

***Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna**  
**Dottorato in Scienze e Tecnologie Agrarie,  
Ambientali e Alimentari**

# **GIORNATA DEL DOTTORATO 2019**

## **Tematica di ricerca: "Scienze e Biotecnologie degli Alimenti"**

12 Aprile 2019  
Villa Almerici, Cesena



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

PHD PROGRAMME  
AGRICULTURAL, ENVIRONMENTAL AND FOOD SCIENCE AND  
TECHNOLOGY

## INDICE

### DOTTORANDI ISCRITTI AL I ANNO (XXXIV CICLO)

**Ana Cristina de Aguiar Saldanha Pinheiro**, *“Ottimizzazione di trattamenti emergenti per la valorizzazione dei prodotti e sottoprodotti del settore ittico”*

**Jessica Genovese**, *“Utilizzo dei campi elettrici pulsati (PEF) per la modulazione delle caratteristiche chimico-fisiche e reologiche di differenti prodotti alimentari”*

**Yan Li**, *“Metabolomics investigation of edible organisms in anticipation of improving their meat quality”*

**Dario Mercatante**, *“Valorizzazione di sottoprodotti e scarti dell’industria agro-alimentare e loro utilizzo nella formulazione di alimenti innovativi”*

**Chiara Oliveri**, *“Analisi del microbioma e del resistoma di alimenti di origine animale provenienti da allevamenti intensivi tradizionali ed antibiotic-free”*

**Simin Sabaghian**, *“In field application of biocontrol agents to improve the safety and quality of grapevine products”*

**Maria Alessia Schouten**, *“Strategie innovative per la mitigazione del contenuto di acrilammide e altre sostanze tossiche in diverse matrici alimentari”*

**Matilde Tura**, *“Metodiche di analisi di derivati della Cannabis ad uso alimentare, fitoterapico, farmaceutico ed industriale: messa a punto e validazione di metodi per il controllo di qualità e sviluppo di tecniche estrattive e preparative di derivati, secondo destinazione merceologica”*

### DOTTORANDI ISCRITTI AL II ANNO (XXXIII CICLO)

**Jaime Arboleda Mejia**, *“Recovery of bioactive compounds from the wine lees by membrane technology, and their application in wine industry”*

**Enrico Casadei**, *“Approcci strumentali analitici e strategie per supportare la valutazione sensoriale degli oli vergini di oliva”*

**Jelena Jeremic**, *“Study of the Chianti and Chianti Classico appellations: Evaluation of enological potential of Sangiovese and complementary varieties by a multiparametric approach”*

### DOTTORANDI ISCRITTI AL III ANNO (XXXII CICLO)

**Giulia Baldi**, *“Metabolismo post mortem dei muscoli e anomalie delle carni negli avicoli”*

**Michael Magnani**, *“Condizioni di stress e metabolismo del Lactobacillus sakei: impatto sulle caratteristiche dei prodotti fermentati”*

**Rosa Palagano**, *“Soluzioni avanzate per la qualità e la genuinità degli oli d’oliva”*

**Cheng-Lin Zhu**, *“<sup>1</sup>H-NMR spectroscopy to investigate the connection between food characteristics and health”*



**DOTTORANDI ISCRITTI AL I ANNO**  
**(XXXIV CICLO)**



## Ottimizzazione di trattamenti emergenti per la valorizzazione dei prodotti e sottoprodotti del settore ittico

Ana Cristina de Aguiar Saldanha Pinheiro (email: anacristin.deaguiar2@unibo.it)  
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna  
Corso di Dottorato: Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari  
Tematica: Scienze e Biotecnologie degli Alimenti; Ciclo di dottorato: XXXIV; Anno di frequenza: I  
Tutor: Pietro Rocculi; Co-tutor: Silvia Tappi

### 1. Curriculum

#### Titoli di studio

Dal Novembre 2018 ha iniziato il corso di dottorato di ricerca in Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari presso la Facoltà di Agraria dell'Università di Bologna, Dipartimento di Scienze degli Alimenti

Aprile 2015: Titolo di Dottore di ricerca in Scienze Veterinarie (XXVII ciclo). Titolo della tesi: “Sviluppo di metodiche innovative per la diagnosi e lo studio di malattie ad eziologia virale dei pesci” presso Alma Mater Studiorum, Università di Bologna.

Novembre 2006: Master di secondo livello in Risorse della Pesca e Acquacoltura presso Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasile.

Giugno 2002: Laurea Vecchio Ordinamento in Ingegneria della pesca, presso Universidade Federal do Ceará (UFC), Brasile.

Autrice di 7 articoli pubblicati in riviste a carattere scientifico nazionali ed internazionali.

### 2. Stato dell'arte

Il consumo e la popolarità dei prodotti ittici sono aumentati costantemente negli ultimi anni dato che sono sempre più riconosciuti come importanti fonti di nutrienti per la salute umana (Alasalvar e Taylor, 2002). Il pesce fresco è un prodotto altamente deperibile a causa della sua composizione biologica. Per i prodotti alimentari altamente deperibili, l'uso di tecniche di conservazione convenzionali può a volte risultare limitato, in quanto spesso comportano cambiamenti di colore, consistenza e sapore del cibo o persino una riduzione del contenuto di composti bioattivi (Crozier, Lean, McDonald, & Black, 1997).

La lavorazione dei prodotti ittici genera dei flussi relativamente consistenti di sottoprodotti. I sottoprodotti contengono composti preziosi come peptidi, proteine, pigmenti naturali, collagene, acidi grassi e biopolimeri. L'ottimizzazione di nuove tecnologie di separazione, estrazione, conversione, stabilizzazione ed essiccazione affiancate a trattamenti innovativi potrebbe essere una alternativa efficace per elevare gli standard di qualità degli ingredienti e per la sostenibilità dei processi sia a livello economico che ambientale.

Lo sviluppo di tecnologie emergenti nella trasformazione degli alimenti può contribuire in modo significativo a soddisfare le esigenze dei consumatori verso alimenti sicuri, salutari e minimamente trasformati. Inoltre, queste tecnologie innovative possono portare a tecniche di produzione alimentare più sostenibile e rispettose dell'ambiente e alla valorizzazione dei sottoprodotti (Toepfl et al. 2006).

Il trattamento con campi elettrici pulsati (PEF) si basa sull'applicazione di un campo elettrico pulsato ad elevata intensità per pochi mille secondi ad un alimento posto tra due elettrodi. Il trattamento con PEF ha il potenziale di aumentare le cinetiche di trasferimento di massa, incluso l'assorbimento dell'acqua e le proprietà di ritenzione idrica, che lo rende una interessante tecnologia nel settore della lavorazione del pesce. Inoltre, nell'industria ittica, il trattamento PEF potrebbe essere usato sia per disidratare sottoprodotti sia per l'estrazione di alcuni composti di elevato valore come enzimi, olio di pesce o preziosi metaboliti (Skipenes e Rones, 2017).

Gli ultrasuoni (US) sono onde sonore di frequenza comprese tra 20 e 10kHz che possono essere propagate attraverso solidi, liquidi e gas. I fenomeni di base, come *microstreaming*, cavitazione e le conseguenti forze di taglio idrodinamiche, rendono gli US una tecnologia alternativa per la realizzazione di omogeneizzazione, dispersione ed emulsificazione, e per la disintegrazione del tessuto al fine di migliorare i processi di trasferimento di massa (Mason et al., 1996).

Il gas plasma a freddo (CAP) è un gas ionizzato caratterizzato da particelle attive come elettroni, ioni, radicali liberi e atomi presenti in entrambi gli stati, fondamentale ed eccitato, caratterizzato da un elevato potere ossidativo. Applicazioni note del gas plasma riguardano l'area sanitaria, per la sanificazione di strumenti medici sensibili al calore o per migliorare le caratteristiche e la compatibilità di differenti polimeri (Baier et al., 1992). Tuttavia, nell'ultima decade l'utilizzo del CAP è stato valutato come una promettente alternativa per la sanificazione a freddo di prodotti agricoli ed alimentari. Tali tecnologie (PEF, US e CAP) sono state applicate con successo a varie tipologie di prodotti alimentari, tuttavia, sono pochi o assenti gli studi applicati ai prodotti e sottoprodotti ittici.

### 3. Obiettivi e risultati attesi

Il presente progetto di ricerca si propone di valutare in maniera qualitativa e quantitativa gli effetti di trattamenti emergenti come i campi elettrici pulsati (PEF), gli ultrasuoni (US) e il gas plasma atmosferico a freddo (CAP) applicati ai processi di trasformazione di prodotti e sottoprodotti ittici. L'obiettivo generale consiste nella sperimentazione e ottimizzazione, su scala di laboratorio, di tecnologie emergenti non-termiche in grado di prolungare la *shelf-life* e di preservare quanto più possibile le caratteristiche qualitative e nutrizionali delle materie prime. Inoltre sarà oggetto di studio la possibilità di ottimizzare i processi di pretrattamento dei sottoprodotti con le tecnologie emergenti per l'ottenimento di sostanze bioattive e funzionali.

Il progetto di ricerca sarà suddiviso nelle seguenti attività, riepilogate nel diagramma di Gantt riportato in Tabella 1.

A1) Ricerca bibliografica sui trattamenti emergenti non termici attualmente disponibili e strumenti per la loro valutazione.

A2) Messa a punto dei processi emergenti su scala pilota per l'ottenimento di prodotti ittici innovativi di alta qualità.

A3) Studi di *shelf-life* dei prodotti ittici ottenuti, in base alla valutazione dell'effetto dei trattamenti sulle caratteristiche fisiche, chimiche e microbiologiche e organolettiche dei diversi prodotti ittici.

A4) Messa a punto dei processi emergenti su scala pilota per l'ottenimento di biocomposti/ingredienti funzionali da sottoprodotti.

A5) Caratterizzazione dei biocomposti/ingredienti funzionali ottenuti dai sottoprodotti.

A6) Preparazione e pubblicazione della tesi, poster, articoli scientifici e presentazioni orali.

**Tabella 1. Diagramma di Gantt delle attività previste**

Attività	Mese	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	
A1) Ricerca bibliografica		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A2) Messa a punto dei processi emergenti su scala pilota per l'ottenimento di prodotti ittici innovativi di elevata qualità			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A3) Studi di <i>shelf-life</i> dei prodotti ottenuti																				
A4) Messa a punto dei processi emergenti su scala pilota per l'ottenimento di biocomposti/ingredienti funzionali da sottoprodotti																				
A5) Caratterizzazione dei biocomposti/ingredienti funzionali ottenuti																				
A6) Partecipazione a congressi, preparazione di articoli scientifici e tesi																				

### 4. Bibliografia

- Alasalvar C (2002) Seafoods: Quality, Technology and Nutraceutical Applications - an Overview. In: Alasalvar C, Taylor T (eds) Seafoods - Quality, Technology and Nutraceutical Applications, 1-5. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Crozier A, Lean EJ, McDonald MS, Black C (1997) Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and sellery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 590 e 595.
- Mason TJ, Paniwnyk L, Lorimer JP (1996) The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics sonochemistry*, 3(3), S253-S260.
- Skipnes D, Rosnes JT (2017) Minimal Heat Processing Applied in Fish Processing. In *Trends in Fish Processing Technologies* (pp. 27-70). CRC Press.
- Toepfl S, Mathys A, Heinz V, Knorr D. 2006. Review: potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally friendly food processing. *Food Rev. Int.* 22:405–23.

## Utilizzo dei campi elettrici pulsati (PEF) per la modulazione delle caratteristiche chimico-fisiche e reologiche di differenti prodotti alimentari

Jessica Genovese (email: jessica.genovese3@unibo.it)

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

Corso di Dottorato: Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari

Tematica: Scienze e Biotecnologie degli Alimenti; Ciclo di dottorato: XXXIV; Anno di frequenza: I

Tutor: Pietro Rocculi; Co-tutor: Urszula Tylewicz

### 1. Curriculum

Jessica Genovese, nata a Siracusa il 29/10/1988, consegue il diploma di maturità nel 2007 presso l'Istituto di Istruzione Secondaria di 2° Grado M.F. Quitiliano, Liceo Linguistico a Siracusa. Nel Novembre 2011 si laurea presso l'Università di Catania, Facoltà di Agraria, corso di laurea triennale in Scienze e Tecnologie Alimentari con la tesi di laurea dal titolo: "Imbrunimento enzimatico: confronto tra i prodotti di origine animale e vegetale", con votazione 108/110. Nell'Ottobre 2013 consegue la laurea magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari presso l'Università di Bologna, Scuola di Agraria e Medicina Veterinaria, Campus di Cesena con la tesi dal titolo: "Influenza del grado di maturazione su alcuni parametri qualitativi e metabolici di kiwi e mele di IV gamma durante invecchiamento accelerato", con votazione 110/110 e lode. Da Luglio 2014 a Gennaio 2015 ha lavorato come Tecnico del Dipartimento Assicurazione Qualità presso l'azienda Pasta&Pasta con sede a Londra. Da Febbraio 2015 ad Agosto 2016 ha lavorato come Tecnico del Dipartimento Assicurazione e Certificazione Qualità presso l'azienda Bearfields Ltd con sede a Londra. Da Febbraio 2016 ad Agosto 2016 ha condotto un progetto in ambito aziendale per l'introduzione di nuove tecniche di campionamento e per l'implementazione di un nuovo sistema di raccolta dei dati di analisi chimica, microbiologica e nutrizionale a sostegno sia di standard qualitativi che della creazione di etichette nutrizionali. Da Novembre 2016 a Ottobre 2018 è stata titolare di un assegno di ricerca presso il Centro Interdipartimentale di Ricerca Industriale Agroalimentare per lo svolgimento di attività di ricerca nell'ambito del progetto dal titolo: "Ricerca industriale ed innovazione nel comparto ortofrutta".

