 4$

L'unità di misura utilizzata durante le sperimentazioni è: ABS/g*min, ovvero, differenza di assorbanza per grammo di campione al minuto.

Come nella precedente analisi, i dati ottenuti vengono raccolti in un foglio Excel e successivamente rielaborati statisticamente.

2.11.3 Pectinesterasi (PE)

Infine, la valutazione dell'attività della pectinesterasi (PE) si effettua mediante titolazione dei gruppi carbossilici liberi delle pectine dopo la reazione di metil-esterasi promossa dall'enzima. Si filtrano cinque millilitri di succo di mela (precedentemente utilizzati per la misura del pH) e si aggiungono a cinquanta millilitri di soluzione di pectina preparata precedentemente. Questa è composta da: 50 mL di pectina all'1 %_{m/V} e cloruro di sodio 0,3 M. Successivamente si stabilizza a pH 7.5 aggiungendo idrossido di sodio 0,02 M. Successivamente si agita il campione meccanicamente e lo si titola rapidamente con NaOH, a 30 °C costanti, mantenendo il pH di 7.5, registrandone il consumo durante un tempo di reazione di 30 minuti.

Allo stesso tempo si prepara un campione bianco contenente soluzione di pectina e l'enzima inattivato (mediante riscaldamento in acqua bollente).

Successivamente si convertono questi dati per ottenere i valori di attività enzimatica

$$\text{residua: PE} = \left[\frac{(\text{Volume NaOH}) \times 0,02 \times 1000}{(30 \times 5)} \right]$$

L'attività della PE è stata espressa come mmol/mL*min, ovvero, millimoli di gruppi carbossilici prodotti dalle pectinasi (od in alternativa millimoli di NaOH consumati nella titolazione) per mL di succo di mela al minuto, a pH 7.5 e 30 °C.

2.12 Analisi dei dati ottenuti

Si utilizza il software Microsoft Excel per visualizzare i dati, per ricavare ed analizzare vari grafici ed infine per il calcolo dei fattori di correlazione all'interno dei lotti, valutando devianza e varianza all'interno degli stessi. Questo è stato di fondamentale importanza per poter affermare che non esistono differenze statisticamente significative fra le medie all'interno di alcune variabili e, conseguentemente, di elaborare un numero di dati significativamente inferiori a quelli ottenuti laboratorialmente.

Inoltre, grazie al software RStudio (2022.2.0), la visualizzazione dei dati è semplificata da una serie di grafici utili a visualizzare e riassumere i risultati e, quindi, ad una loro migliore comprensione, come presentati nel capitolo seguente.

Capitolo 3

CASO STUDIO

3.1 Analisi statistiche

L'analisi della correlazione fra i dati si realizza in diversi step. Inizialmente, si procede mediante un'analisi della varianza (ANOVA) fra i tre lotti, per determinare eventuali differenze significative tra di essi.

Durante la prima fase si utilizza l'ANOVA a due fattori, con l'obiettivo di identificare l'eventuale effetto "lotto di mele" sulle puree, e scorporandone la variabilità causata dalle prove. Successivamente, si calcola graficamente (tramite l'ausilio di Excel) la retta regressione lineare fra le due variabili indipendenti tempo e, separatamente, temperatura per ognuna delle singole variabili chimico-fisiche. Per una maggiore comprensibilità del dato si individua anche il coefficiente di determinazione R^2 , che indica il valore del legame di dipendenza stimato fra le due variabili. Il dato varia da 0 ad 1, ed assume valore 0 quando non esiste legame lineare, mentre 1 quando la regressione è massima.

Come ultimo test, si procede all'elaborazione dei dati tramite l'analisi Response Surface Methodology (RSM), che stima un modello multivariato – includendo la regressione lineare e quadratica dei fattori, oltre alla loro interazione – per predire combinazioni non verificate con la sperimentazione. Questa metodologia di analisi fornisce un modello empirico in cui i fattori, cioè i dati derivanti dal disegno sperimentale e dalla pratica laboratoriale, vengono correlati fra loro per fornire una risposta il più possibile approssimata alla realtà (Wikipedia, Response surface methodology). Nel caso specifico del progetto in analisi l'utilizzo di un disegno sperimentale "Central Component Design" (CCD) e della RSM hanno permesso di stimare vari modelli di secondo grado (cioè, per le due variabili tempo e temperatura) utili al raggiungimento degli obiettivi descritti nel primo capitolo. Infine, questa analisi produce una serie di modelli e di grafici correlati che si descriveranno accuratamente nel prossimo paragrafo.

Per l'interpretazione di quest'ultimi è necessario visualizzare le linee all'interno degli assi che rappresentano valori uguali fra loro, e queste sono assimilabili alle curve di livello (o isoipse) di una cartina geografica. Sono molto utili per orientarsi all'interno dello spazio determinato dall'asse orizzontale, tempo, e l'asse verticale, temperatura.

3.2 Risultati principali

Nel seguente paragrafo si dettaglieranno i risultati ottenuti dall'elaborazione statistica mediante le metodologie indicate precedentemente. Si procederà, quindi, descrivendo i risultati dell'ANOVA due fattori (Paragrafo 4.2.1) e, successivamente, si presenteranno modelli e grafici dell'analisi RSM.

3.2.1 Effetto Lotto

L'analisi delle varianze sui dati sperimentali fornisce una prima importante informazione: tre proprietà hanno mostrato risposte molto simili nei diversi lotti, rendendo le differenze non statisticamente significative.

Le caratteristiche non influenzate dall'effetto lotto sono:

- Viscosità
- Sineresi
- pH

Dopo aver evidenziato questa differenza statistica si procede analizzando innanzitutto le proprietà non influenzate dall'effetto lotto. Come indicato dalla colonna p-Value, i test sono statisticamente significativi e, inoltre, la stima dell'errore per i dati (Lack of Fit) si è sempre dimostrata non significativa (Tab. 3.1, 3.2 e 3.3)

Invece, per la misura dei solidi solubili, del colore, dell'umidità e dell'attività enzimatica residua (in particolare di polifenolossidasi e perossidasi) l'analisi statistica rileva delle differenze statisticamente significative all'interno dei lotti. Queste sono più facilmente visualizzabili dai grafici box plot riportati di seguito, derivanti dall'analisi ANOVA.

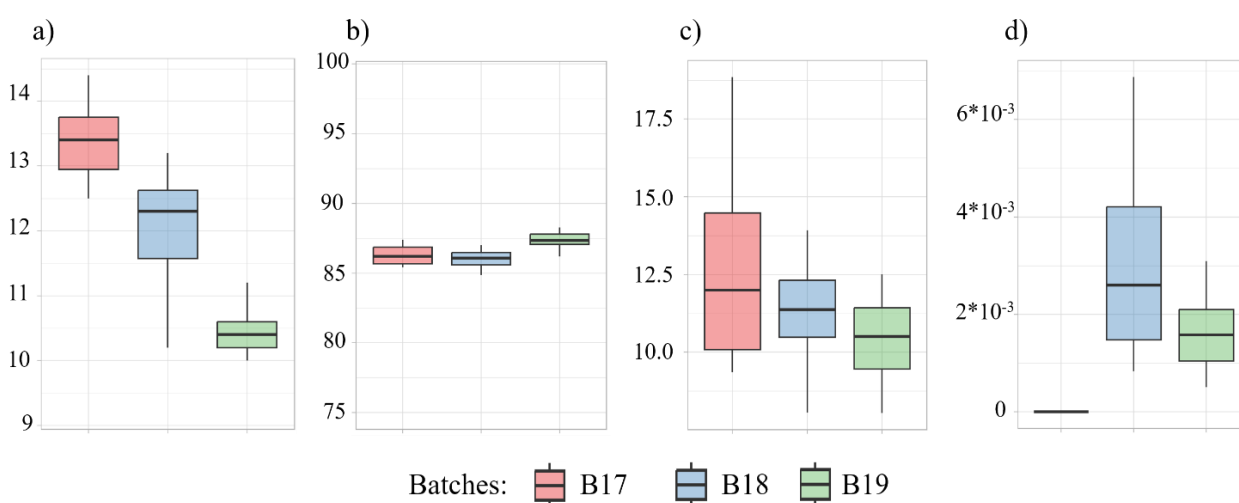


Figura 3.1 Box plot – a) Solidi solubili – b) Umidità – c) Total Color Difference – d) Attività residua PPO

3.2.2 Variabili non influenzate dall'effetto lotto

La seguente tabella riassume i risultati del test RSM per viscosità, sineresi e pH, ovvero quelle variabili con una tendenza costante tra i lotti. Si procederà ora alla descrizione dei risultati per ogni singola variabile.