Pubblicazioni: - Rocculi P, Cevoli C, Tappi S, Genovese J, Urbinati E, Picone G, Fabbri A, Capozzi F, Dalla Rosa M, *Freshness assessment of European hake (Merluccius merluccius) through the evaluation of eye chromatic and morphological characteristics*, «FOOD RESEARCH INTERNATIONAL», 2019, 115, pp. 234 - 240

- Di Francesco A, Mari M, Ugolini L, Parisi B, Genovese J, Lazzeri L, Baraldi E, *Reduction of acrylamide formation in fried potato chips by Aureobasidium pullulans L1 strain*, «INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY», 2019, 289, pp. 168 - 173

### 2. Stato dell'arte

I campi elettrici pulsati (PEF) rappresentano una tecnologia innovativa non termica che negli ultimi anni ha riscontrato una notevole attenzione nel settore delle tecnologie e biotecnologie degli alimenti. Il trattamento PEF si basa sull'utilizzo di impulsi elettrici ad alta tensione e di breve durata ( $\mu\text{s}$ - $\text{ms}$ ) con campi elettrici che possono variare da 100-300 V/cm a 20-80 kV/cm (Vorobiev & Lebovka, 2008). Campi elettrici con energie elevate ( $>20$  kV/cm) possono essere utilizzati come efficace alternativa ai processi termici tradizionali per l'inattivazione microbica ed enzimatica, col vantaggio di mantenere pressoché inalterate le caratteristiche sensoriali e nutrizionali dei prodotti alimentari (Sánchez-Vega *et al.*, 2014). Campi elettrici con valori energetici più bassi (0,5 – 1 kV/cm), invece, promuovono la perdita temporanea o permanente della semi-permeabilità delle membrane cellulari in tessuti biologici. Più nello specifico è importante sottolineare come le membrane cellulari possono essere considerate come delle barriere ai processi di diffusione, quindi il loro grado di permeabilizzazione può influenzare l'entità dei processi di trasferimento di massa. I fenomeni di elettroporazione delle membrane cellulari favoriscono i processi di trasferimento di massa grazie ad un aumentato rilascio dei liquidi intracellulari (Lebovka & Vorobiev, 2010). È stato dimostrato come l'applicazione di trattamenti PEF sia estremamente vantaggiosa se effettuata in combinazione a processi di estrazione (Loginova *et al.*, 2011), congelamento (Jalte *et al.*, 2009), essiccazione e disidratazione osmotica, accelerando i processi di diffusione cellulare e preservando gli attributi qualitativi dei prodotti, come componenti bioattivi, nutrienti, colore, aroma, *flavour* e *texture* (Odrizola-Serrano *et al.*, 2013). I trattamenti con campi elettrici pulsati richiedono un moderato consumo energetico, tipicamente tra 1 e 15 kJ/kg di prodotto, caratteristica che rende questa tecnica molto attrattiva a livello industriale, anche per la sua sostenibilità energetica. I meccanismi di elettroporazione causati dai campi elettrici pulsati applicati a matrici alimentari sono stati largamente studiati in sistemi modello semplici e condizioni operative statiche; tuttavia, i fenomeni che si verificano in condizioni operative non costanti e in prodotti con geometria e caratteristiche più complesse sono ancora poco chiari e necessitano di ulteriori studi. Il numero considerevole di processi di trasformazione che basano il loro effetto sull'alimento sui fenomeni di trasferimento di massa, rende il pre-trattamento con PEF applicabile durante il processo di tutta una serie di prodotti sia di origine animale che vegetale, per finalità differenti, dalla riduzione dei precursori necessari per la formazione di *toxics* da processo (e.g. zuccheri semplici e

asparagina), alla diminuzione dell'intensità dei processi termici di disidratazione (e.g. essiccamento), al potenziale aumento delle cinetiche di salagione/marinatura in matrici proteiche di origine animale (e.g. filetti di pesce) fino alla modulazione delle caratteristiche microstrutturali e reologiche di tessuti vegetali e *snacks* vegetali innovativi.

### 3. Obiettivi e risultati attesi

Il presente progetto di ricerca si propone di valutare l'applicazione di campi elettrici pulsati (PEF) a differenti tipologie di alimenti, in particolare come pre-trattamento/intervento di trasformazione per l'aumento della velocità dei fenomeni di trasferimento di massa in fase di processo. Il progetto di tesi di dottorato può essere suddiviso nelle seguenti attività, riepilogate nel diagramma di Gantt riportato in tabella 1:

**A1) Ricerca bibliografica** sull'applicazione dei trattamenti PEF a prodotti di origine vegetale (e.g. ortofrutta) e animale (e.g. prodotti ittici).

**A2) Riduzione di *toxics* da processo in prodotti fritti** al fine di ottimizzare i trattamenti PEF applicati ai processi di trasformazione delle patate fresche, allo scopo di massimizzare il possibile rilascio di substrati della reazione di *Maillard* con conseguente riduzione di composti potenzialmente cancerogeni (e.g. acrilammide) a seguito di frittura.

**A3) Preparazione di *snacks* vegetali innovativi** valutando la possibile combinazione di pre-trattamenti innovativi e tradizionali *mild*, finalizzata alla produzione di alimenti ad alto contenuto funzionale.

**A4) Preparazione di prodotti minimamente processati (MP) vegetali e animali di elevata qualità.** Questa fase sarà caratterizzata dalla comprensione dei meccanismi di elettroporazione/elettropermeabilizzazione delle cellule conseguenti ai trattamenti PEF, valutando le complesse interazioni tra modifiche microstrutturali indotte dai campi elettrici e reazioni chimiche e biochimiche successive al trattamento.

**A5) Studio di *shelf-life* dei prodotti minimamente processati ottenuti.** Le migliori condizioni di processo individuate verranno utilizzate per la preparazione di prodotti destinati a studi di *shelf-life*, anche attraverso invecchiamento accelerato.

**A6) *Scale-up* industriale.** La collaborazione con produttori di sistemi industriali ad alte tensioni potrà permettere un eventuale *scale-up* delle tecnologie più promettenti in ambiente industriale.

**A7) Scrittura e pubblicazione della tesi di dottorato, poster, articoli scientifici e presentazione orale.**

Tabella 1. Diagramma di Gantt dell'attività di ricerca del dottorato

Attività	Mese	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	
A1) <b>Ricerca bibliografica</b>		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A2) <b>Riduzione di <i>toxics</i> da processo in prodotti fritti</b>																				
1) Ottimizzazione dei trattamenti PEF applicati a patate fresche																				
2) Quantificazione di composti potenzialmente cancerogeni in seguito a frittura																				
A3) <b>Preparazione di <i>snacks</i> vegetali innovativi</b>																				
1) Combinazione di trattamenti PEF e trattamenti convenzionali <i>mild</i>																				
2) Valutazione delle caratteristiche qualitative di <i>snacks</i> vegetali prodotti																				
A4) <b>Preparazione di MP vegetali e animali di elevata qualità</b>																				
1) Valutazione delle modifiche strutturali e metaboliche in seguito a elettroporazione cellulare																				
2) Ottimizzazione dei parametri PEF al fine di velocizzare i meccanismi di diffusione delle soluzioni di marinatura in tessuti animali																				
A5) <b>Studio di <i>shelf-life</i> dei prodotti MP ottenuti</b>																				
A6) <b><i>Scale-up</i> industriale</b>																				
A7) <b>Partecipazione a congressi, preparazione di articoli scientifici e tesi</b>																				

### 4. Bibliografia

- Jalte M, Lanoiselle JL, Lebovka NI, Vorobiev E (2009) Freezing of potato tissue pre-treated by pulsed electric fields. *LWT- Food Science and Technology*, 42 (2), pp. 576-580.
- Lebovka N, Vorobiev E (2010) Advanced electroporation techniques in biology and medicine AG Pakhomov, M Damijan, MS Markov (Eds.), Series: Biological effects of electromagnetics, CRC Press (2010), pp. 463-490.
- Loginova KV, Lebovka NI, Vorobiev E (2011) Pulsed electric field assisted aqueous extraction of colorants from red beet. *Journal of Food Engineering*, 106 (2), pp. 127-133.
- Odrizola-Serrano I, Aguilo-Aguayo I, Soliva-Fortuny R, Martin-Belloso O (2013) Pulsed electric fields processing effects on quality and health-related constituents of plant-based foods. *Trends food sci and technol*, 29 (2), 98-107.
- Sánchez-Vega R, Elez-Martínez P, Martín-Belloso O (2014) Influence of high intensity pulsed electric field processing parameters on antioxidant compounds of broccoli juice. *Innovative Food Sci & Emerging Technol*, 29, 70-77.
- Vorobiev E, Lebovka N (2011) Enhancing extraction processes in the food industry series: Contemporary food engineering. In N Lebovka, E Vorobiev, F Chemat (Eds.), *Enhancing extraction processes in the food industry* (pp. 25-83). CRC Press, Taylor & Francis LLC.

## **Metabolomics investigation of edible organisms in anticipation of improving their meat quality**

Yan Li (email: yan.li7@unibo.it)

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, *Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna

Corso di Dottorato: Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari

Tematica: Scienze e Biotecnologie degli Alimenti; Ciclo di dottorato: XXXIV; Anno di frequenza: I

Tutor: Luca Laghi

### **1. Curriculum**

Born 02/09/1989 in Kaifeng, China;

Bachelor Degree, Henan Institute of Science and Technology, China, Sep. 2009-Jun.2013;

Master Degree, University of Bologna, Italy, Sep. 2014-Oct.2018;

PhD, University of Bologna, Italy, Nov. 2018-present.

### **2. State-of-Art**

With the improvement of people's living standards and changes in dietary structure, people have put forward higher requirements for the quality and safety of meat products (Owens CM 2000). In addition to the objective traits such as pH value, water retention and flesh color, meat quality traits include subjective traits such as taste, tenderness and flavor (Wang YP 2012).

Dynamic changes in moisture content and distribution are important factors in determining the quality and shelf life of meat and meat products (Russell SM 1995). Time-Domain Nuclear Magnetic Resonance (TD-NMR) can be used to analyze the distribution of moisture in meat and meat products, together with water migration process.

To gain information about meat products quality the study of their metabolome, the ensemble of low weight molecules, may be of key importance. Studies have shown that some flavor precursors are water-soluble small molecules, such as amino acids (namely taurine, alanine, anserine), dipeptides (like carnosine) and carbohydrates (Damez JL 2008). Thiamine is also a flavor precursor of at least 9 molecules involved in flavor determination, such as formic acid and heterocyclic furans. Conveniently, such approach can be put into practice by taking advantage of a single technology, which is proton high resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H-NMR}$ ) (Brennand 1989). Indeed,  $^1\text{H-NMR}$  has been employed to analyze meat low weight molecules profile, for example the collagen.

The animal's own health, diet and metabolism of nutrients are also important when studying the quality of any food product of animal origin. Metabolomics is a powerful approach to a biological system that aims to measure its low weight metabolites (<900Da). When untargeted, this characterization of the metabolic phenotype provides holistic information on the system under investigation because it allows the study of its biochemical responses to intrinsic (genetics, protein expression) or environmental (diet, gut microbiota) stimuli (Nicholson, J.K 1999).  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy is one of the main platforms for metabolomics because the very simple sample preparation and highly reproducible molecule quantification counterbalance a sensitivity lower than the one granted by other platforms such as mass spectrometry. For this reason,  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy has been employed for studying domestic animals to obtain the metabolite profiles of several biofluids, among which urine (Laghi, L 2018), serum, tracheal wash, and exhaled breath condensate (Bazzano, M. 2018). For example, in the recent past a total of 108 metabolites, giving information about diet, protein digestion, and energy generation or gut-microbial co-metabolism, were assigned across three biofluids (serum, feces and urine) in *Bos grunniens* (Zhu, C. 2019). With the present work, we hope to find out more about the relationship between quality of meat and the information that can be obtained by metabolomics on the animal and by metabolomics and TD-NMR combined on the product of animal origin.

### **3. Objectives and Milestones**

Current research activities will employ a metabolomics approach to assess the factors that contribute to the characteristics of meat. For this purpose, the overall health of the animals associated with diet and stressors will be studied by observing the animal metabolome using  $^1\text{H-NMR}$ . The same method will be used to study meat quality characteristics. On the other hand, a TD-NMR experiment will be established for the investigation of the water status of meat.

Il progetto di tesi di dottorato può essere suddiviso nelle seguenti attività, riepilogate nel diagramma di Gantt riportato in tabella 1:

**A1) Literature review about latest researchers related to investigating the relationship between food and health through a metabolomics approach.**

**A2) Evaluation of different sample preparation systems in order to identify the methods that allow repeatability on a large scale.**

**A3) Metabolomics oriented experiments focusing on the relationship between meat quality and low weight molecules.**

**A4) Metabolomics oriented experiments focusing on the relationship between food processing and food composition and, in turn, between food composition and health**

**A5) Writing and publishing the doctoral thesis, posters, scientific articles and oral presentations**

**Table 1. Gantt Chart for the research activities in scope of doctoral study**

Attività	Mese	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
A1) <i>Literature review and Experimental design</i>		■	■	■															
	1) <i>preliminary studies in metabolomics</i>	■	■																
	2) <i>experiment design</i>	■	■																
A2) <i>Evaluation of different sample preparation systems</i>					■	■	■	■											
A3) <i>Experiments focusing on meat quality and low weight molecules</i>									■	■	■	■	■	■	■				
	1) <i>read papers to choose some low weight molecules</i>								■	■	■								
	2) <i>assessments of the relationship between meat quality and low weight molecules</i>								■	■	■								
A4) <i>Experiments focusing on the food processing and health</i>																	■	■	■
	1) <i>assessments of the relationship between food processing and composition</i>																■	■	■
	2) <i>study of the potential relationships between food composition and health</i>																■	■	■
A5) <i>Publication of the results</i>																			

#### 4. Bibliography

- Bazzano M, Laghi L, Zhu C, Magi GE, Serri E, Spaterna A, Tesi B, Laus F (2018) Metabolomics of tracheal wash samples and exhaled breath condensates in healthy horses and horses affected by equine asthma. *J. Breath Res.* 12, 46015.
- Brennan Charlotte PJ, Kim Ha, Robert C Lindsay (1989) Aroma properties and thresholds of some branched-chain and other minor volatile fatty acids occurring in milkfat and meat lipids 1. *Journal of Sensory Studies* 4.2: 105-120.
- Damez JL, Clejon S (2008) Meat quality assessment using biophysical methods related to meat structure [J]. *Meat Sci.* 80(1): 132-149.
- Laghi L, Zhu C, Campagna G, Rossi G, Bazzano M, Laus F (2018) Probiotic Supplementation in Trained Trotter Horses: Effect on Blood Clinical Pathology Data and Urine Metabolomic Assessed in Field. *J. Appl. Physiol.* 125, 654–660.
- Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E (1999) “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 29, 1181–1189.
- Owens CM, Hirschler EM, McKee SR, et al (2000) The characterization and incidence of pale, soft, exudative turkey meat in a commercial plant [J]. *Poult. Sci.* 79: 553-558.
- Russell SM, Fletcher DL, Cox NA (1995) Spoilage bacteria of fresh broiler chicken carcasses [J]. *Poult Sci.* 74: 2041-2047.
- Wang YP, Shi CQ, Zeng WB, et al (2012) Research of the characteristics of the Shiqi meat pigeon [J]. *Chin J Anim Sci.* 48(13): 10-13.
- Zhu C, Li C, Wang Y, Laghi L (2019) Characterization of Yak Common Biofluids Metabolome by Means of Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Metabolites*, 9(3), 41.