Tabella 3.1 Riassunto risultati analisi RSM – Lotto Tutti

Lotto	Variabile	Lineare			Quadratico		p-Value	Lack of Fit
		Temperatura	Tempo	Temp*Tempo	Temperatura	Tempo		
Tutti	Viscosità	**	NS	NS	NS	NS	*	NS
Tutti	Sineresi	*	*	NS	NS	NS	*	NS
Tutti	pH	***	NS	NS	NS	NS	**	NS

3.2.3 Viscosità

L'analisi statistica mostra un andamento direttamente proporzionale fra la viscosità e la temperatura, cioè all'aumento della prima aumenta anche la seconda. Mentre, il tempo (come visibile in Tab. 3.1), non ha un'influenza significativa nei confronti della viscosità. Il grafico RSM mostra che per temperature maggiori la viscosità è più alta, rappresentata dai colori rosso e bianco. Ad esempio, alla temperatura di 90 °C per 8 minuti la purea raggiungerà, teoricamente, una viscosità minore di circa 5800 mPa*s. Questo accade per una maggiore solubilizzazione delle pectine che migliorano la consistenza della purea e vanno ad aumentare la viscosità dopo il trattamento termico. Inoltre, come si presenterà successivamente, l'effetto della pectinesterasi – nelle condizioni presentate – è minore per una sua quasi totale inattivazione; quindi, le pectine non si degradano per azione enzimatica, ma si solubilizzano all'interno del prodotto.

Il modello originato dall'analisi è il seguente:

$$\text{Viscosità} = -25.242 \cdot \text{Tempo (min)} + 118.793 \cdot \text{Temperatura (°C)} - 4710.9$$

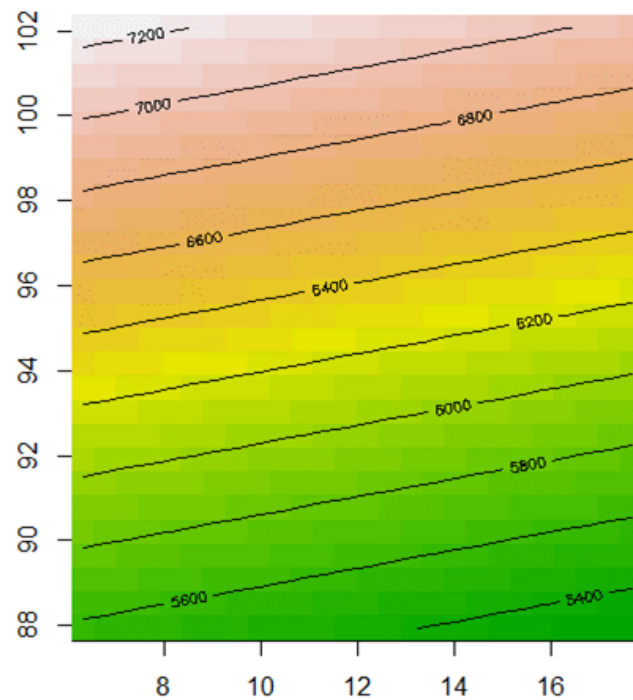


Figura 3.2 Analisi RSM - Viscosità

3.2.4 Sineresi

L'analisi statistica mostra un andamento indirettamente proporzionale fra la temperatura e la sineresi, cioè all'aumento della prima diminuisce la seconda.

Ma, nel caso specifico, il tempo ha un'influenza significativa nei confronti della sineresi, come visibile nella tabella 3.1.

Il grafico RSM mostra la superficie (in percentuale) coperta della macchia di sineresi. Si può distinguere che per temperature più basse la sineresi è maggiore, rappresentata dai colori rosso e bianco, e tende a diminuire nelle aree superiori del piano, dove le temperature di trattamento termico sono maggiori.

Nella figura 3.4 si visualizza il fenomeno di copertura del foglio mediante degli esempi di immagini derivanti dal lotto 24017.

Il modello originato dall'analisi è il seguente:

$$\text{Sineresi} = -0.137 \cdot \text{Tempo (min)} - 0.113 \cdot \text{Temperatura (°C)} + 21.994$$

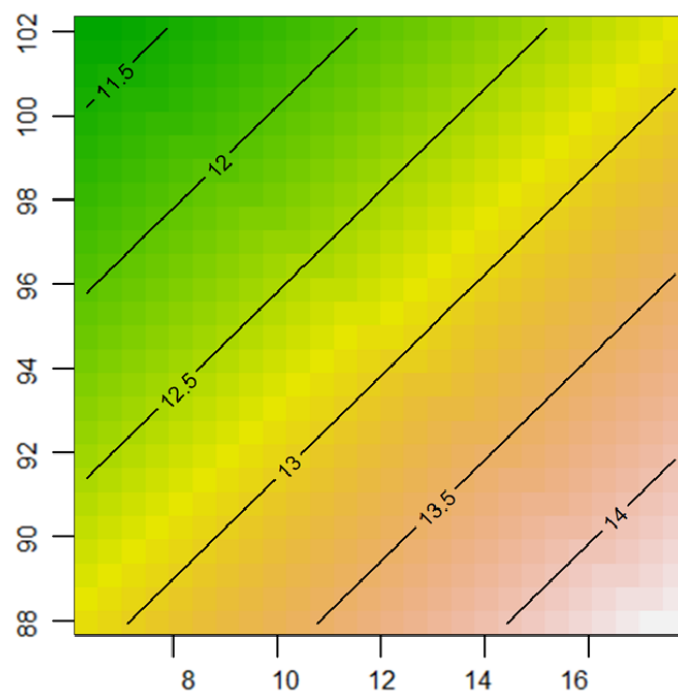


Fig. 3.3 Analisi RSM – Sineresi

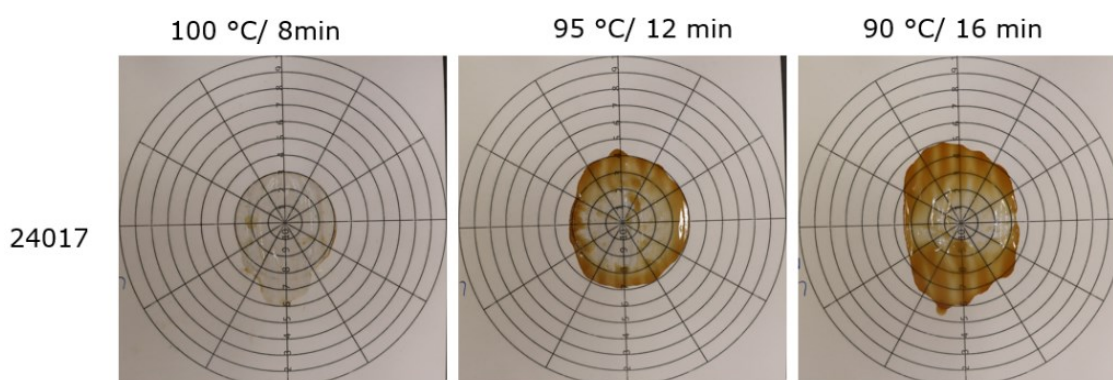


Figura 3.4 Fotografie sineresi lotto 24017 – Area coperte dalla macchia: 10%, 12.1%, 16,9%

3.2.5 pH

L'analisi statistica mostra un andamento direttamente proporzionale fra il pH e la temperatura, cioè all'aumento del primo aumenta anche la seconda.

Mentre, il tempo (come visibile in Tab. 3.1), non ha un'influenza significativa nei confronti del valore di pH. Il grafico RSM mostra che per temperature maggiori il valore di pH è più alto, rappresentato dai colori rosso e bianco sulla destra.