## **Valorizzazione di sottoprodotti e scarti dell'industria agro-alimentare e loro utilizzo nella formulazione di alimenti innovativi**

Dario Mercatante (e-mail: dario.mercatante2@unibo.it)

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

Corso di Dottorato: Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari

Tematica: Water-Food-Energy-Sustainable Agriculture Nexus; Ciclo di dottorato: XXXIV; Anno di frequenza: I

Tutor: Maria Teresa Rodriguez Estrada

### **1. Curriculum**

#### Istruzione:

A.A. 2018/19-in corso: Dottorato di Ricerca presso l'Alma Mater Studiorum- Università degli Studi di Bologna XXXIV ciclo, progetto dedicato al tema di ricerca: "Valorizzazione di sottoprodotti e scarti dell'industria agro-alimentare e loro utilizzo nella formulazione di alimenti innovativi", Tutor: Prof.ssa Maria Teresa Rodriguez Estrada.

A.A. 2017/18: Laurea Magistrale in Sicurezza e Qualità delle Produzioni Animali presso l'Alma Mater Studiorum-Università degli Studi di Bologna. Tesi sperimentale dal titolo: "Caratterizzazione di profilo aromatico e stabilità ossidativa di omogeneizzati bio a base di carne", Relatrice: Prof.ssa Maria Teresa Rodriguez Estrada. Voto: 110/110 e Lode

A.A. 2015/16: Laurea Triennale in Scienze Zootecniche e Tecnologie delle Produzioni Animali presso l'Università degli Studi di Parma. Tesi sperimentale dal titolo: "Determinazione qualitativa e quantitativa di *Salmonella* spp. nel processo produttivo di salami stagionati", Relatrice: Prof.ssa Silvia Bonardi. Voto: 96/110 (Apr. 2016)

### **2. Stato dell'arte**

La sempre crescente quantità di rifiuti agro-alimentari prodotti è diventata una delle principali preoccupazioni non solo a livello europeo, ma soprattutto a livello mondiale. Il non corretto smaltimento di questi rifiuti causa problemi ambientali ed ingenti perdite economiche. Proprio per questo motivo è necessario elaborare delle strategie per il riutilizzo e la valorizzazione dei vari sottoprodotti e scarti dell'industria agro-alimentare che non si limiti al loro uso come fertilizzanti, compost, materiale da biogas o mangime per animali, ma, magari, li utilizzi come fonti e/o ingredienti funzionali ricchi di composti ad elevato valore biologico (Fritsch et al., 2017) per la formulazione di nuove tipologie di alimenti. Per sottoprodotto si intende qualsiasi sostanza od oggetto che soddisfa tutte le seguenti condizioni: a) la sostanza o l'oggetto è originato da un processo di produzione, di cui costituisce parte integrante, e il cui scopo primario non è la produzione di tale sostanza od oggetto; b) è certo che la sostanza o l'oggetto sarà utilizzato, nel corso dello stesso o di un successivo processo di produzione o di utilizzazione, da parte del produttore o di terzi; c) la sostanza o l'oggetto può essere utilizzato direttamente senza alcun ulteriore trattamento diverso dalla normale pratica industriale; d) l'ulteriore utilizzo è legale, ossia la sostanza o l'oggetto soddisfa, per l'utilizzo specifico, tutti i requisiti pertinenti riguardanti i prodotti e la protezione della salute e dell'ambiente e non porterà a impatti complessivi negativi sull'ambiente o la salute umana (Decreto Legislativo 152/2006). Questa definizione di sottoprodotto rientra perfettamente in quello che è il principio dell'Economia Circolare, ossia il riutilizzo dei materiali residui dalla lavorazione in successivi cicli produttivi, riducendo al massimo gli sprechi, nel dicembre del 2015, infatti, la Commissione Europea ha presentato il nuovo pacchetto sull'economia circolare. Il piano d'azione prevede un approccio profondamente integrato basato su tutta la catena produttiva che va dalla progettazione dei prodotti fino al loro consumo, mirando a ridurre la produzione dei rifiuti e ad incentivare il riciclo della maggior parte delle sostanze. In Italia, il 2 febbraio del 2016, è entrato in vigore il *Collegato Ambientale* (Legge 221/2015) contenente disposizioni in materia di normativa ambientale per promuovere la green economy e lo sviluppo sostenibile. Questo ha permesso che i principi dell'economia circolare entrassero a far parte dell'ordinamento italiano agendo con ampio raggio su tutto ciò che riguarda l'ambiente, dalla gestione dei rifiuti fino alla mobilità sostenibile. Essendo l'Unione Europea il più grande produttore mondiale di alcuni dei prodotti maggiormente consumati sia in alimentazione umana che in quella animale, la maggior parte dei rifiuti deriva proprio dalla raccolta e dalla lavorazione di prodotti quali grano, avena, olio d'oliva, pomodori, patate (Fritsch et al., 2017). I composti estratti dai sottoprodotti derivati dalla lavorazione degli alimenti sopracitati hanno un potenziale utilizzo come ingredienti funzionali o additivi nell'industria alimentare grazie alla loro composizione. La maggior parte sono infatti ricchi in composti bioattivi come carotenoidi, composti fenolici, oli essenziali o  $\beta$ -glucani (Gómez-Caravaca, 2014). Grazie alla presenza di questi composti, hanno quindi diverse proprietà salutistiche, antiossidanti e antimicrobiche e possono essere utilizzati anche come coloranti alimentari naturali (Dordevic e Antov, 2016). Altri ingredienti preziosi potrebbero essere le fibre alimentari, tra cui polisaccaridi e lignina, o le proteine che possono essere utilizzate come ingrediente funzionale andando ad aumentare il valore nutrizionale di alcuni cibi (Oreopoulou e Tzia, 2007). Queste molecole potrebbero andare a sostituire parzialmente o completamente diverse componenti aggiunte in varie tipologie di alimenti che esercitano degli effetti dannosi sulla salute umana, quali i

sali di nitrato ed i nitriti. Questi vengono addizionati nei prodotti carnei in qualità di agenti conservanti grazie alla loro attività antimicrobica, stabilizzante del colore e antiossidante (Bolger et al., 2017). Indipendentemente dagli innumerevoli vantaggi tecnologici però, una riduzione nell'uso dei nitrati e nitriti è diventata una questione di primaria importanza per le industrie del settore. Un'altra applicazione molto interessante dei sottoprodotti contenenti molecole con effetto antiossidante ed antimicrobico è quella di poter essere utilizzati per l'imballaggio attivo o il rivestimento per prolungare la durata di conservazione dei prodotti alimentari. Infatti, i residui ottenuti dalla lavorazione dei cereali potrebbero essere utilizzati come agente di rinforzo nella produzione di bio-compositi per la progettazione di nuovi imballaggi (Berthet et al., 2016).

### 3. Obiettivi e risultati attesi

Il presente progetto di ricerca consiste nel valorizzare i sottoprodotti e gli scarti dell'industria agro-alimentare ricchi in sostanze bioattive che verranno utilizzati nella formulazione di alimenti innovativi.

Il progetto di tesi di dottorato può essere suddiviso nelle seguenti attività, riepilogate nel diagramma di Gantt riportato in Tabella 1:

**A1) Ricerca bibliografica**

**A2) Messa a punto dei metodi di estrazione e caratterizzazione di composti bioattivi da scarti agroalimentari**

**A3) Estrazione e caratterizzazione chimico-fisica dei composti bioattivi**

**A4) Sviluppo di sistemi di inclusione dei composti bioattivi**

**A5) Formulazione di alimenti innovativi**

**A6) Studio di shelf-life dei prodotti selezionati**

**A7) Scrittura e pubblicazione della tesi di dottorato, poster, articoli scientifici e presentazione orale**

Tabella 1. Diagramma di Gantt dell'attività di ricerca del dottorato

Attività	Mese	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
A1) <i>Ricerca bibliografica</i>		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A2) <i>Messa a punto dei metodi di estrazione e caratterizzazione di composti bioattivi da scarti agroalimentari</i>				■	■	■	■	■	■										
1) Selezione degli scarti				■	■	■	■	■											
2) Messa a punto dei metodi di estrazione e caratterizzazione					■	■	■	■	■										
A3) <i>Estrazione e caratterizzazione chimico-fisica dei composti bioattivi</i>					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A4) <i>Sviluppo di sistemi di inclusione dei composti bioattivi</i>							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1) Studio dei sistemi di inclusione							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2) Valutazione della stabilità dei sistemi d'inclusione								■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A5) <i>Formulazione di alimenti innovativi</i>									■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1) Inclusione dei composti bioattivi e sostituzione parziale (o totale) di alcuni additivi									■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2) Valutazione di stabilità e caratteristiche organolettiche dei prodotti innovativi										■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A6) <i>Studio di shelf-life dei prodotti selezionati</i>																			■
A7) <i>Preparazione della tesi, articoli e poster</i>																			■

### 4. Bibliografia

- Berthet MA, Angellier-Coussy H, Guillard V, Gontard N (2016) Vegetal fiber-based biocomposites: Which stakes for food packaging applications?. *J. Appl. Polym. Sci.*, 133, 1-18.
- Bolger Z, Brunton NP, Lyng JG, Monahan FJ (2017) Comminuted meat products- consumption, composition, and approaches to healthier formulation. *Food Rev. Int.*, 33, 143-166.
- Dordevic T, Antov M (2016) Wheat chaff utilization: Evaluation of antioxidant capacity of waste streams generated by different pretreatments. *Ind. Crop. Prod.* 94, 649–657.
- Decreto Legislativo 152 del 3 aprile 2006. “Norme in Materia Ambientale”.
- Fritsch C, Staebler A, Happel A, Cubero Márquez M, Aguiló-Aguayo I, Abadias M, Gallur M, Cigognini IM, Montanari A, Lopez MJ, Suarez-Estella F, Brunton N, Luengo E, Sisti L, Ferri M, Belotti G (2017) Processing, valorization and application of bio-waste derived compounds from potato, tomato, olive and cereals: A review. *Sustainability*, 9, 1492-1538.
- Gómez-Caravaca AM, Verardo V, Bendini A, Toschi TG (2014) From wastes to added value by-products: An overview on chemical composition and healthy properties of bioactive compounds of olive oil chain by-products. In: “Virgin Olive Oil: Production, Composition, Uses and Benefits for Man”; De Leonardis, A., Ed. Nova Science Publishers: New York, NY, USA, 301–334.
- Oreopoulou V, Tzia C (2007) Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants, and colorants. In: “Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry”, Oreopoulou, V., Russ, W., Ed. Springer: Berlin, Germany, 209–232.

## **Analisi del microbioma e del resistoma di alimenti di origine animale provenienti da allevamenti intensivi tradizionali ed antibiotic-free**

Chiara Oliveri (e-mail: chiara.oliveri5@unibo.it)

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, *Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna

Corso di Dottorato: Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari

Tematica: Scienze e Biotecnologie degli Alimenti; Ciclo di dottorato: XXXIV; Anno di frequenza: I

Tutor: Gerardo Manfreda, Co-tutor: Alessandra De Cesare

### **1. Curriculum**

Chiara Oliveri è nata il 30/10/1991 a Enna (EN). A Settembre 2015 ha conseguito presso l'Università di Pisa la laurea triennale in Scienze e Tecnologie delle Produzioni Animali, curriculum Scienze zootecniche e tecnologie delle produzioni animali (L-38) con votazione di 101/110, presentando una relazione finale dal titolo "*Studio della biodiversità dei batteri lattici nei formaggi tradizionali: l'esempio del Ragusano DOP*".

A Marzo 2018 ha conseguito presso l'*Alma Mater Studiorum* - Università degli Studi di Bologna la laurea magistrale in Sicurezza e Qualità delle Produzioni Animali (LM-86) con votazione di 110/110 e lode, discutendo una tesi sperimentale dal titolo "*Impiego di batteri probiotici nella produzione di formaggi con latticello*".

Da Novembre 2018 è dottoranda per conto dell'*Alma Mater Studiorum* – Università degli Studi di Bologna, XXXIV ciclo, settore di Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari con un progetto dedicato al tema di ricerca "*Analisi del microbiota e del resistoma di alimenti di origine animale provenienti da allevamenti intensivi tradizionali e antibiotic-free*".

### **2. Stato dell'arte**

Le malattie di origine alimentare costituiscono un problema globale significativo per la salute pubblica. Gli alimenti di origine animale sono spesso considerati uno dei principali serbatoi per i patogeni di origine alimentare (Yang *et al.*, 2016). I recenti sviluppi delle tecniche di Next Generation Sequencing (NGS) permettono di ottenere quantità di informazioni genetiche impensabili fino a pochi anni fa (Diaz-Sanchez *et al.*, 2013). Tra queste, la possibilità di un approccio coltura-indipendente che permette la caratterizzazione di popolazioni batteriche non coltivabili (Mayo *et al.*, 2014). Inoltre, tale approccio permette lo studio dell'alimento come possibile fonte di geni di antibiotico resistenza e quindi la valutazione del rischio di trasmissione all'uomo.

Nel tratto gastrointestinale degli animali, il microbiota svolge un ruolo importante nel migliorare l'assorbimento dei nutrienti, rafforzare il sistema immunitario e gioca un ruolo importante per la sintesi vitaminica e la proliferazione di batteri patogeni intestinali, influenzando così sia la crescita che la salute dell'animale (Young *et al.*, 2015). Il microbiota è un ecosistema complesso, prevalentemente costituito da batteri in simbiosi con l'ospite ed ospita un vasto serbatoio di geni di resistenza agli antibiotici che potrebbero essere acquisiti dall'uomo e agenti patogeni (Xiong *et al.*, 2018). Attraverso lo studio della metagenomica, cioè lo studio di tutto il materiale genetico presente in un ecosistema, si è riuscito a identificare la diversità microbica e le sue funzioni.