Il modello originato dall'analisi è il seguente:

$$\text{pH} = 0,007 \cdot \text{Tempo (min)} + 0,017 \cdot \text{Temperatura (}^{\circ}\text{C)} + 2,365$$

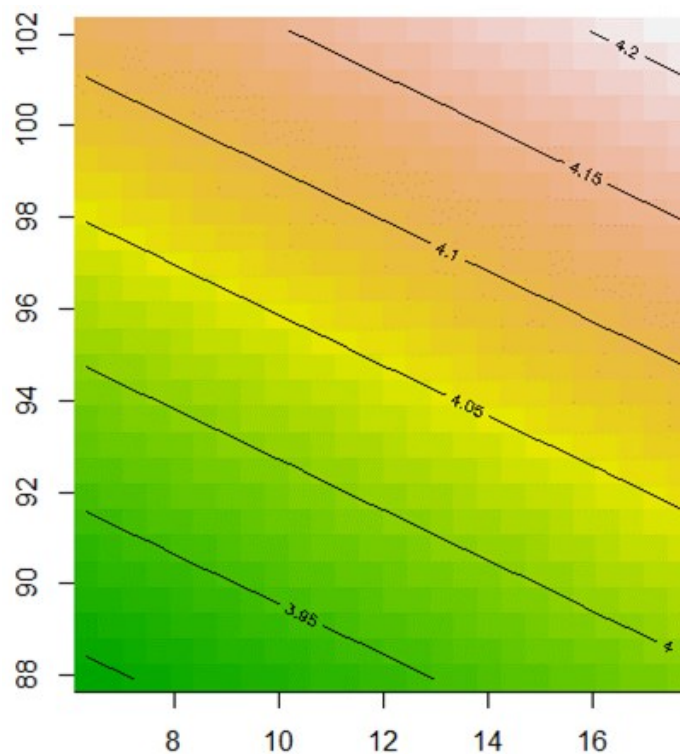


Figura 3.5 Analisi RSM – pH

3.2.6 Variabili con significative differenze fra i lotti

Le variabili influenzate dall'effetto lotto sono:

- Colore
- Solidi solubili
- Attività enzimatica residua

Per queste caratteristiche l'analisi delle varianze ha evidenziato delle differenze significative tra i lotti e, per questa ragione, verranno analizzate evidenziando le singole risposte per ogni lotto.

3.2.7 Colore

L'analisi statistica mostra un andamento indirettamente proporzionale fra la temperatura e la differenza di colore totale (TCD), cioè all'aumento della prima diminuisce la seconda. Il tempo, non ha un'influenza significativa nei confronti del Total Color Difference (TCD). Il grafico RSM mostra che per temperature maggiori il valore TCD è più basso, rappresentato dal colore verde, mentre per temperature più basse il dato è maggiore. Per visualizzare l'effetto descritto, si faccia riferimento alle fotografie sottostanti: la differenza di colore totale si riferisce alla sottrazione fra controllo, cioè quella porea che non ha subito il riscaldamento ed in cui le reazioni enzimatiche sono incontrollate, e la matrice trattata termicamente. L'obiettivo è ottenere il TCD maggiore possibile, dal

momento che questo indica una differenza di colore sostanziale dal marrone e, di conseguenza più vicina al giallo (come desiderato dal consumatore).

Alle temperature maggiori, come visibile dal Fig. 3.6, la differenza è minima e di conseguenza la purea ha un più colore simile al controllo, cioè, è imbrunita. Questo non deriva, però, da reazioni di natura enzimatica, ma chimica. Sono infatti le reazioni di Maillard – che avvengono ad alte temperature – a generare composti bruni, indesiderati dal punto di vista qualitativo.

Il modello originato dall'analisi è il seguente:

$$\text{TCD} = 0,125 \cdot \text{Tempo (min)} - 0,194 \cdot \text{Temperatura (°C)} + 28,468$$

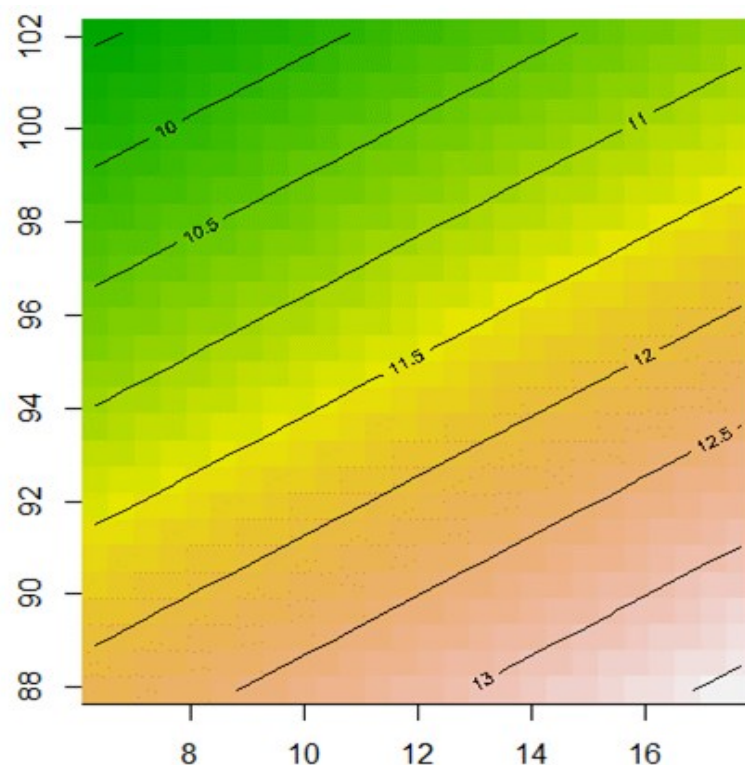


Figura 3.6 Analisi RSM – TCD

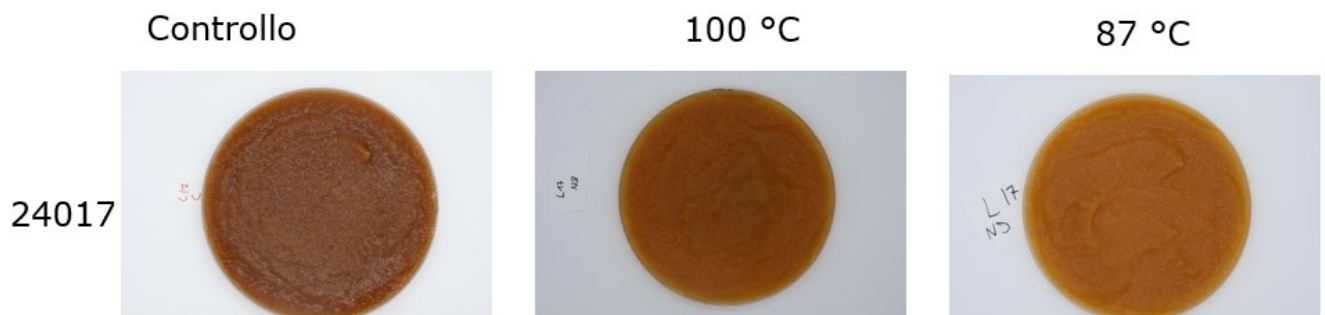


Figura 3.7 Fotografie piastre Petri lotto 24017

3.2.8 Solidi solubili

L'analisi ANOVA dei dati evidenzia delle differenze statisticamente significative fra i lotti, come precedentemente visto dalla Fig. 3.1. Questo non dipende, però, solamente da fattori di natura chimico-fisica ma anche da altre caratteristiche dei frutti, come ad esempio, il loro grado di maturazione, la zona di provenienza ed il sistema di conservazione. In generale, i solidi solubili diminuiscono all'aumentare della temperatura. Un possibile effetto può essere derivante dalle reazioni di Maillard che consumano gli zuccheri contenuti all'interno della purea e, di conseguenza, ne fanno diminuire il grado zuccherino. Per verificare l'ipotesi sostenuta, si è analizzata l'umidità dei campioni ed in particolare la differenza fra il controllo e le puree dopo il trattamento termico.

Si sono individuate delle differenze statisticamente significative tra i campioni (Fig. 3.1), ma l'umidità dei campioni è sempre minore rispetto al controllo. L'ipotesi generata è quindi che le puree si siano concentrate indipendentemente dalla temperatura e dal tempo, dimostrabile dal bassissimo coefficiente R^2 (Fig. 3.8 e 3.9) e, conseguentemente che le reazioni di Maillard siano avvenute sempre indipendentemente dal fattore umidità in tutti i lotti analizzati e che abbiano consumato zuccheri riducenti in maniera simile.