Recentemente, le piattaforme di sequenziamento Next Generation Sequencing rispetto alle precedenti che avevano elevati costi di sequenza e dati di sequenza insufficienti, offrono una maggiore velocità, meno lavoro, costi più bassi e una maggiore qualità e quantità di dati, permettendo così di effettuare ricerche sostanziali delle comunità microbiche intestinali, la loro abundance e dei geni associati all'antibiotico resistenza (Young *et al.*, 2015).

### **3. Obiettivi e risultati attesi**

Il presente progetto di ricerca si propone di valutare e comparare la composizione del microbioma e del resistoma in alimenti di origine animale con particolare riferimento alle carni ottenute da animali allevati con metodi intensivi tradizionali ed antibiotic-free, tramite l'applicazione di tecniche NGS target e shotgun. Inoltre, si propone di mettere a punto protocolli di processamento del campione, sequenziamento e analisi bioinformatiche più idonei per l'ottenimento di dati di sequenziamento di NGS di alta qualità.

Il progetto di tesi di dottorato può essere suddiviso nelle seguenti attività, riepilogate nel diagramma di Gantt riportato in tabella 1:

**A1) Ricerca bibliografica** riguardante la composizione delle popolazioni batteriche presenti nelle matrici alimentari di origine animale e le tecniche di Next Generation Sequencing applicabili per lo studio del microbioma e resistoma.

**A2) Messa a punto di protocolli di NGS** più idonei per l'estrazione, purificazione e quantificazione del DNA e per la preparazione delle library da sequenziare con vari metodi shotgun e del 16S.

**A3) Analisi metagenomica** mediante l'utilizzo di pipeline bioinformatiche e software dedicati (ad es. MG-RAST) sia per l'identificazione delle popolazioni microbiche presenti sugli alimenti che dei geni di antibiotico resistenza.

**A4) Analisi comparativa dei metagenomi** ottenuti da diversi alimenti per la valutazione dell'effetto dei metodi di allevamento tradizionale e antibiotic-free sulle popolazioni microbiche e relativo resistoma.

**A5) Scrittura e pubblicazione** della tesi di dottorato, poster, articoli scientifici e presentazioni orali a convegni nazionali ed internazionali.

**Tabella 1. Diagramma di Gantt dell'attività di ricerca del dottorato**

Attività	Mese	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	
A1) <b>Ricerca bibliografica</b>		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1) Protocolli NGS per il sequenziamento del microbioma di un alimento		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A2) <b>Messa a punto di protocolli di NGS</b>						■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1) Estrazione del DNA e preparazione delle library						■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2) Sequenziamento NGS shotgun e del 16S								■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A3) <b>Analisi metagenomiche</b>										■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1) Caratterizzazione e quantificazione popolazioni microbiche										■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2) Caratterizzazione e quantificazione geni di antibiotico resistenza												■	■	■	■	■	■	■	■	■
A4) <b>Analisi comparativa dei mtagenomi</b>														■	■	■	■	■	■	■
A5) <b>Preparazione della tesi, articoli e poster</b>		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1) Articoli		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2) Tesi		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

#### 4. Bibliografia

- Diaz-Sanchez S, Hanning I, Pendleton S, D'Souza D (2013) Next-generation sequencing: the future of molecular genetics in poultry production and food safety, *Poult Sci* 92(2):562-72.
- Mayo B, Rachid CT, Alegría A, Leite AM, Peixoto RS, Delgado S (2014) Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology, *Curr Genomics*. 15(4):293-309.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-liggett C, Knight R, Gordon JI (2007) The human microbiome project: Exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature*. 449:804–810. doi: 10.1038/nature06244.
- Xiong W, Wang Y, Sun Y, Ma L, Zeng Q, Jiang X, Li A Zeng Z, Zhang T (2018) Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes, 1–11.
- Yang X, Noyes NR, Doster E, Martin JN, Linke LM, Magnuson RJ, Yang H, Geornaras I, Woerner DR, Jones K, Rulz J, Boucher C, Morley PS, Belk K (2016) Use of Metagenomic Shotgun Sequencing Technology to Detect Foodborne Pathogens within the Microbiome of the Beef Production Chain. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 2433–2443.
- Young KC, Lee TK, Sul WJ (2015) Metagenomic Analysis of Chicken Gut Microbiota for Improving Metabolism and Health of Chickens — A Review, 28(9), 1217–1225.

## **In field application of biocontrol agents to improve the safety and quality of grapevine products**

Simin Sabaghian (e-mail: simin.sabaghian2@unibo.it)

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, *Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna

Corso di Dottorato: Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari

Tematica: Scienze e Biotecnologie degli Alimenti; Ciclo di dottorato: XXXIV; Anno di frequenza: I

Tutor: Rosalba Lanciotti

Co-tutors: Lucia Vannini and Francesca Patrignani

### **1. Curriculum**

**Date of Birth:** 1986.3.21, Tonekabon, Iran

**BSc,** Agricultural Engineering, Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Mazandaran University, Sari, Iran, 2004-2008.

**MSc,** Agricultural Engineering, Plant Pathology

College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Azad University, Tehran, Iran, 2009-2012.

**Research sabbatical:** in molecular, biological and epidemiological studies on grapevine infecting viruses in laboratories of the Integrated Pest Management Division of CIHEAM institute (Valenzano, Bari, Italy) May-Auguste 2016.

**The first CURE-XF International Summer School** on “*Xylella Fastidiosa*: Detection, Epidemiology and Control Measures” at CIHEAM Bari (September-October 2018)

**Ph.D.** Food Science and Biotechnology, Department of Agricultural and Food Sciences, University of Bologna, Italy. 2018, Present.

### **2. State of the art**

Fungi is one of the most significant economic losses pre- and post harvest in vineyards worldwide. *Botrytis cinerea* and *Phaeoconiella chlamydospora* are two of important pathogens on grapevine, which are the causal agent of gray mold and Esca disease which causes heavy losses in table and wine grapes (Coertze and Holz 2002). Fruit maturity and the time of picking and application of the antagonist are the main factors affecting the performance of postharvest biocontrol agents. In addition over-mature fruit is much more susceptible to fungal attack than a fruit picked at optimal maturity (Boonyakiat et al. 1987).

New ways must be found to control them since there is no direct control of these diseases. The use of microbial antagonists for the control of postharvest diseases received special attention, and has been extensively considered. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by antagonistic microorganisms seems hopeful in replacing or reducing the use of synthetic fungicides (Lima et al. 1999). Yeasts have been extensively studied because they possess many structures that make them suitable as biocontrol agents in fruits (Chanchaichaovivat, Ruenwongsa, and Panijpan 2007). Yeasts are rarely related to occurrences of foodborne gastroenteritis, intoxications or other infections, unlike bacteria and viruses (Fleet and Balia 2006). In the first part of my project, I will focus on the relations between plant fungus diseases and yeasts as the biocontrol agents, by relying on laboratory and molecular methods and investigating the role of yeast on increasing the safeties and qualities of grapevine products.

### **3. Objectives and expected results**

The present research project aims at evaluating the relation between plant pathogens and yeasts as the biocontrol agents in field and in the laboratory.

The doctoral thesis project can be divided into the following tasks, summarized in the Gantt chart shown in table 1:

**A1) literature review** about the previous studies based on biological control and using yeast as the biocontrol agents especially on grapevine. In addition, I will search for modern applications in which yeasts were used yeasts as biocontrol agents.

**A2) Selection of the biocontrol agents** in relation to the target pathogens and set up of the protocols to study their interactions in LAB trials.

**A3) Set up of the laboratory and field experiments** in order to evaluate their potential application.

**A4) Molecular approaches** in order to study the molecular interactions among yeasts, the target pathogens and the host plant and to understand the action mechanisms of the innovative and green strategy to improve grape quality.

**A5) Analyses** using RSM applications to examine the best microorganism as a biocontrol agent for grapevine disease and molecular analyses based on gene sequencing approaches.

A6) Selection of the best candidate for the biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Phaeomoniella chlamydospora* in grapevine

A7) writing and publication of doctoral theses, posters, scientific papers and oral presentations

**Table 1. Gantt Chart for the research activities in scope of doctoral study**

Attività	Mese	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	
A1) <b>literature review</b>		■	■	■																
	1) biological control based on yeast	■	■																	
	2) current applications in grapevine	■	■	■																
A2) <b>Selection of the biocontrol agents</b>				■	■	■	■	■												
	1) set up of the protocols			■	■	■	■													
	2) study their interactions in LAB trials.				■	■														
A3) <b>Set up of the laboratory and field experiments</b>							■	■	■	■	■	■	■	■						
A4) <b>Molecular approaches</b>											■	■	■	■	■					
	1) molecular interactions										■	■	■	■	■					
	2) understand the action mechanisms											■	■	■	■					
A5) <b>analyses</b>																■	■	■	■	■
	RSM applications															■	■	■	■	■
	molecular analyses															■	■	■	■	■
A6) <b>Selection of the best candidate for the biocontrol</b>																	■	■	■	■
A7) <b>Thesis and articles</b>		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

#### 4. Bibliography

- Boonyakiat D, PM Chen, RA Spotts, DG Richardson (1987) Effect of harvest maturity on decay and post-harvest life of 'd'Anjou'pear', *Scientia Horticulturae*, 31: 131-39.
- Chanchaichaovivat, Arun, Pintip Ruenwongsa, Bhinyo Panijpan (2007) Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*), *Biological Control*, 42: 326-35.
- Coertze S, G Holz (2002) Epidemiology of *Botrytis cinerea* on grape: wound infection by dry, airborne conidia, *South African Journal of Enology and Viticulture*, 23: 72-91.
- Fleet Graham, Roostita Balia (2006) The public health and probiotic significance of yeasts in foods and beverages. in, *Yeasts in food and beverages* (Springer).
- Lima G, S Arru, De Curtis F, Arras G (1999) Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23: 223-29.

## **Strategie innovative per la mitigazione del contenuto di acrilammide e altre sostanze tossiche in diverse matrici alimentari**

Maria Alessia Schouten (email: maria.schouten2@unibo.it)

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, *Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna

Corso di Dottorato: Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari

Tematica: Scienze e Biotecnologie degli Alimenti; Ciclo di dottorato: XXXIV; Anno di frequenza: I

Tutor: Santina Romani; Co-tutor: Silvia Tappi

### **1. Curriculum**

Maria Alessia Schouten nata a Faenza (RA) il 19/01/1994.

Nel 2013 consegue il diploma di maturità presso l'Istituto Tecnico per Geometri I.T.C.G. "A. Oriani" di Faenza (RA) con votazione di 100/100. Il 18 Ottobre 2016 consegue la Laurea Triennale in Tecnologie Alimentari presso l'Università di Bologna con votazione di 110/110 e lode presentando la tesi sperimentale dal titolo: "Studio per l'ottenimento di fette di mele essiccate arricchite con  $\beta$ -Glucano", Relatore: Prof.ssa Santina Romani, Correlatore: Dott.ssa Urszula Tylewicz. Nello stesso anno si iscrive al corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari presso l'Università di Bologna. Da Febbraio a Giugno 2017 frequenta un periodo di studio e ricerca presso la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació dell'Universitat de Barcelona (Spagna) nell'ambito del Progetto Erasmus+ Studio. Il 16 Ottobre 2018 consegue la Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari presso l'Università di Bologna con votazione di 110/110 e lode discutendo la tesi sperimentale dal titolo: "Effetto dell'utilizzo di trattamenti innovativi sulla riduzione del contenuto in acrilammide in patate fritte tipo chips", Relatore: Prof.ssa Santina Romani, Correlatori: Dott.ssa Silvia Tappi e Dott.ssa Jessica Genovese.

Da Novembre 2018 è dottoranda presso l'Università di Bologna (XXXIV ciclo), dottorato in Scienze Agrarie, Ambientali e Alimentari, tematica di ricerca: Scienze e Biotecnologie degli Alimenti (Tutor: Prof.ssa Santina Romani; Co-tutor: Dott.ssa Silvia Tappi).

### **2. Stato dell'arte**

I trattamenti termici degli alimenti rivestono un'enorme importanza per la trasformazione e la sanificazione di molte materie prime, semilavorati e prodotti formulati che, attraverso tali processi, raggiungono i desiderati livelli di proprietà sensoriali e igienico-sanitarie. Ciononostante, gli stessi trattamenti (cottura, frittura, tostatura ecc.) sono spesso responsabili della riduzione delle proprietà nutrizionali e della neoformazione di composti tossici e potenzialmente cancerogeni (Rannou et al., 2016). Tra questi è da citare l'acrilammide (AA), che si forma principalmente nel corso delle reazioni di Maillard, partendo da una reazione di condensazione tra il gruppo amminico di un aminoacido (es. asparagina) ed il gruppo carbonilico di uno zucchero riducente (es. glucosio) (Hedegaard et al., 2008).

La legislazione è sempre più restrittiva rispetto ai livelli di AA consentiti nei prodotti alimentari, per cui interventi mirati alla prevenzione della sua formazione o riduzione in diverse matrici alimentari sono un obiettivo importante, anche se non sempre facile da raggiungere, per le industrie del settore. Le categorie di alimenti in cui sono stati ritrovati i livelli più elevati di questo composto tossico sono: prodotti a base di patate (al forno, fritte), prodotti da forno (biscotti, cereali da colazione, snacks) e caffè tostato (Rannou et al., 2016; Baskar & Aiswarya, 2018).

I meccanismi e le cinetiche legati alla formazione di AA sono piuttosto complessi e influenzati da numerosi fattori come la concentrazione di precursori, il pH, il contenuto e l'attività dell'acqua nella matrice, i parametri di processo, come tempo, temperatura, umidità relativa e modalità di trasferimento del calore (Romani et al., 2008; Romani et al., 2009; Anese et al., 2009).

A seconda del tipo di alimento e di processo adottato, possono essere diverse le strategie per controllare il contenuto di AA, la maggior parte delle quali sono rivolte alla riduzione dei suoi precursori, al fine di diminuire l'intensità delle reazioni di Maillard, o al controllo dei parametri di processo (Rannou et al., 2016; Baskar & Aiswarya, 2018). Tuttavia, le strategie studiate per la riduzione di tale composto sono ancora da chiarire e ricercare in quanto non sempre efficaci su tutti i prodotti, non sempre di facile applicazione a livello industriale e molte di esse influenzano negativamente le più importanti caratteristiche sensoriali desiderate nel prodotto finito (Pedreschi et al., 2014).