Questo comporta che le reazioni di natura chimica non siano la sola causa della variabilità dei solidi solubili ma, come precedentemente definito, esistano altre variabili non analizzate dal seguente studio.

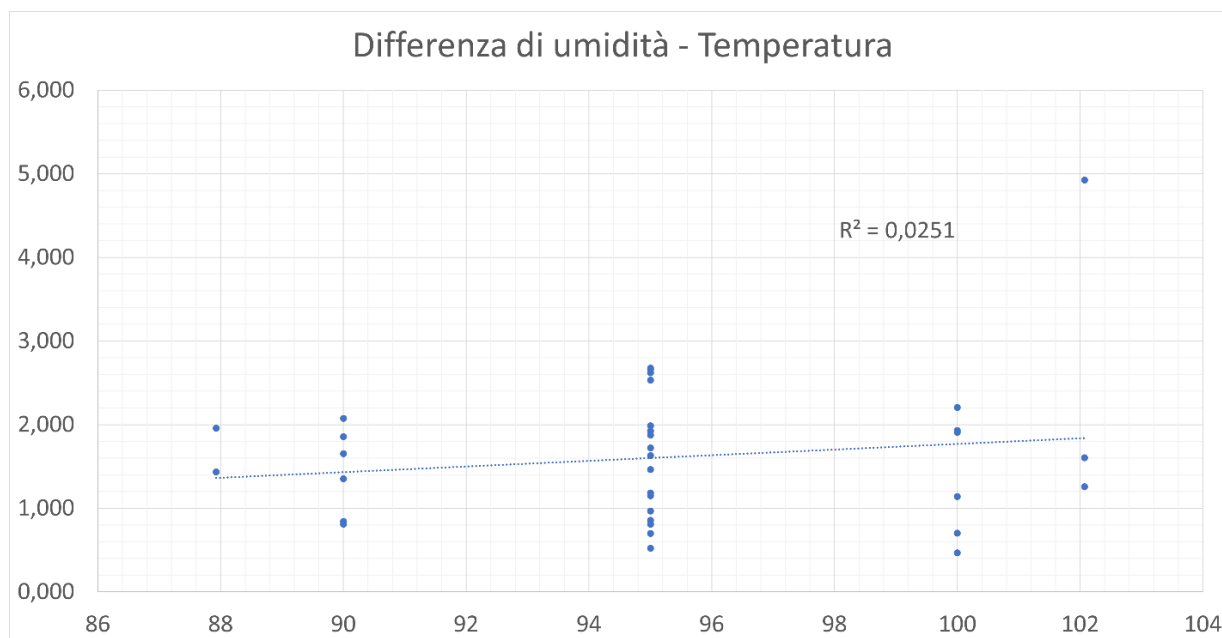


Figura 3.8 Retta di regressione – Differenza Umidità/Temperatura

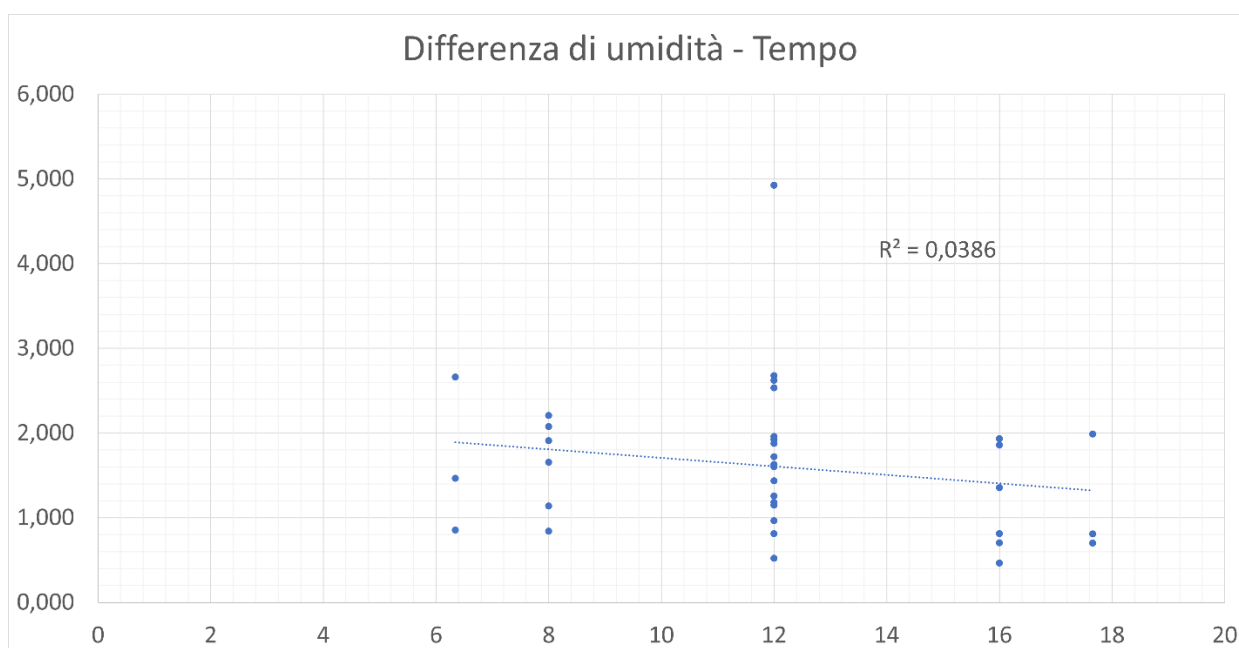


Figura 3.9 Retta di regressione – Differenza Umidità/Tempo

Nella tabella sottostante sono riportati, in forma riassunta, i dati dell'analisi RSM sui solidi solubili ed i modelli sono statisticamente significativi solamente nei lotti 24017 e 24019.

Tabella 3.2 Riassunto risultati analisi RSM – Solidi solubili - Lotti 24017/24018/24019

Lotto	Variabile	Lineare			Quadratico		p-Value	Lack of Fit
		Temperature	Tempo	Temp.*Tempo	Temperature	Tempo		
24017	Brix	**	NS	NS	*	NS	*	NS
24018	Brix						NS	NS
24019	Brix	**	NS	NS	NS	*	*	NS

Lotto 24017

L'analisi statistica per il lotto 24017 mostra un andamento indirettamente proporzionale fra la temperatura ed il contenuto di solidi solubili, cioè all'aumento della prima, i secondi diminuiscono.

Mentre, il tempo (come visibile in Tab. 3.2), non ha un'influenza significativa nei confronti del contenuto in zuccheri. Inoltre, la variabile si caratterizza per un comportamento quadratico rispetto alla temperatura, evidenziato dalla forma concava della curva RSM.

Il modello originato dall'analisi è il seguente:

$$\text{Brix} = 2,932 \cdot \text{Tempo (min)} + 6,562 \cdot \text{Temperatura (}^{\circ}\text{C)} - 0,03 \cdot \text{Tempo (min)} \cdot \text{Temperatura (}^{\circ}\text{C)} - 0,009 \cdot \text{Tempo}^2 \text{ (min}^2\text{)} - 0,034 \cdot \text{Temperatura}^2 \text{ (}^{\circ}\text{C}^2\text{)} - 302,55$$