L'applicazione di biotecnologie e di tecnologie non termiche emergenti può contribuire in modo significativo a controllare e ridurre la formazione di AA in molti alimenti, portando diversi vantaggi tra i quali il mantenimento delle caratteristiche organolettiche. Ad esempio, pretrattamenti con campi elettrici pulsati (PEF) o ultrasuoni (US), applicati durante le fasi di trasformazione di alcune matrici alimentari, possono contribuire ad aumentare i processi di trasferimento di massa e quindi la lisciviazione di substrati della reazione di Maillard riducendo la formazione di AA nella successiva fase di cottura (Lebovka & Vorobiev, 2010). Gli studi affrontati riguardanti l'applicazione di queste tecnologie per la minimizzazione/riduzione di AA negli alimenti sono molto limitati o addirittura assenti.

La salubrità, genuinità e qualità degli alimenti sono dei requisiti indispensabili e per questo è necessario adottare strategie in grado di ridurre la presenza di composti tossici nei prodotti finiti.

### 3. Obiettivi e risultati attesi

Il presente progetto di ricerca si propone di:

- fornire una conoscenza più approfondita degli aspetti ancora scarsamente studiati sull'applicazione di trattamenti ed interventi tecnologici tradizionali ed innovativi sia per il controllo della formazione di AA che per la sua riduzione negli alimenti di maggiore interesse (patate, prodotti da forno e caffè);
- verificare l'efficacia sinergica di più interventi, tradizionali e innovativi, di mitigazione;
- selezionare, sulla base dei risultati ottenuti, le migliori strategie studiate nei diversi gruppi di alimenti che consentano di ottenere bassi livelli di AA e al contempo buone e peculiari caratteristiche qualitative ed organolettiche (colore, sapore, odore, consistenza);
- ottimizzare l'uso dei trattamenti più promettenti studiati, attraverso la definizione di parametri di processo idonei ad applicazioni a livello industriale.

Il progetto di tesi di dottorato sarà suddiviso nelle seguenti attività, riepilogate nel diagramma di Gantt riportato in tabella 1:

**A1) Ricerca bibliografica.**

**A2) Studio di processi innovativi (pretrattamenti con lieviti e campi elettrici pulsati - PEF) su scala pilota per la mitigazione della formazione di AA in prodotti a base di patate.**

**A3) Studio di interventi tecnologici per la mitigazione della formazione di AA in caffè tostato e bevande derivate.**

**A4) Studio di interventi tecnologici tradizionali ed innovativi per la mitigazione della formazione di AA in prodotti da forno.**

**A5) Scrittura e pubblicazione di poster, articoli scientifici e della tesi di dottorato.**

**Tabella 1. Diagramma di Gantt dell'attività di ricerca del dottorato**

Attività	Mese	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	
A1) <i>Ricerca bibliografica</i>		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A2) <i>Studio di processi innovativi su scala pilota per la mitigazione della formazione di AA in prodotti a base di patate</i>			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	1) selezione, messa a punto e ottimizzazione dei parametri di processo	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	2) valutazione dell'effetto dei trattamenti sulle caratteristiche dell'alimento	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A3) <i>Studio di interventi tecnologici per la mitigazione della formazione di AA in caffè tostato e bevande derivate</i>				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	1) selezione, messa a punto e ottimizzazione dei parametri di processo	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	2) valutazione dell'effetto dei trattamenti sulle caratteristiche della bevanda	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A4) <i>Studio di interventi tecnologici tradizionali ed innovativi per la mitigazione della formazione di AA in prodotti da forno</i>									■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	1) selezione, messa a punto e ottimizzazione dei parametri di processo	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	2) valutazione dell'effetto dei trattamenti sulle caratteristiche dell'alimento	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A5) <i>Scrittura e pubblicazione di poster, articoli scientifici e della tesi di dottorato</i>																				■

### 4. Bibliografia

- Anese M, Suman M, Nicoli MC (2009) Technological Strategies to Reduce Acrylamide Levels in Heated Foods, *Food Eng Rev* 1:169-179.
- Baskar G & Aiswarya R (2018) Overview on mitigation of acrylamide in starchy fried and baked foods, *J Sci Food Agric* 98:4385-4394.
- Hedegaard RV, Frandsen H & Skibsted LH (2008) Kinetics of formation of acrylamide and Schiff base intermediates from asparagine and glucose, *Food Chem* 108:917-925.
- Lebovka N & Vorobiev E (2010) Advanced electroporation techniques in biology and medicine Pakhomov AG, Damijan M, Markov MS ed, Series: Biological effects of electromagnetics, New York: CRC Press, 463-490.
- Pedreschi F, Mariotti MS, Granbyc K (2014) Review: Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment, *J Sci Food Agric* 94:9-20.
- Rannou C, Laroque D, Renault E, Prost C, Sérot T (2016) Review: Mitigation strategies of acrylamide, furans, heterocyclic amines and browning during the Maillard reaction in foods, *Food Res Int* 90:154-176.
- Romani S, Bacchiocca M, Rocculi P, Dalla Rosa M (2008) Effect of frying time on acrylamide content and quality aspects of French fries, *Eur Food Res Technol* 226:555-560.
- Romani S, Bacchiocca M, Rocculi P, Dalla Rosa M (2009) Influence of frying conditions on acrylamide content and other quality characteristics of French fries, *J Food Compos Anal* 22:582-588.

# **Metodiche di analisi di derivati della Cannabis ad uso alimentare, fitoterapico, farmaceutico ed industriale: messa a punto e validazione di metodi per il controllo di qualità e sviluppo di tecniche estrattive e preparative di derivati, secondo destinazione merceologica**

Matilde Tura (e-mail: matilde.tura2@unibo.it)

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

Corso di Dottorato: Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari

Tematica: Scienze e Biotecnologie degli Alimenti; Ciclo di dottorato: XXXIV; Anno di frequenza: I

Tutor: Tullia Gallina Toschi

## **1. Curriculum**

Matilde Tura è nata il 13/03/1994 a Bologna (BO). Ad Ottobre 2016 ha conseguito presso l'Università di Bologna la laurea triennale in Tecnologie Alimentari con votazione di 104/110, presentando una relazione finale dal titolo "*Studio preliminare delle caratteristiche compositive di un olio ottenuto da co-frangitura di olive e sottoprodotto del pomodoro*" (Relatrice: Dott.ssa Alessandra Bendini).

Ad Ottobre 2018 ha conseguito presso l'Università di Bologna la laurea magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari con votazione di 110/110 e lode, presentando una tesi dal titolo "*Determinazione degli etil esteri degli acidi grassi in oli di oliva vergini: messa a punto e validazione di un metodo HPLC-UV/GC-FID*" (Relatrice: Dott.ssa Alessandra Bendini), tale lavoro di tesi era inserito nel contesto del progetto europeo "OLEUM - Advanced solutions for assuring authenticity and quality of olive oil at global scale".

Da Novembre 2018 svolge il Dottorato di Ricerca presso l'Università di Bologna (XXXIV ciclo), con un progetto dedicato al tema di ricerca "*Metodiche di analisi di derivati della Cannabis ad uso alimentare, fitoterapico, farmaceutico ed industriale: messa a punto e validazione di metodi per il controllo di qualità e sviluppo di tecniche estrattive e preparative di derivati, secondo destinazione merceologica*" (Tutor: Prof.ssa Tullia Gallina Toschi).

## **2. Stato dell'arte**

Negli ultimi anni l'interesse riguardo alla canapa è aumentato, in quanto il quadro normativo italiano ha visto l'approvazione della legge n. 242 del 2 dicembre 2016 che sancisce la liceità della coltivazione della canapa industriale. In particolare, sono stati definiti i limiti quantitativi di tetraidrocannabinolo (THC) che permettono di differenziare la canapa da fibra (THC totale non superiore allo 0,2% sulla sostanza secca), che può essere coltivata senza necessità di autorizzazione, dalla canapa da droga (THC totale superiore allo 0,6% sulla sostanza secca), per la quale è previsto il sequestro della coltivazione. Per poter discriminare queste due categorie è, quindi, essenziale un'accurata determinazione quali-quantitativa del THC.

Nella canapa sono stati identificati più di 200 molecole tra cannabinoidi e terpeni, che rappresentano la seconda classe di composti bioattivi naturalmente presenti in questa pianta (Leghissa et al., 2018a). Risulta, quindi, ulteriormente importante la messa a punto di metodi che siano in grado di determinare il maggior numero di cannabinoidi e lo sviluppo di metodi che possano determinare i terpeni. Infatti, come conseguenza dell'aumentato sviluppo di preparazioni medicinali a base di cannabis, vi è anche una crescente domanda dello sviluppo di metodi qualitativi e quantitativi per l'analisi dei componenti bioattivi di questa pianta (Citti et al., 2018). Alcuni di essi, infatti, sono caratterizzati da azioni specifiche rilevanti e non psicoattive, per esempio il cannabidiolo (CBD) è dotato di attività antinfiammatoria (Burstein S, 2015).

La gascromatografia ha dimostrato una buona sensibilità nella determinazione dei cannabinoidi totali (neutri ed acidi) (Cardenia et al., 2018; Leghissa et al., 2018b), sebbene sia necessaria la derivatizzazione per poter quantificare correttamente i cannabinoidi acidi (Radwan et al., 2017). L'analisi mediante HPLC, invece, non richiede il passaggio della derivatizzazione ma presenta lo svantaggio di non avere sempre una risoluzione idonea all'identificazione dei diversi cannabinoidi (Radwan et al., 2017); sono state, infatti, effettuate valutazioni in relazione ai differenti rivelatori (Citti et al., 2018; Leghissa et al., 2018a). Per separare, identificare e quantificare i composti di interesse dal materiale vegetale ed ottenere un elevato recupero di questi componenti è, inoltre, fondamentale la tecnica estrattiva che viene applicata nella preparazione del campione (Brighenti et al., 2017).

Oltre allo sviluppo di metodi cromatografici robusti e sensibili in grado di analizzare questa matrice complessa, è necessario lo sviluppo di metodi efficienti per estrarre i composti principali e quelli presenti in tracce. La pianta di *Cannabis Sativa* L. è, infatti, caratterizzata dalla presenza di più di 500 composti differenti che la rendono una matrice molto complessa, considerando anche le molte varietà di specie ed i ceppi ibridati. Per questo motivo risulta ancora molto difficile la standardizzazione dei protocolli e la validazione di metodi ufficiali applicabili per quanto riguarda sia l'analisi che la produzione di estratti a partire da questa pianta; infatti, una delle principali problematiche nell'uso medico e farmaceutico della cannabis è proprio la mancanza di standardizzazione (Aizpurua-Olaizola et al., 2014).

### 3. Obiettivi e risultati attesi

Questo progetto di ricerca si propone:

- i) la messa a punto di almeno due protocolli analitici per la determinazione dei cannabinoidi, di cui uno rapido ed economico, applicabile a livello aziendale, ed uno che sia in grado di determinare la presenza di almeno 10 cannabinoli;
- ii) la messa a punto di tecniche preparative ed estrattive al fine di ottenere derivati differenti a seconda della destinazione merceologica, viste le potenzialità in campo fitoterapico, alimentare, farmaceutico, cosmetico ed industriale;
- iii) lo sviluppo di metodiche analitiche per l'identificazione e la quantificazione dei composti minoritari naturalmente presenti nella cannabis, in particolare la messa a punto di un metodo per la determinazione quali-quantitativa dei composti terpenici;
- iv) la validazione e avvio della procedura di certificazione di almeno un protocollo analitico per la determinazione dei cannabinoidi.

Il progetto di tesi di dottorato può essere suddiviso nelle seguenti attività, riepilogate nel diagramma di Gantt riportato in tabella 1:

#### A1) Ricerca bibliografica;

#### A2) Messa a punto di metodiche analitiche per la determinazione dei cannabinoidi;

A3) Messa a punto di metodiche preparative ed estrattive per la produzione di derivati, ad esempio l'estrazione a freddo di olio di semi di canapa e relativi studi di caratterizzazione e stabilità;

#### A4) Sviluppo di metodi analitici per la determinazione dei composti minoritari naturalmente presenti nella Cannabis Sativa L.;

#### A5) Scrittura e pubblicazione della tesi di dottorato, poster, articoli scientifici e presentazione orale

Tabella 1. Diagramma di Gantt dell'attività di ricerca del dottorato

Attività	Mese	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	
A1) <i>Ricerca bibliografica</i>		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A2) <i>Messa a punto di metodiche analitiche per la determinazione dei cannabinoidi</i>																				
1) Selezione dei campioni																				
2) Sviluppo di almeno due metodi per la determinazione dei cannabinoidi																				
3) Validazione ed avvio della procedura di certificazione di almeno un protocollo analitico																				
A3) <i>Messa a punto di metodiche preparative ed estrattive</i>																				
1) Selezione dei campioni																				
2) Messa a punto di metodiche preparative ed estrattive																				
A4) <i>Sviluppo di metodi analitici per la determinazione dei composti minoritari</i>																				
1) Selezione dei campioni																				
2) Messa a punto di un metodo per la determinazione dei terpeni																				
A5) <i>Preparazione della tesi e di articoli</i>																				

### 4. Bibliografia

- Aizpurua-Olaizola O, Omar J, Navarro P, Olivares M, Etxebarria N, Usobiaga A (2014) Identification and quantification of cannabinoids in Cannabis sativa L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 406(29): 7549-7560.
- Brighenti V, Pellati F, Steinbach M, Maran D, Benvenuti S (2017) Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type Cannabis sativa L.(hemp). *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 143: 228-236.
- Burstein S (2015) Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. *Bioorg. Med. Chem.* 23(7): 1377-1385.
- Cardenia V, Gallina-Toschi T, Scappini S, Rubino RC, Rodriguez-Estrada MT. Development and validation of a Fast gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of cannabinoids in Cannabis sativa L. *J Food Drug Anal* 2018; 26(4), 1283-1292.
- Citti C, Braghiroli D, Vandelli MA, Cannazza G (2018) Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: a critical review. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 147: 565-579.
- Legge 2 dicembre 2014 n.242. Disposizioni per la promozione della coltivazione e della filiera agroindustriale della canapa (16G00258), GU Serie Generale n. 304 del 30-12-2016.
- Leghissa A, Hildenbrand ZL, Schug KA (2018a) A review of methods for the chemical characterization of cannabis natural products. *J. Sep. Sci.*, 41(1): 398-415.
- Leghissa A, Hildenbrand ZL, Foss FW, Schug KA (2018b) Determination of cannabinoids from a surrogate hops matrix using multiple reaction monitoring gas chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, 41(2): 459-468.
- Radwan MM, Wanas AS, Chandra S, ElSohly MA (2017) Natural Cannabinoids of Cannabis and Methods of Analysis. in Cannabis sativa L.-Botany and Biotechnology, Springer, Cham, pp. 161-182.