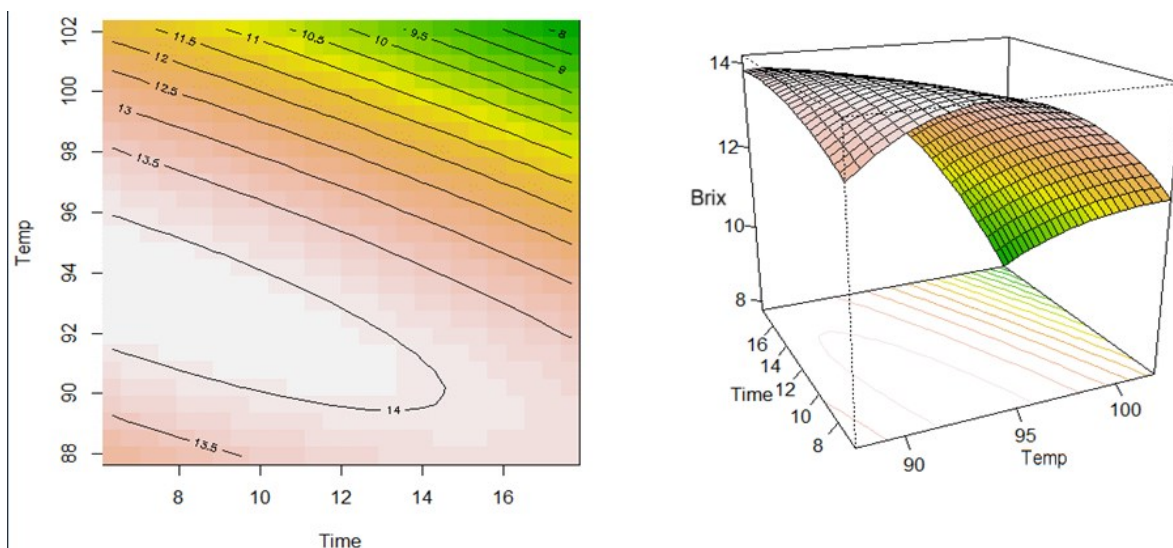


Figura 3.10 Analisi RSM – Solidi solubili – Lotto 24017

Lotto 24019

L'analisi statistica per il lotto 24019 mostra un andamento indirettamente proporzionale fra la temperatura ed i solidi solubili, cioè all'aumento della prima diminuiscono i secondi. Mentre, il tempo (come visibile in Tab. 3.2), ha un'influenza quadratica significativa nei confronti degli zuccheri come evidenziato dalla forma concava e parabolica della curva RSM, visibile nel grafico tridimensionale.

Il modello originato dall'analisi è il seguente:

$$\text{Brix} = 0,435 \cdot \text{Tempo (min)} - 1,034 \cdot \text{Temperatura (}^{\circ}\text{C)} - 0,001 \cdot \text{Tempo (min)} \cdot \text{Temperatura (}^{\circ}\text{C)} - 0,014 \cdot \text{Tempo}^2 \text{ (min}^2\text{)} + 0,006 \cdot \text{Temperatura}^2 \text{ (}^{\circ}\text{C}^2\text{)} + 59,469$$

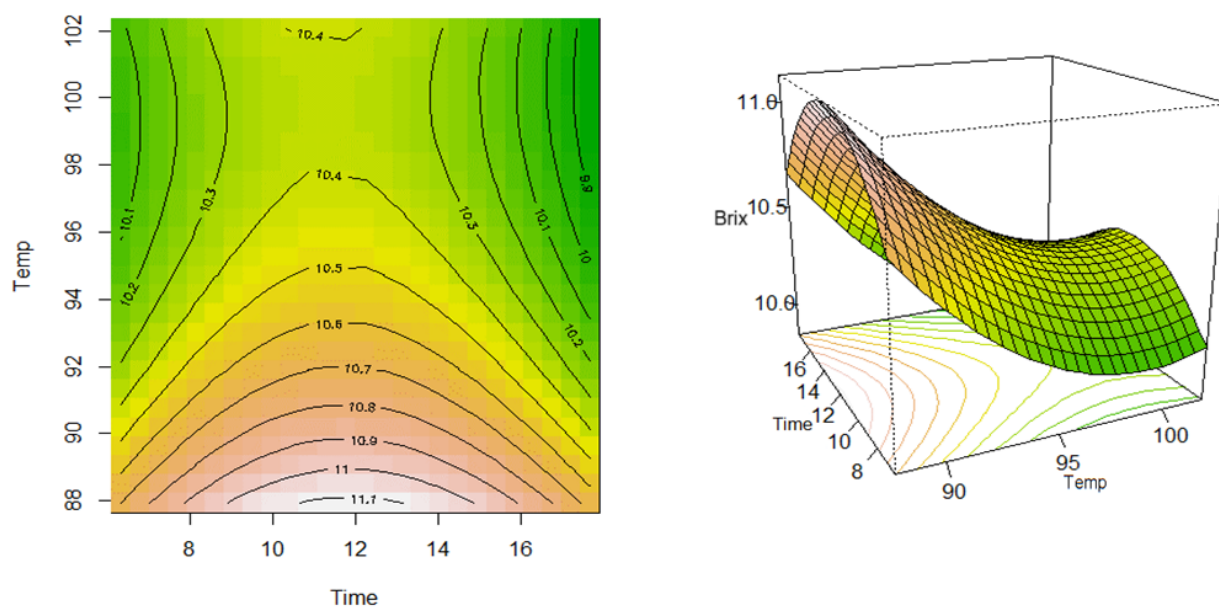


Figura 3.11 Analisi RSM – Solidi solubili – Lotto 24019

Infine, come precedentemente descritto, non si è evidenziata nella correlazione fra l'umidità delle puree ed il calo di umidità – ottenuto per sottrazione fra quella del controllo e quella del prodotto trattato termicamente – la causa della variazione sostanziale nel contenuto in solidi solubili; quindi, questa è da imputarsi anche ad altre caratteristiche del prodotto e della materia prima.

3.2.9 Attività enzimatica residua

Come descritto nel precedente paragrafo, anche per l'attività enzimatica residua sono state evidenziate dall'analisi ANOVA differenze statisticamente significative tra i lotti per i parametri di misura della polifenolossidasi e della pectinesterasi. Da sottolineare che l'enzima perossidasi non è mai stato rilevato all'interno dei tre lotti. La causa è da ricercarsi nella sua temperatura di inattivazione, minore della più bassa temperatura del trattamento termico utilizzata durante le sperimentazioni.

La tabella sottostante riassume i risultati delle singole analisi in RSM, valutate per ogni singolo lotto. Come si può notare, nel lotto 24017 non si sono rilevate attività enzimatiche residue, mentre nel 24018 e 24019 le polifenolossidasi e pectinesterasi hanno una permanenza da giustificare. Si procede quindi ora alla descrizione accurata per singolo lotto.

Tabella 3.3 Riassunto risultati analisi RSM – Attività enzimatica residua PE/PPO - Lotti 24017/24018/24019

Lotti	Variabile	Lineare			Quadratico		p-Value	Lack of Fit
		Temperature	Tempo	Temp.*Tempo	Temperature	Tempo		
24017	PE						NS	NS
24017	PPO						NS	NS
24018	PE	**	NS	NS	NS	NS	**	NS
24018	PPO	NS	NS	*	NS	NS	*	NS
24019	PE	NS	**	NS	NS	NS	*	NS
24019	PPO	*	**	NS	NS	NS	**	NS

Polifenolossidasi lotto 24018

L'analisi statistica mostra un andamento quadratico fra l'attività residua della polifenolossidasi e l'interazione fra temperatura e tempo.

Come si può notare dal grafico, i valori maggiori si hanno per bassi tempi ed alte temperature, oppure per lunghi tempi e basse temperature, sottolineando però che la migliore combinazione per l'inattivazione enzimatica è verificata operando ad alta

temperatura e per lunghi tempi. In questo caso la correlazione è solamente quadratica, data dalla specifica interazione tempo-temperatura.

I valori di attività risultano essere comunque molto bassi compresi, con la maggioranza dei dati che si avvicinano al valore nullo.