**DOTTORANDI ISCRITTI AL II ANNO**  
**(XXXIII CICLO)**



## **Approcci strumentali e strategie analitiche a supporto della valutazione sensoriale degli oli vergini di oliva**

Enrico Casadei (e-mail: enrico.casadei15@unibo.it)

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, *Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna

Corso di Dottorato: Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari

Tematica: Scienze e Biotecnologie degli Alimenti; Ciclo di dottorato: XXXIII; Anno di frequenza: II

Tutor: Alessandra Bendini

### **1. Stato dell'arte**

Gli oli vergini di oliva (VOO) sono prodotti dai relativi frutti unicamente con procedimenti meccanici e fisici che non comportino alterazioni della sua composizione (Reg. CEE 2568/1991 e successive modifiche). Poiché sono vietati trattamenti di altra natura, tale prodotto risulta caratterizzato dalla presenza di numerosi composti minori (es. composti volatili e fenolici) responsabili del peculiare flavor. Le principali molecole volatili sono riconducibili alle vie biosintetiche della lipossigenasi (LOX), primaria e secondaria. L'attività degli enzimi della LOX si esplica, in particolare, durante le fasi di frangitura e gramolatura del processo di estrazione (Kalua et al., 2007). Tuttavia, insieme a queste molecole responsabili delle peculiari note positive (es. fruttato di oliva e sentori secondari), possono formarsi altri composti indesiderati responsabili dei principali difetti sensoriali. Qualora le olive siano danneggiate o conservate in maniera inadeguata prima della trasformazione, possono avvenire fermentazioni e degradazioni microbiche a carico di zuccheri ed aminoacidi con produzione di molecole la cui presenza è stata messa in relazione ai difetti di avvinato e riscaldamento. Il difetto di morchia è invece causato da fermentazione di residui proteici rimasti a contatto con l'olio dopo il suo ottenimento e quello di rancido dall'ossidazione degli acidi grassi (Kalua et al., 2007). In funzione dell'intensità del difetto percepito, un olio può essere declassato da extra vergine (ineccepibile) a vergine ed infine lampante. Un olio classificato come lampante non è commestibile come tale e deve essere necessariamente sottoposto a raffinazione. Ad oggi, la valutazione del difetto maggiormente percepito e della sua intensità deve essere condotta mediante analisi sensoriale, in accordo alla metodologia nota come Panel test (Reg. CE 640/2008) successivamente revisionata per rispondere ai criteri di affidabilità dei metodi analitici (COI T.28/Doc. No 1/Rev., 2018). È molto sentita la necessità di affiancare all'analisi sensoriale metodi di indagine strumentale che possano permettere di eseguire screening rapidi, aumentando il numero di campioni controllati e che siano in grado di supportare la valutazione sensoriale in caso di campioni "borderline", ovvero al limite tra due categorie merceologiche (Romero et al., 2015). Per questi motivi, l'analisi qualitativa e quantitativa del profilo in composti volatili presenti nello spazio di testa degli VOO, mediante tecniche come SPME-GC-MS e SPME-GC-FID (Aparicio-Ruiz et al., 2018), ha assunto grande importanza, così come lo sviluppo di un protocollo analitico sufficientemente semplice ed applicabile da parte dei laboratori pubblici e privati di controllo. A tal proposito, una nuova interessante tecnica è rappresentata dall'analisi HS-GC-IMS (Headspace-Gaschromatography-Ion Mobility Spectrometry), in grado di realizzare un fingerprint del profilo aromatico finalizzato ad una discriminazione dei campioni in funzione della categoria merceologica in modo relativamente semplice, rapido ed economico (Garrido-Delgado et al., 2015). Il GC-IMS è stato recentemente utilizzato per l'analisi dei composti volatili negli oli vergini di oliva, sia per determinarne la qualità che l'origine geografica (Garrido-Delgado et al., 2012; Gerhardt et al., 2017), dimostrando di essere una metodologia di screening promettente per supportare l'analisi sensoriale. Infine, appare indispensabile la messa a punto di formulazioni ad-hoc (materiali di riferimento) per riprodurre, partendo dalla miscelazione di molecole pure in quantità prefissata, i principali difetti percepiti sensorialmente. L'adozione di tali difetti standard (con intensità nota), facilmente riproducibili in laboratorio, sarebbe estremamente importante nell'ottica di incrementare le performance (riconoscimento del difetto e della sua intensità) degli assaggiatori facenti parte dei comitati di assaggio ufficiali e professionali.

### **2. Bibliografia**

- Aparicio-Ruiz R, García-González DL, Morales MT, Lobo-Prieto A, Romero I (2018) Comparison of two analytical methods validated for the determination of volatile compounds in virgin olive oil: GC-FID vs GC-MS. *Talanta*, 187: 133–141.
- Garrido-Delgado R, Arce L, Valcárcel M (2012) Multi-capillary column-ion mobility spectrometry: a potential screening system to differentiate virgin olive oils. *Anal Bioanal Chem*. 402: 489–498.
- Garrido-Delgado R, Dobao-Prieto M, Arce L, Valcárcel M (2015) Determination of volatile compounds by GC-IMS to assign the quality of virgin olive oil. *Food Chem*. 187: 72–79.
- Gerhardt N, Birkenmeier M, Sanders D, Rohn S, Weller P (2017) Resolution-optimized headspace gas chromatography-ion mobility spectrometry (HS-GC-IMS) for non-targeted olive oil profiling. *Anal Bioanal Chem* 409: 3933–3942.
- International Olive Oil Council T.28/Doc. No 1/Rev. 3 May 2018 "Guidelines for the accomplishment of the requirements of the norm ISO 17025 by the laboratories of sensory analysis of virgin olive oil".

- Kalua CM, Allen MS, Bedgood DR, Bishop AG, Prenzler PD, Robards K (2007) Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chem.* 100: 273–286.
- Regolamento (CE) n. 640/2008 della Commissione del 4 luglio 2008 che modifica il regolamento (CEE) n. 2568/91 relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi di analisi ad essi attinenti, *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, L 178: 11-16.
- Regolamento (CEE) n. 2568/91 della Commissione dell'1 luglio 1991 relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti, *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee*, L 248: 1-83.
- Romero I, García-González DL, Aparicio-Ruiz R, Morales MT (2015) Validation of SPME-GC-MS method for the analysis of virgin olive oil volatiles responsible for sensory defects. *Talanta* 134: 394-401.

### 3. Obiettivi

Il presente progetto di ricerca si propone di:

- i) sviluppare un approccio analitico adeguato all'identificazione e quantificazione di molecole volatili responsabili degli attributi sensoriali di oli vergini prodotti dalle olive, in grado di supportare il Panel Test;
- ii) validare protocolli analitici in accordo al punto i) al fine di renderli più rapidi, meno costosi e più sostenibili per l'ambiente rispetto a quelli esistenti e fruibili da parte di laboratori di controllo, nell'ottica di un loro inserimento tra i metodi ufficiali;
- iii) mettere a punto un metodo per l'analisi dei composti volatili mediante tecniche di screening (GC-IMS) che consenta una rapida discriminazione di campioni appartenenti a categorie merceologiche differenti;
- iv) formulare miscele di molecole pure in grado di riprodurre olfattivamente i principali attributi negativi (*off-flavours*) che possono caratterizzare, con intensità differenti, oli di oliva appartenenti alle categorie vergine e lampante.

Il progetto di tesi di dottorato può essere suddiviso nelle seguenti attività, riepilogate nel diagramma di Gantt riportato in Tabella 1:

#### A1) Ricerca bibliografica.

**A2) Analisi del profilo in composti volatili in oli vergini di oliva:** identificazione mediante SPME-GC-MS e quantificazione con SPME-GC-FID basata sulla costruzione di rette di calibrazione di molecole previamente selezionate (traccianti).

**A3) Validazione del protocollo analitico:** elaborazione statistica dei dati ottenuti con le tecniche del punto A2) e confronto dei risultati forniti da altri laboratori ed enti di ricerca, applicando lo stesso protocollo analitico sullo stesso set di oli.

**A4) Sviluppo di metodi rapidi (es. GC-IMS):** costruzione di un modello chemiometrico per discriminare oli vergini di oliva nelle diverse categorie merceologiche, in particolare campioni "extra vergini" vs "non extra vergini".

**A5) Formulazione di materiali di riferimento:** aggiunta, ad un olio di oliva raffinato, di molecole pure in concentrazione variabile, scelte in quanto correlate con i principali difetti sensoriali (es. avvinato e rancido) che possono essere presenti in oli di oliva vergini e lampanti.

**A6) Scrittura e pubblicazione della tesi di dottorato, poster, articoli scientifici e presentazione orale.**

Tabella 1. Diagramma di Gantt dell'attività di ricerca del dottorato

Attività	Mese	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
A1) <b>Ricerca bibliografica</b>		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A2) <b>Analisi del profilo in composti volatili in oli vergini di oliva</b>																			
Campionamento				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Analisi dei composti volatili				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Elaborazione dati				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A3) <b>Validazione del protocollo analitico</b>																			
Analisi dei campioni				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Elaborazione statistica				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A4) <b>Sviluppo di metodi rapidi (es. GC-IMS)</b>																			
Campionamento																			
Costruzione di un modello chemiometrico																			
A5) <b>Formulazione di materiali di riferimento</b>																			
Campionamento																			
Individuazione dei <i>markers</i> volatili (molecole pure)																			
Sviluppo di miscele standard																			
A6) <b>Preparazione della tesi e di poster e articoli scientifici</b>																			

### 4. Stato di avanzamento della ricerca e principali risultati

Il presente progetto di ricerca si propone di mettere in relazione i principali composti volatili presenti negli oli vergini di oliva con attributi sensoriali peculiari e di individuare e quantificare, attraverso la messa a punto di un metodo ad hoc, le molecole correlate con questi attributi. Questi composti sono utili per la formulazione di standard di riferimento

sensoriali che saranno utilizzati per migliorare l'attività dei panel, il cui lavoro rimane centrale per garantire la qualità del prodotto. A tale scopo, è stato analizzato il profilo in composti volatili di un primo set costituito da 60 campioni di oli vergini di oliva, previamente valutati sensorialmente da sei panel partner del progetto europeo H2020 OLEUM e da loro classificati come 12 extra vergini, 30 vergini e 18 lampanti. L'identificazione di tali molecole è stata realizzata mediante SPME-GC-MS e la quantificazione mediante SPME-GC-FID basata sulla costruzione di curve di calibrazione di composti standard scelti come traccianti. Successivamente, è stata effettuata un'elaborazione statistica dei dati su alcuni composti e campioni selezionati, conservando le informazioni pertinenti. Dai risultati ottenuti attraverso l'elaborazione Partial Least Square - Discriminant Analysis (PLS-DA) è stato messo in evidenza come il difetto sensoriale di riscaldamento fosse positivamente correlato con l'ottano e il 3-metil-1-butanol, la cui presenza è stata riscontrata in quasi tutti i campioni, oltre che con il butirrato di etile. Questo può essere spiegato dal fatto che i batteri dei generi *Clostridia* e *Pseudomonas* si sviluppano producendo aldeidi ramificate, alcoli ramificati ed i loro corrispondenti acidi ed esteri, come metaboliti derivanti dalla fermentazione degli zuccheri e dalla degradazione di alcuni amminoacidi. Per quanto riguarda il difetto di rancido, risultava positivamente correlato con la *E-2-epitenale*, l'acido esanoico e l'esanoale. Le alte concentrazioni di aldeidi sono per lo più prodotte dall'ossidazione degli acidi grassi insaturi, mentre la presenza di acidi è dovuta all'ossidazione delle aldeidi precedentemente formate. La presenza di acidi indica un alto livello di alterazione del campione di olio in quanto questi composti compaiono alla fine del processo ossidativo. L'analisi in corso di un secondo set di 60 campioni, fra i quali numerosi campioni difettati, consentirà di verificare le correlazioni ottenute finora. Gli stessi 60 oli del primo set sono stati analizzati anche attraverso tecnica HS-GC-IMS. I dati ottenuti dall'analisi, mediante metodo untargeted, sono stati elaborati per costruire modelli discriminatori sequenziali (PLS-DA): i primi due modelli per classificare i campioni in extra vergine vs non extra vergine (EVOO vs noEVOO) e lampante vs non-lampante (LOO vs noLOO); i secondi due modelli per classificare i noEVOO in vergini vs lampanti e non-lampanti in vergini vs extra vergini. I risultati più soddisfacenti si sono ottenuti per il modello EVOO vs noEVOO, ottenendo una completa classificazione (100%) dei campioni EVOO e del 75% per noEVOO. Parallelamente, è stato anche sviluppato un approccio targeted. A tale scopo, 18 composti volatili sono stati iniettati ed identificati come marker responsabili di specifici attributi sensoriali positivi e negativi; queste molecole sono state utilizzate per confrontare i campioni analizzati e per meglio comprendere i risultati della classificazione ottenuta dai modelli PLS-DA. Infine, è stata testata la performance del metodo in termini di ripetibilità intra-day/inter-day ed è stata valutata la linearità per una specifica molecola (esanoale). Gli sviluppi futuri di questo lavoro tramite tecnica HS-GC-IMS riguarderanno l'analisi del secondo set di 60 oli vergini di oliva utilizzato per l'SPME-GC-FID, al fine di ottenere un'elaborazione chemiometrica congiunta dei risultati ed elaborare un unico modello robusto. Inoltre, campioni reali di oli extra vergini, vergini e lampanti reperiti dal commercio, previamente valutati sensorialmente, potranno essere analizzati per confermare la capacità predittiva di tale modello, irrobustendo inoltre il dataset.