Il modello originato è il seguente:

$$\text{PPO} = 0,010 \cdot \text{Tempo (min)} + 0,001 \cdot \text{Temperatura (}^{\circ}\text{C)} - 0,0001 \cdot \text{Tempo (min)} \cdot \text{Temperatura (}^{\circ}\text{C)} - 0,011$$

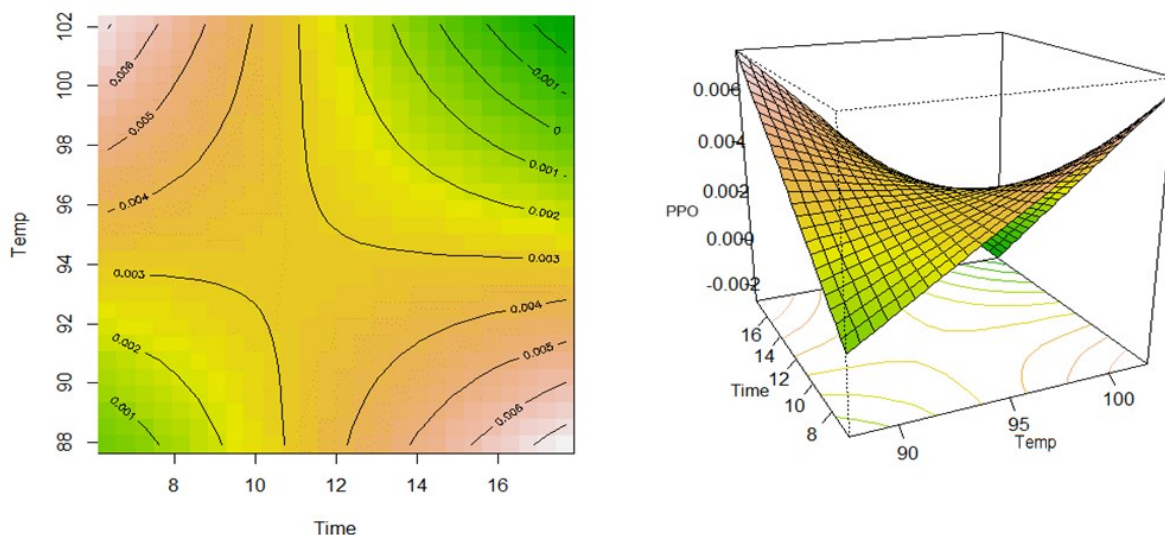


Figura 3.12 Analisi RSM – Attività residua PPO – Lotto 24018

Polifenolossidasi lotto 24019

L'analisi statistica mostra un andamento indirettamente proporzionale fra la temperatura e l'attività residua della polifenolossidasi, cioè all'aumento della prima diminuisce la seconda. Anche il tempo ha un'influenza significativa nei confronti dell'attività residua, in maniera sempre indirettamente proporzionale.

Il grafico RSM mostra che per temperature maggiori e tempi più lunghi l'attività enzimatica è minima, senza però mai annullarsi, mentre i valori massimi si ottengono a basse temperature e per tempi di trattamento più brevi, considerando sempre che i valori si avvicinano molto allo 0.

Inoltre, alle temperature maggiori gli enzimi perdono parte della loro capacità di catalizzare le reazioni di imbrunimento enzimatico perché subiscono sostanziali danni alla loro struttura. Di conseguenza, anche se presenti, hanno comunque una ridotta attività a causa del trattamento termico subito.

Il modello originato dall'analisi è il seguente:

$$\text{PPO} = -0,00015 \cdot \text{Tempo (min)} - 0,000099 \cdot \text{Temperatura (}^{\circ}\text{C)} + 0,012703$$

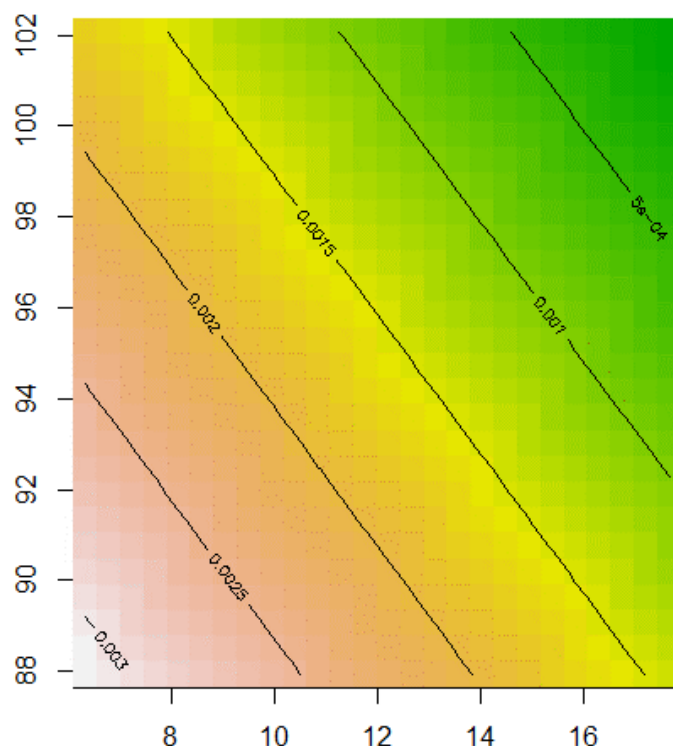


Figura 3.13 Analisi RSM Attività residua PPO – Lotto 24019

Pectinesterasi lotto 24018

L'analisi statistica mostra un andamento indirettamente proporzionale fra la temperatura e l'attività residua della pectinesterasi, cioè all'aumento della prima diminuisce anche la seconda. Mentre il tempo non ha un'influenza statisticamente significativa rispetto all'attività enzimatica residua.

Il grafico RSM mostra che per temperature maggiori e tempi più lunghi l'attività enzimatica è minima, fino a raggiungere lo 0, mentre i valori massimi si ottengono a basse temperature e per tempi di trattamento più brevi.

Il modello originato dall'analisi è il seguente:

$$PE = -0,041 \cdot \text{Tempo (min)} - 0,094 \cdot \text{Temperatura (}^{\circ}\text{C)} + 10,266$$

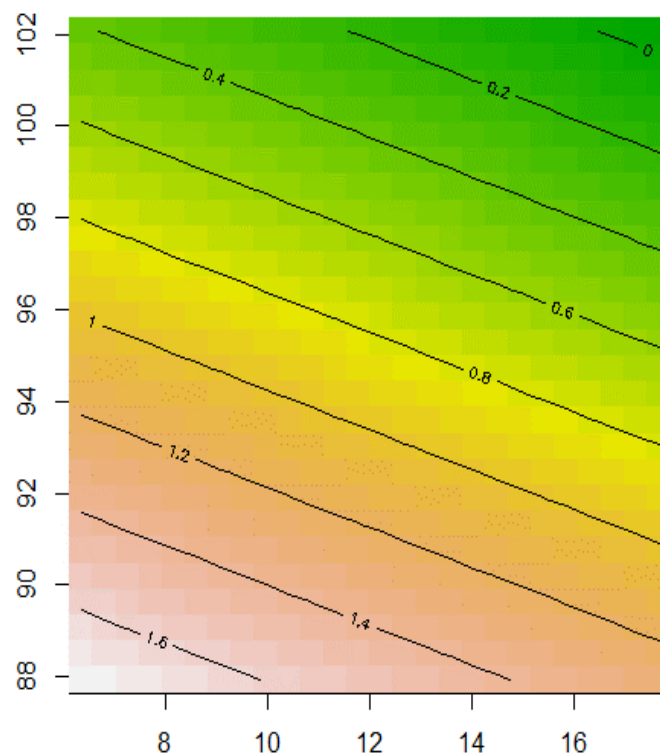


Figura 3.14 Analisi RSM Attività residua PE – Lotto 24018

Pectinesterasi lotto 24019

L'analisi statistica mostra un andamento direttamente proporzionale fra l'attività residua della pectinesterasi ed il tempo; quindi, maggiore è il tempo di trattamento, maggiore è l'attività enzimatica residua. Mentre la temperatura non ha un'influenza statisticamente significativa rispetto all'attività enzimatica residua. Il grafico della retta di regressione descrive questo fenomeno.

Il grafico RSM mostra che le attività enzimatiche residue minori si ottengono ai più bassi tempi di trattamento, e viceversa. Importante considerare sempre che, anche se presenti, gli enzimi hanno una capacità di azione ridotta dal momento che le alte temperature di trattamento danneggiano le loro strutture, quasi annullando la loro attività.

Il modello originato dall'analisi è il seguente:

$$PE = 0,056 \cdot \text{Tempo (min)} - 0,0005 \cdot \text{Temperatura (}^{\circ}\text{C)} + 0,441$$

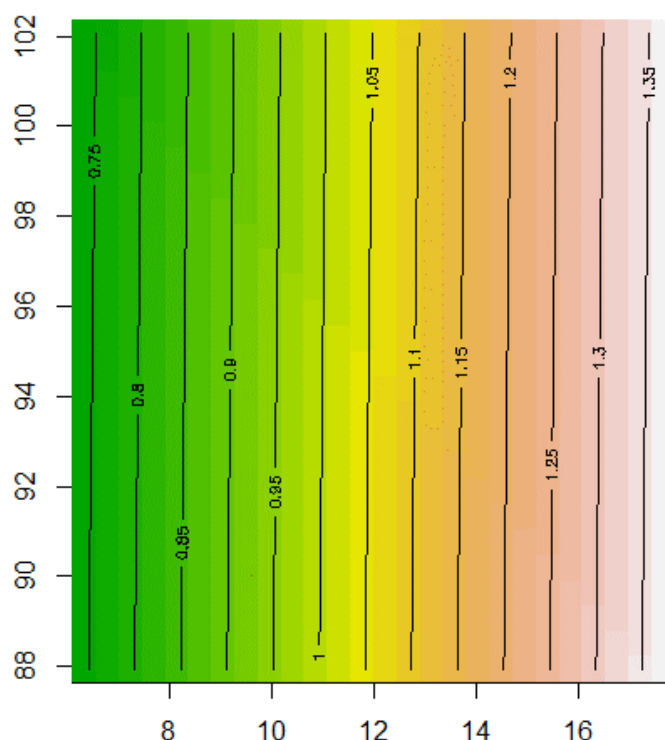


Figura 3.15 Analisi RSM - Attività residua PE – Lotto 24018

3.3 Discussione

Visualizzando i dati nel loro insieme si possono trarre delle importanti conclusioni:

- La temperatura di trattamento svolge un ruolo predominante rispetto al tempo, descritto dai vari modelli RSM presentati nel precedente paragrafo. Il tempo assume un'importanza significativa solo per la sineresi – in maniera indirettamente proporzionale – e per l'attività enzimatica residua della polifenolossidasi e della pectinesterasi;
- Il fattore “lotto di mele” assume una significatività per la risposta nel contenuto in solidi solubili, la differenza di colore totale e l'attività enzimatica residuale nelle puree trattate termicamente. Come descritto nel precedente paragrafo, questo fenomeno non è assimilabile solamente alle caratteristiche fisico-chimiche della purea, ma anche ad altri fattori, tra cui quelli riguardanti la fisiologia del frutto, soprattutto per quanto concerne il suo grado di maturazione;
- Importante sottolineare che l'attività enzimatica residua delle perossidasi non è mai stata rilevata in maniera consistente. Questo potrebbe imputarsi alla temperatura di inattivazione di questo specifico enzima, che diminuisce fortemente la sua attività ad una temperatura superiore a 60 °C (Li et al., 2018).

Come descritto nel paragrafo 1.3, i risultati ottenuti sono – in gran parte – paragonabili a (Guerra et al., 2012). La purea dopo il termico ha una consistenza simile all'interno dei

tre lotti, ma il trattamento effettuato porta – inevitabilmente – ad una disgregazione del tessuto ed una solubilizzazione delle pectine. Questo, come descritto dai modelli RSM, ha però una significativa variabilità, data anche da fattori non direttamente legati alla natura della trasformazione.

Anche per quanto riguarda il colore i dati ottenuti sono coerenti con il lavoro di riferimento, in quanto la Total Color Difference è sempre superiore a 2,5 quindi la differenza di colore fra il controllo (dove gli enzimi hanno imbrunito la purea) ed il campione trattato termicamente è sempre riscontrabile dall'occhio umano. Infatti, come visibile nella figura 4.6, il colore varia in base alla temperatura di trattamento ed i valori di TCD hanno un range da 10 a 13. Questo impatto sulla matrice è determinato dall'apporto di calore alla purea, in cui le reazioni di Maillard (incrementate dall'alta temperatura) formano i Maillard Reaction Products (MRP) (Sun et al., 2022). Questo insieme chimico è composto da molecole aromatiche (ad esempio chetoni ed aldeidi) ma soprattutto cromatiche, di cui la principale categoria è caratterizzata dalle melanoidine, responsabili del colore marrone. Le differenze sostanziali con (Guerra et al., 2012) si hanno per quanto riguarda l'attività enzimatica residua, che si attendeva nulla dal punto di vista teorico. Nel lavoro di riferimento PPO e PO risultano totalmente inattivate, mentre dagli esperimenti svolti si rileva attività residuale della polifenolossidasi. Inoltre, questa è influenzata dall'effetto lotto di mele.

La natura di questo fenomeno è difficilmente rilevabile dai modelli descritti nel precedente paragrafo, dal momento che le interazioni fra tempo e temperatura sono diverse nei lotti 24018 e 24019. Come nel caso dei solidi solubili, l'attività enzimatica residua della polifenolossidasi non è solamente causa diretta del trattamento termico e delle condizioni di lavoro in cui questo è stato effettuato, ma potrebbe essere causa di altri fattori non studiati durante il lavoro di tesi. Infatti, potrebbe essere legata a fattori fisiologici del frutto, come il suo grado di maturazione, o ad altri fenomeni.

Dal momento che, come descritto nel paragrafo 1.1, le materie prime di MelindaLab arrivano da varie sale di lavorazione sparse su tutto il territorio della Val di Non, risulta estremamente complesso (se non impossibile) definire l'origine esatta del frutto. Questo stesso fenomeno è stato visto anche negli esperimenti da noi svolti.

Infatti, il lavoro di riferimento (Guerra et al., 2012), utilizza come materie prime per la produzione di puree, mele di varietà Golden acquistate presso un supermercato che – per la natura organizzativa dello stesso – potrebbero aver avuto un grado di maturazione

elevato ed omogeneo, mentre nel caso del lavoro di tesi in analisi i frutti utilizzati avevano differenti gradi di maturazione, per avvicinarsi alla realtà produttiva di MelindaLab.

Questo fenomeno potrebbe – in parte – spiegare le differenze, in particolare nel contenuto in solidi solubili ed attività enzimatica residua, fra il lavoro presentato ed (Guerra et al., 2012).

Per risolvere la problematica legata all'effetto lotto, potrebbe essere utile – oltre ad ulteriori studi per approfondire il legame fra lo stato fisiologico del frutto e le sue caratteristiche – anche un sistema di valutazione del grado di maturazione dei frutti all'ingresso della linea produttiva. In questo modo si potrebbero variare le condizioni di trattamento della purea a seconda delle caratteristiche dei frutti freschi, lavorando così sempre alla massima efficienza tecnica dell'impianto ed ottenendo costantemente un prodotto con ottime caratteristiche visive, organolettiche e nutrizionali.

Il controllo dello stato fisiologico del frutto potrebbe essere effettuato da una selezionatrice ottica che, in base al colore dei frutti ne determinerebbe il loro grado di maturazione, ed eventualmente – tramite un software di Intelligenza Artificiale – regolare automaticamente i parametri del trattamento termico.

I successi sperimentali ottenuti durante tutte le fasi del progetto si sono accompagnati a più difficili situazioni, dal momento che – in particolare per le temperature di trattamento più elevate – il raggiungimento di questo target è stato complesso, anche per la natura stessa del macchinario utilizzato e questo ha portato ad uno stress termico della purea, che potrebbe aver influenzato i dati ottenuti. L'aspetto appena evidenziato però non ha generato un errore tale da invalidare le sperimentazioni, visto che i test statistici determinano una stima dell'errore sempre non significativa.

Capitolo 4

CONCLUSIONI

La collaborazione con MelindaLab si è sviluppata, attraverso questo progetto, con l'obiettivo di migliorare il processo di trattamento termico che le puree di mela subiscono per inattivare gli enzimi causa di imbrunimento e, conseguentemente, migliorare la qualità dei prodotti offerti ai consumatori.

Come precedentemente descritto, i risultati ottenuti hanno una significativa base statistica (visibile dai modelli RSM) e ricalcano quelli dei lavori scientifici presi come riferimento. Il disegno sperimentale, le metodiche laboratoriali adottate e la rielaborazione statistica hanno fornito degli elementi utili a rispondere alle domande inizialmente poste.

Da sottolineare l'aspetto più innovativo di questo progetto: l'ottenimento dei dati sulla sineresi delle puree di mela è stato sviluppato a partire dalle metodiche utilizzate nel settore lattiero-caseario (Arango et al., 2013), riadattate appositamente alla natura di questo prodotto. Inoltre, l'utilizzo di software all'avanguardia – in particolare per la segmentazione semantica tramite l'utilizzo di Intelligenza Artificiale – ha permesso di ottenere dati statisticamente significativi risparmiando molte risorse umane e materiali.