L'uso di materiali di riferimento nelle fasi di addestramento e allenamento del panel è assolutamente necessario affinché gli assaggiatori possano confrontare il loro giudizio con i "valori assegnati" dei materiali di riferimento e migliorare così le loro capacità individuali. La formulazione e l'applicazione pratica di materiali di riferimento artificiali potrebbe offrire numerosi vantaggi rispetto a quelli naturali (es. difetti COI) tra cui la disponibilità immediata e la riproducibilità nel tempo. In quest'ottica, due nuovi materiali di riferimento artificiali, per il riconoscimento olfattivo dei difetti di avvinato-inacetito e rancido, sono stati formulati per riprodurre nella maniera più fedele possibile tali difetti sensoriali, utilizzando miscele di molecole volatili considerate rilevanti per ciascun attributo sensoriale in specifiche concentrazioni. La selezione dei composti volatili è stata realizzata dopo uno studio approfondito dei profili in composti volatili di campioni caratterizzati dalla presenza di tali difetti sensoriali; inoltre, questi due materiali di riferimento artificiali sono stati testati dai sei panel mediante l'applicazione di un protocollo specifico di valutazione con lo scopo di determinare: a) la loro rappresentatività (rispetto ai campioni reali); b) la loro soglia di rilevabilità olfattiva; c) la loro conservazione nel tempo.

## 5. Elenco delle pubblicazioni prodotte nell'ambito dell'attività di dottorato

- Casadei E, Panni F, Valli E, Bendini A, Rossini C, Cevoli C, Garcia Gonzalez DL, Toschi TG (2018) Application of GC-IMS to discriminate virgin olive oils according to their sensory grades. 1st place poster session in 5<sup>th</sup> FoodIntegrity 2018 (Nantes, 14-15 November 2018).
- Casadei E, Panni F, Valli E, Bendini A, Gianelli M, Garcia Gonzalez DL, Toschi TG (2018) GC-IMS screening to cluster the sensory grades of virgin olive oils. pp. 271-271. In 16th Euro Fed Lipid Congress and Expo (Belfast, 16-19 September 2018). Book of Abstracts.
- Valli E, Garcia Gonzalez DL, Aparicio-Ruiz R, Casadei E, Barbieri S, Bendini A, Toschi TG (2018) Combined approaches for the sensory "targetization" of volatile compounds in virgin olive oils by SPME-GC-FID. pp. 52-52. In 16th Euro Fed Lipid Congress and Expo (Belfast, 16-19 September 2018). Book of Abstract.
- Toschi TG, Quintanilla Casas B, Tres A, Bustamante J, Guardiola F, García González DL, Aparicio-Ruiz R, Valli E, Barbieri S, Casadei E, Lacoste F, Bučar-Miklavčič M, Winkelmann O, Brkić Bubola K, Tibet U, Bendini A, Vichi S (2017) Towards an Olive Oil Volatile Compounds Identification and Quantification by SPME-GC-MS and Relation with Sensory Data: Preliminary Results of the OLEUM Project. pp. 143-145. In Book of abstract 5th MS Food Day (Bologna, 11-13 October 2017).

## Recovery of bioactive compounds from winemaking residues by membrane technology, and their application in the food industry

Jaime Alberto Arboleda Mejia (email: jaime.arboledamejia@unibo.it)

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, *Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna

Corso di Dottorato: Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari

Tematica: Scienze e Biotecnologie degli Alimenti; Ciclo di dottorato: XXXIII; Anno di frequenza: II

Tutor: Giuseppina P. Parpinello; Co-tutor: Andrea Versari

### 1. State-of-Art

The viticultural sector is one of the most widespread crop today with around 77 million tons of grapes produced in 2013 worldwide (FAOSTAT, 2013). Moreover, the 80% of whole grape is utilized for winemaking (Zhu, Du, Zheng, & Li, 2015) with a global production of around 27 billion liters of wine per year (Amienyo, Camilleri, & Azapagic, 2014): the leading world Countries are Italy (48.8 mhl), followed by France (41.9 mhl) and Spain (37.8 mhl).

The vinification process generate an approximate 20%-30% of residue, mainly grape pomace, the amount of which depends on the grape cultivation, pressing process and the different steps of fermentation (Dwyer, Hosseinian, & Rod, 2014; Laufenberg, Kunz, & Nystroem, 2003). For a long time the grape pomace has been landfilled due to the absence of application with economic benefits (García-Lomillo & González-SanJosé, 2017). It occurred despite every year a large amount of the wine industry wastes (5-9 millions tones) could have been exploited (Meyer, Jepsen, & Sørensen, 1998; Schieber, Stintzing, & Carle, 2001) also avoiding the environmental impact and the waste management issue (Fontana, Antonioli, & Bottini, 2013; Louli, Ragoussis, & Magoulas, 2004). In the wine process, the grape are crushed and pressed, sugars are metabolized and ethylic alcohol is produced; moreover during maceration the extraction of phenolic compounds take place. However, in the grape of both red and white grapes a significant amount of the bioactive compounds are retained (Arvanitoyannis, Ladas, & Mavromatis, 2006).

As sustainability has becoming a focal point in any production process, the resources are becoming more restricted and the demand for functional foods has been growing, the exploitation of bioactive compounds by means of green approaches (e.g. filtration) for food grade additive can be very useful as profitable options for the recovery of valuable compounds from winemaking process.

### 2. Bibliography

- Amienyo D, Camilleri C, Azapagic A (2014) Environmental impacts of consumption of Australian red wine in the UK. *J Clean Prod.* 72: 110–119.
- Arvanitoyannis IS, Ladas D, Mavromatis A (2006) Wine waste treatment methodology. *Int J Food Sci Technol.* 41: 1117-1151.
- Dwyer K, Hosseinian F, Rod M (2014). The Market Potential of Grape Waste Alternatives. *J Food Res.* 3: 91-106.
- Fontana AR, Antonioli A, Bottini R (2013) Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *J Agric Food Chem.* 61: 8987-9003.
- Garcia LJ, González ML (2017) Applications of Wine Pomace in the Food Industry: Approaches and Functions. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 16: 3-22.
- Laufenberg G, Kunz B, Nystroem M (2003) Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept;(B) practical implementations. *Bioresour Technol.* 87: 167-198.
- Louli V, Ragoussis N, Magoulas K (2004) Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. *Bioresour Technol.* 87: 167-198.
- Meyer AS, Jepsen SM, Sørensen NS (1998) Enzymatic Release of Antioxidants for Human Low-Density Lipoprotein from Grape Pomace. *J Agric Food Chem.* 47: 2439–2446.
- Schieber A, Stintzing F, Carle R (2001) By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments. *Trends Food Sci Technol.* 12: 401-413.
- Schieber A, Stintzing F, Carle R (2001) By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments. *Trends Food Sci Technol.* 12: 401-413.
- Zhu F, Du B, Zheng L, Li J (2015) Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. *Food Chem.* 186: 207-212.

### 3. Objectives

The general objective of this project is the valorization of wastes generated during the vinification process (pomaces, lees) with the aim of obtaining:

- i) Bioactive compounds that can be used in food processes and products beneficial to the human health;
- ii) The reduction of the environmental impact of the discarded products of wine sector.

In this view several approaches to extraction from vinification wastes will be used to avoid impact swapping; moreover their commercial utilization (encapsulation, vinification process) will be investigated.

Within the overall PhD objective mentioned above the activities planned can be grouped into the following groups according to the Gantt diagram given in Table 1:

#### A1) Survey of sample and Research

Literature review about latest researches related with the techniques of recovery of compounds, biocompounds available in wine residues and evaluation of methods of determination of bioactive compounds.

#### A2) Recovery of bioactive compounds by means of membrane processes.

1. Performance evaluation of several extraction techniques for the pre-treatment of waste samples (pomaces, lees).
2. Selection of the membrane, separation of the particles of greater diameter and determination of the conditions of extraction of the bioactive compounds from the residue of the winemaking process using the filtration system.
3. Characterize the residue of the winemaking process before and after filtration process (phenolic, sugars).

#### A3) Microencapsulation by spray drying

1. Establish the spray drying conditions of the compounds extracted from the residue of the winemaking process.
2. Characterize and evaluate the stability of microencapsulated bioactive compounds as possible food colorant with high added value.

#### A4) Digestion protocol

Simulation of the digestive process of the microencapsulated compounds to determine the bioavailability of the compounds. Simulation of mouth conditions, simulation of stomach conditions, simulation of small bowel conditions.

#### A5) Statistical evaluation of the data

Will be used a multifactorial optimization designs in order to establish the best working conditions. The yield of spray-drying process, total phenols index, percentage of phenolic compounds oxidations, powder mixture, water activity, solubility and hygroscopicity will be used as response variables in the optimization studies.

#### A6) Writing scientific paper and Preparation of thesis

At least three manuscripts on the topic of the PhD project will be prepared and submitted for publication into a high impact factor International Scientific Journal.

**Table 1. Gantt Chart for the research activities in scope of doctoral study**

Activities		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
A1)	<b>Survey of sample and Research</b>																		
	1) Literature review	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	2) Basic Experimental Design and Laboratory Training	■	■	■															
A2)	<b>Recovery of bioactive compounds by means of membrane processes</b>																		
	1) Performance evaluation of extraction techniques Selection, separation and determination of the condition of of the membrane process			■	■	■													
	2) Characterization of the residue of the winemaking process					■	■												
A3)	<b>Microencapsulation by spray drying</b>																		
	1) Establish the spray drying conditions							■	■	■	■	■	■						
	2) Characterize and evaluate the stability of microencapsulated									■	■	■	■	■					
A4)	<b>Digestion protocol</b>																		
	1) Simulation of mouth, stomach, small bowel conditions															■	■	■	■
	2) Availability testing experiments																■	■	■
A5)	<b>Statistical evaluation of the data</b>																		
	Statistical analysis											■	■	■	■	■	■	■	■
A6)	<b>Writing scientific paper and Preparation of thesis</b>																		
	Writing and publication of the doctoral thesis, posters, scientific articles and oral presentation	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

### 4. Progress of research and main results

In the first months of the doctorate program, a deep bibliographic search has been started about different types of extraction of bioactive compounds from the waste (grape pomace, wine lees) of the wine process.

Based on different studies found during the bibliographic search several preliminary tests of extraction of polyphenolic compounds have been carried out at different conditions.

1.

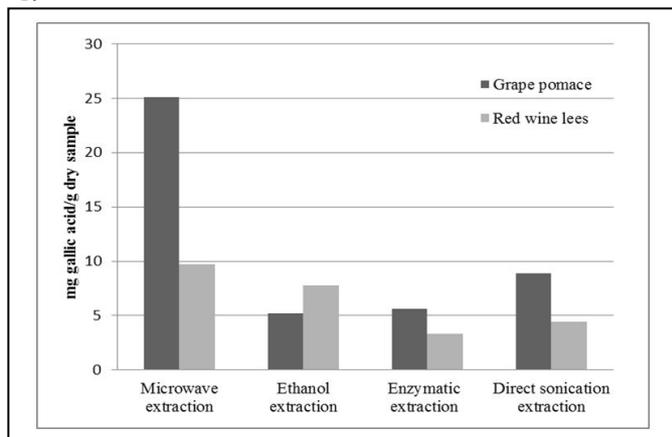


Figure 1. Extraction methods for polyphenols on grape pomace and red wine lees.

The selected extraction methods were based on one of the following techniques/solvent: microwave, ethanol, enzymatic and direct sonication.

Extraction in grape pomaces and wine lees were carried out at different experimental conditions (duration of the treatment, temperature, intensity of treatment, pH, solvent concentration) by means of experimental designs. The extraction that gave the best results in terms of phenolic compounds extracted (expressed as gallic per gram of pomace/lees) was the microwave obtaining 25.12 mg/g for the grape pomace and 9.7 mg/g for the red wine lees, respectively.

Following these results, the microwave assisted extraction was selected to carry out the bioactive compounds separation by means of membranes.

The membrane system used was an ultrafiltration membrane sequence of 0.15  $\mu\text{m}$  flat sheet dead end mode, where subsequently the permeate flow was passed through the three different flat sheet dead end nanofiltration membranes of a transmembrane cut of 1000 and 150-300 Da.

2.

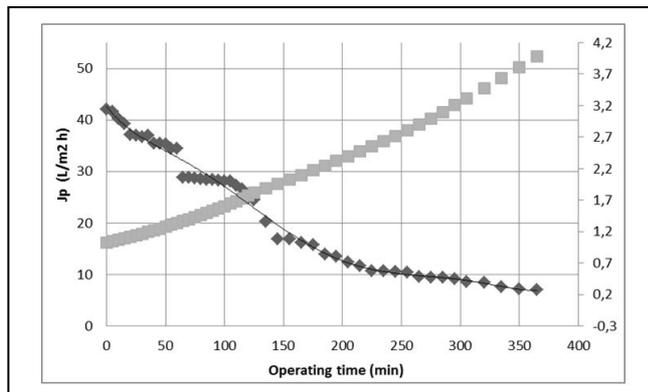


Figure 2. Behavior of the membrane ( $J_p$ ) on function on time on grape pomace extract

3.

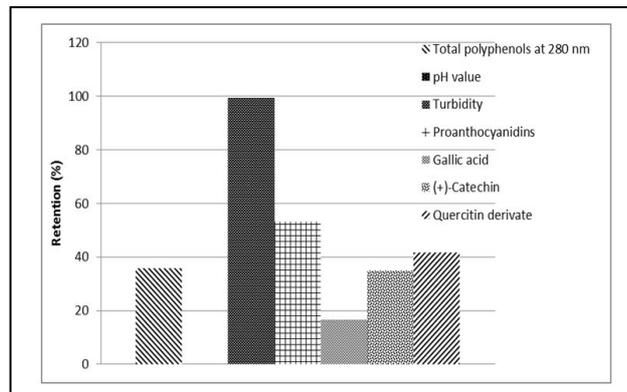


Figure 3. Rejection of the MF membrane towards specific compounds of red wine lees

The figure 2 shows the time evolution of permeate flux and the volume concentration factor (VCF) in the clarification of the grape pomace extract. The initial permeate flux was about 55.89  $\text{L}/\text{m}^2 \cdot \text{h} \cdot \text{bar}$  and decreased gradually up to reach a steady-state value close of 9.59  $\text{L}/\text{m}^2 \cdot \text{h} \cdot \text{bar}$ . The behavior of the permeate flow is characterized by a rapid decrease in the 265 minute of the operation, which represents a reduction of 82.85% in relation to the initial permeate flux. Subsequently, there was a slight decrease in the permeate flow at a VCF of 2.90. This behavior can be attributed to the different phenomena that occur during the operation, such as the concentration polarization and the different types of membrane fouling (partial or total blockage of the pore) and an increase in the concentration of solutes in the retentate stream. On the other hand, despite the membrane fouling index of 85.1%, the retention of phenolic compounds was 16.07, 35.19 and 35.90% for gallic acid, (+) - catechin and total phenolic compounds, respectively. This can be attributed to the large diameter of the membrane pore that allows the diffusion of low molecular weight compounds.