D'altro canto, però, come precedentemente descritto, nello studio presentato la variabilità delle materie prime utilizzate potrebbe aver determinato delle differenze significative tra i dati ottenuti, sottolineate nei precedenti paragrafi. Sarebbe quindi necessario verificare l'eventuale relazione fra lo stato fisiologico del frutto, l'attività enzimatica residua e il contenuto in solidi solubili tramite ulteriori approfondimenti per determinare l'eventuale interdipendenza fra queste variabili, anche mediante altri studi con la stessa natura di questo progetto.

Prendendo in considerazione una visione generale del lavoro, gli effetti evidenziati dal caso studio preso in analisi evidenziano alcuni aspetti tecnologici fondamentali della purea di mela:

- L'attività enzimatica risulta quasi sempre vicina allo zero, con l'azione delle pectinesterasi che (pur avendo una residualità) diminuisce nettamente all'aumento della temperatura di trattamento termico. Questo risultato è ciò che MelindaLab si attende per garantire un prodotto stabile durante tutta la shelf-life;

- Allo stesso momento, però, il riscaldamento della purea ad elevate temperature imbrunisce la matrice per via chimica, principalmente perché il principale catalizzatore delle reazioni di Maillard è la temperatura elevata. Questo aspetto qualitativo non è apprezzato dal consumatore e, perciò, va evitato il più possibile nel prodotto finito;
- Inoltre, come precedentemente descritto, viscosità e sineresi sono influenzate dall'elevato riscaldamento della matrice che comporta una riduzione di entrambe con la produzione di un prodotto più corposo ed asciutto, caratteristica apprezzata dai clienti finali.

Quindi, dal punto di vista della qualità organolettica, il consumatore preferisce un prodotto poco imbrunito, con alta consistenza e senza la separazione fra la fase solida e quella liquida. Questa combinazione, però, non è facilmente realizzabile dal momento che, come descritto, a temperature maggiori sono minori attività enzimatica residua, viscosità e sineresi ma aumenta l'imbrunimento causa delle reazioni di Maillard.

La soluzione al problema presentato trova una risposta nella scelta di una combinazione tempo-temperatura che riesca ad equilibrare tutte le caratteristiche desiderate. L'applicazione del trattamento termico ad una temperatura di 95 °C per un tempo di 12 minuti garantirebbe una riduzione significativa dell'attività enzimatica, dei valori medio-alti di viscosità ed una ridotta sineresi, non molto distante dal valore minimo ottenuto durante le sperimentazioni ed una differenza di colore totale significativa. Per migliorare in modo ancor più significativo la qualità del prodotto finito potrebbero essere di fondamentale importanza anche ulteriori modifiche impiantistiche, che garantirebbero un trattamento più delicato nei confronti della matrice. Le possibilità tecnologiche sono molte, sia termiche (come il riscaldamento ohmico o ad iniezione di vapore diretto) che non (come l'implementazione delle alte pressioni idrostatiche), con l'obiettivo di mantenere le caratteristiche visive (principalmente del colore giallo), organolettiche (per quel che riguarda la texture, influenzata da viscosità e sineresi) e nutrizionali (per la salvaguardia dei composti termosensibili), dei frutti freschi da cui si originano i prodotti trasformati.

In conclusione, la collaborazione fra l'Università degli Studi di Padova e MelindaLab ha permesso di sviluppare un progetto che ha fornito i risultati prefissati. Anche grazie alle risorse introdotte dall'azienda, l'ateneo ha fornito a quest'ultima dati e idee sul proprio sviluppo aziendale, garantendo agli studenti un'ambiente di lavoro dinamico ed in cui applicarsi su reali tematiche tecnologiche.

BIBLIOGRAFIA

Documenti scientifici

- Arango, O., Trujillo, A. J., Castillo, M. (2013). Influence of fat replacement by inulin on rheological properties, kinetics of rennet milk coagulation, and syneresis of milk gels. *Journal of Dairy Science*, 96(4), 1984–1996.
- Buergy, A., Rolland-Sabaté, A., Leca, A., Renard, C. M. G. C. (2020). Pectin modifications in raw fruits alter texture of plant cell dispersions. *Food Hydrocolloids*, 107, 105962.
- Buergy, A., Rolland-Sabaté, A., Leca, A., Renard, C. M. G. C. (2021). Apple puree's texture is independent from fruit firmness. *LWT*, 145, 111324.
- Delli Compagni, R., Turolla, A., Domínguez Henao, L., Antonelli, M. (2016). Applicazione di tecniche statistiche avanzate (design of experiments) allo studio di processi di trattamento delle acque. *Ingegneria dell'Ambiente*, 3(3).
- Furumo, N. C., Furutani, S. (2008). A simple method for assaying total protein, polyphenol oxidase and peroxidase activity from 'Kaimana' Litchi chinensis Sonn. *J. Hawaii. Pac. Agric*, 15, 1–7.
- Gacche, R. N., Shete, A. M., Dhole, N. A., Ghole, V. S. (2006). Reversible inhibition of polyphenol oxidase from apple using L-cysteine. *Indian J. Chem. Technol.*
- Guerra, L., Romagnoli, G., Vignali, G. (2012). Extraction of Golden Delicious apple puree: Experimental comparison of three different methods. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 169–174.
- Kim, A.-N., Lee, K.-Y., Rahman, M. S., Kim, H.-J., Kerr, W. L., Choi, S.-G. (2021). Thermal treatment of apple puree under oxygen-free condition: Effect on phenolic compounds, ascorbic acid, antioxidant activities, color, and enzyme activities. *Food Bioscience*, 39, 100802.
- Li, L., Wu, M., Wang, R., Guo, M., Liu, T. (2018). Peroxidase properties of fresh-cut potato browning. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 397, 012115.
- Ly, B. C. K., Dyer, E. B., Feig, J. L., Chien, A. L., Del Bino, S. (2020). Research Techniques Made Simple: Cutaneous Colorimetry: A Reliable Technique for Objective Skin Color Measurement. *Journal of Investigative Dermatology*, 140(1).
- Morales-de La Peña, M., Welti-Chanes, J., Martín-Belloso, O. (2019). Novel technologies to improve food safety and quality. *Current Opinion in Food Science*, 30, 1–7.

- Salas-Tovar, J. A., Flores-Gallegos, A. C., Contreras-Esquivel, J. C., Escobedo-García, S., Morlett-Chávez, J. A., Rodríguez-Herrera, R. (2017). Analytical Methods for Pectin Methylesterase Activity Determination: a Review. *Food Analytical Methods*, 10(11), 3634–3646.
- Sun, A., Wu, W., Soladoye, O. P., Aluko, R. E., Bak, K. H., Fu, Y., Zhang, Y. (2022). Maillard reaction of food-derived peptides as a potential route to generate meat flavor compounds: A review. *Food Research International*, 151, 110823.
- Vareltzis, P., Adamopoulos, K., Stavrakakis, E., Stefanakis, A., Goula, A. M. (2016). Approaches to minimise yoghurt syneresis in simulated tzatziki sauce preparation. *International Journal of Dairy Technology*, 69(2), 191–199.
- Vrhovsek, U., Rigo, A., Tonon, D., Mattivi, F. (2004). Quantitation of Polyphenols in Different Apple Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21), 6532–6538.

Siti web

- <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2012/12/oj> (Agosto, 2024)
- <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2014/03/10/14G00032/sg> (Agosto, 2024)
- <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2011/1129/oj> (Agosto, 2024)
- <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3A32023R0915> (Agosto, 2024)
- https://www.princeton.edu/~gasdyn/Research/T-C_Research_Folder/Viscosity_def.html (Aprile, 2024)
- <https://it.wikipedia.org/wiki/Brix> (Marzo, 2024)
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9781845694951500113> (Aprile, 2024)
- <https://www.britannica.com/science/pH> (Britannica, T. Editors of Encyclopaedia) (Marzo, 2024)
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780080918099000133> (Giugno, 2024)
- https://en.wikipedia.org/wiki/Response_surface_methodology (Agosto, 2024)