## 5. List of publications produced as part of the doctoral study

Arboleda JA, Parpinello GP, Versari A, Conidi C, Cassano A (2019) Microwave-assisted extraction and membrane-based separation of biophenols from red wine lees. Food Bioprod Process (Submitted).

**DOTTORANDI ISCRITTI AL III ANNO**  
**(XXXII CICLO)**



# **Study of the Chianti and Chianti Classico appellations: Evaluation of enological potential of Sangiovese and complementary varieties by a multiparametric approach**

Jelena Jeremic (email: jelena.jeremic4@unibo.it)

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, *Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna

Corso di Dottorato: Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari

Tematica: Scienze e Biotecnologie degli Alimenti; Ciclo di dottorato: XXXIII; Anno di frequenza: II

Tutor: Andrea Versari Co-tutor: Giusepina Paola Parpinello  
(dottorato industriale Ruffino)

## **1. The state of the art**

The ongoing climate change is expected to further impact the European viticulture in the future. The climate variables like air temperature, rainfall levels and distributions, humidity, winds, light intensity and cloud cover can affect the grape growing wine industry to large extent (Jackson and Lombard, 1963; Jones, 2007). In particular, the main effects of climate changes on the viticulture are the increasing sugar levels of grapes that leads to high alcohol in wine, the low acidity and the modification of varietal aromas (Jones, 2007; Mira de Orduña, 2010). The mean temperatures have a big impact on the length of the growing season for each variety, the grapevine physiology and the metabolism and fruit composition. Fraga et al. (2012) found that the higher night temperatures in combination with high diurnal temperatures during the grape maturation/ripening period could lead to lower tannins and anthocyanins formation that reduces the wine color and wine quality and it increases the volatilizations of aromas compounds. The annual precipitation is another critical factor of viticulture because the water stress can lead to small shoot growth, poor flower, cluster and berry development causing the decrease of grape yield and increased water demand due to the irrigation. On another hand, the excessive humidity during the early stages cause the denser canopies that leads to pests and disease problems requiring more intense plant protection and low wine quality (Fraga et al. 2012).

### **Wine typicity and wine quality parameters**

The typicity of wine is defined as the physico-chemical and sensory characteristics that are considered representative for the Protected Designation of Origin (PDO) related to a terroir. There are three main factors that are usually considered to assess the global wine typicity of a PDO wine: the standard profile (i.e., the basic physico-chemical characteristic), the cultivar profile (i.e. the sensory aromatic characteristics coming from the grapes), the style profile (i.e., the characteristics that result from the winemaking methods). The relation between chemical characteristics of grapes and the chemical and aromatic profile of wine could be revealed using multivariate analysis like Partial Least Squares (PLS) (Canuti et al. 2017).

The wine quality could be described in four notions: the excellence or superiority, the value, the conforming to specifications and meeting or exceeding customer expectations (Canuti et al. 2017). Well run taste-panels relied with the chemical analysis of wine would be an ideal wine quality evaluation model that can be defined by the following selected 'indicators' according to literature (Jackson and Lombard, 1963): soluble solids, organic acids, the pH, polyphenols and anthocyanins, amino acids and aromas.

## **2. Literature**

Canuti V, Picci M, Zanoni B, Fia G, Bertuccioli M (2017) A multivariate methodological approach to relate wine to characteristics of grape composition: The case of typicality. *Am J. Enol Vitic* 68, 1, 49–59.

Fraga H, Malheiro AC, Moutinho Pereira J, Santos JA (2012) An overview of climate change impacts on European viticulture. *Food Energy Secur*, 1, 2, 94–110.

Jackson D, Lombard P (1993) Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality – A review. *Am J Enol Vitic* 44, 4, 409–430.

Jones G (2007). Climate change: observations, projections and general implications for viticulture and wine production. <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/anais/cbve12/56-67.pdf>

Mira de Orduña R (2010) Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Res Int* 43, 7, 1844–1855.

## **3. Ph.D. Thesis Objectives and Milestones**

The overall aim of the PhD study is to exploit the enological potential of Sangiovese grape – and additional complementary grape varieties – for the valorization of Chianti red wine. In this view, the following interrelated tasks are planned alongside the entire production chain: (i) understanding the impact of the climate changes at local level to



- **The main chemical wine parameters** of Chianti, Chianti Superiore and Chianti Classico wines based on the FTIR instrument BACCHUS analysis, including the organoleptic wine characteristics coming from the wine tasting.
  - **Climate data** downloading from the meteorological station, also from available websites. The meteorological parameters such as temperature, rain falls, solar radiation and wind measurements are collecting now.
2. The trials dedicated to the wine protection against the oxidation are divided in two groups: the trials conducted in the wine cellar and the trial with the oenological tannins (used for the scientific article writing):
- **Cellar trials:** the inertisation of the wine container with nitrogen and its influence on the wine chemical parameters (Figure 1).

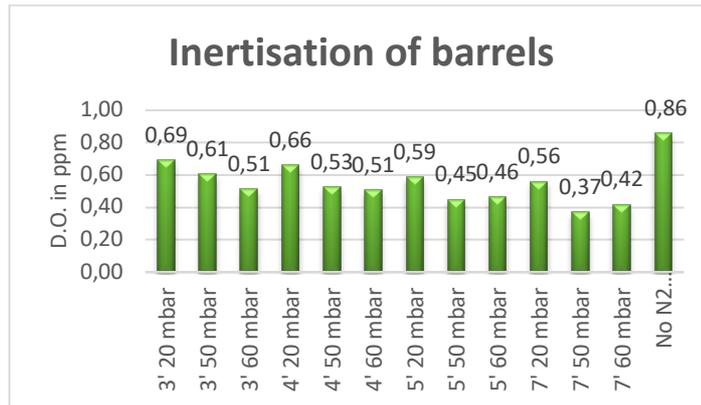


Figure 1: Barrel inertisation with nitrogen

## 5. The publication produced during the PhD activities

Writing of the first scientific paper about the antioxidative efficiency of oenological tannins is in progress. The trial is based on the measurements of oxygen consumption of four different oenological tannins added to the model wine solution and to Chianti red wine (Table 1). There are partial results of trial presented in the Figure 2.

Table 1: Tannin oxidative potential trial:

Sample code	Sample composition
MVse	Model wine solution + seed tannin 1 g/L
MVst	Model wine solution + skin tannin 1 g/L
MVet	Model wine solution + ellagitannins 1 g/L
MVgt	Model wine solution + gallotannins 1 g/L
CH	Chianti red wine (control)
CHse	Chianti red wine + seed tannin 0.1 g/L
CHst	Chianti red wine + skin tannin 0.1 g/L
CHet	Chianti red wine + ellagitannins 0.1 g/L
CHgt	Chianti red wine + gallotannins 0.1 g/L

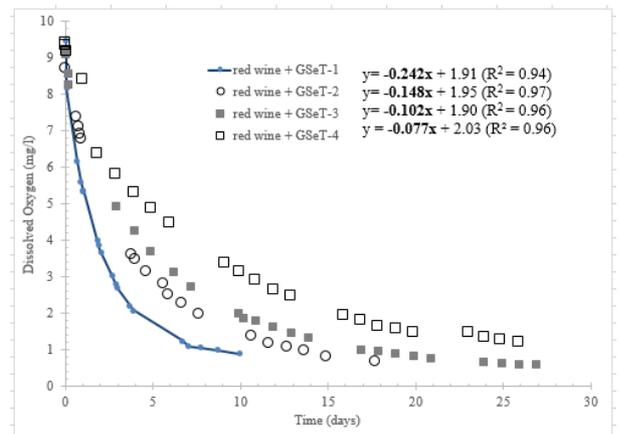


Figure 2: Oxygen consumption of grape seed tannin added to red wine over four O<sub>2</sub> saturations

## **Metabolismo *post mortem* e anomalie muscolari delle carni avicole**

Giulia Baldi (e-mail: giulia.baldi4@unibo.it)

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

Corso di Dottorato: Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari

Tematica: Scienze e Biotecnologie degli Alimenti; Ciclo di dottorato: XXXII; Anno di frequenza: III

Tutor: Massimiliano Petracci

### **1. Stato dell'arte**

La qualità della carne avicola è il risultato dei fenomeni fisici e biochimici che avvengono nel muscolo dopo la morte dell'animale. Tra questi, la modalità e l'entità dell'acidificazione del muscolo *post mortem* sono processi chiave nel definire la qualità finale della carne; il processo di acidificazione, infatti, influisce sulle proprietà funzionali delle proteine muscolari e, di conseguenza, su una grande varietà di attributi qualitativi, quali colore, capacità di ritenzione idrica, texture e *shelf-life* chimico-fisica e microbiologica (Petracci *et al.*, 2017). Il progresso genetico effettuato negli ultimi 30 anni, mirato all'ottenimento di genotipi a rapido accrescimento ed elevata resa dei muscoli pettorali, ha comportato delle modificazioni significative nel metabolismo muscolare. Da un punto di vista morfologico-funzionale, la selezione ha infatti determinato un'ipertrofia delle fibre muscolari e un profondo cambiamento delle loro caratteristiche strutturali, funzionali e metaboliche (Berri *et al.*, 2007). Il miglioramento genetico ha consentito un notevolissimo aumento delle rese di produzione, ma d'altra parte le carni ottenute dai tipi genetici moderni mostrano una maggiore suscettibilità a presentare anomalie muscolari, quali White Striping, Wooden Breast e Spaghetti Meat, che negli ultimi anni hanno raggiunto incidenze preoccupanti per l'industria avicola (Kuttappan *et al.*, 2017). L'anomalia White Striping è caratterizzata dalla comparsa di striature bianche sulla superficie del muscolo *Pectoralis major*, mentre l'anomalia Wooden Breast consiste nella manifestazione di aree pallide, indurite e rigonfie nella zona craniale e caudale dei petti di pollo (Sihvo *et al.*, 2014). Infine, l'anomalia Spaghetti Meat è caratterizzata dalla perdita di integrità muscolare a livello della zona craniale del petto (Petracci *et al.*, 2017). In generale, le carni affette da tali miopatie possono essere destinate al consumo umano in quanto non considerate pericolose per la salute dei consumatori. Tuttavia, in ragione della loro ridotta qualità nutrizionale e tecnologica e dell'aspetto visivo compromesso, vengono generalmente declassate e destinate alla trasformazione (macinati ed emulsionati), causando gravi perdite economiche per l'industria avicola. Nonostante le anomalie muscolari rappresentino un problema rilevante per l'industria della carne, al momento non sono ancora state individuate strategie efficaci per diminuirne l'entità e la gravità. Pertanto, appare sempre più evidente la necessità di sviluppare soluzioni che a lungo termine siano in grado di ridurre l'incidenza delle anomalie muscolari e di approfondire le conoscenze circa le implicazioni che esse hanno sulla qualità dei prodotti carnei.

### **2. Bibliografia**

- Berri C, Bihan-Duval L, Debut M, Santé-Lhoutellier V, Baéza E, Gigaud V, Jègo Y, Duclos MJ (2007) Consequence of muscle hypertrophy on characteristics of Pectoralis major muscle and breast meat quality of broiler chickens, *J Anim Sci* 85(8): 2005–2011.
- Kuttappan VA, Owens CM, Coon C, Hargis BM, Vazquez-Añon M. (2017) Incidence of broiler breast myopathies at 2 different ages and its impact on selected raw meat quality parameters, *Poult Sci* 96(8):3005–3009.
- Petracci M, Soglia F, Berri C (2017) Muscle metabolism and meat quality abnormalities. In Petracci M, Berri C (Eds) *Poultry quality evaluation: quality attributes and consumer values*, UK: Woodhead Publishing, pp 51-75.
- Sihvo HK, Immonen K, Puolanne E (2014) Myodegeneration with fibrosis and regeneration in the pectoralis major muscle of broilers, *Vet Pathol* 51:619–623.

### **3. Sviluppo della ricerca**

La ricerca ha previsto le seguenti principali attività, riepilogate anche nel diagramma di Gantt riportato in Tabella 1:

- A1) **Valutazione dell'impatto delle anomalie muscolari sulla qualità delle carni avicole**, attraverso l'analisi della composizione chimica e delle proprietà tecnologiche delle carni anomale. Approfondimento delle conoscenze esistenti attraverso l'utilizzo di metodologie avanzate, quali risonanza magnetica nucleare e calorimetria differenziale a scansione.
- A2) **Studio del metabolismo *post mortem* dei muscoli avicoli a diverso metabolismo energetico** in una prima fase attraverso lo studio del profilo di acidificazione *post mortem* e successivamente tramite l'analisi dei fattori in grado di influenzare i processi biochimici intra ed inter-specie.
- A3) **Studio del metabolismo *post mortem* di muscoli affetti da anomalia Wooden Breast** attraverso l'analisi dei principali metaboliti glicolitici al fine di valutare la presenza di eventuali disfunzioni metaboliche nei muscoli pettorali affetti da miopatie e successivamente mediante l'applicazione di un modello *in vitro* volto allo studio delle cinetiche di acidificazione muscolare *post mortem*. Determinazione della lunghezza dei sarcomeri dei muscoli oggetto di analisi al fine di correlare lo stato di contrazione miofibrillare con le informazioni relative al pattern di acidificazione muscolare.

**Tabella 1. Diagramma di Gantt dell'attività di ricerca del dottorato**

Attività	Mese	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	
<b>Ricerca bibliografica</b>		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<b>A1) Anomalie muscolari delle carni avicole</b>		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1) Anomalia White Striping nel tacchino		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1a) Composizione chimica		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1b) Proprietà tecnologiche		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2) Anomalie White Striping, Wooden Breast e Spaghetti Meat nel pollo		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2a) Composizione chimica		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2b) Proprietà tecnologiche		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2c) Quantificazione e livello di reticolazione del collagene		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2d) Proprietà rilassometriche		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2e) Proprietà strutturali e calorimetria a scansione differenziale		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<b>A2) Metabolismo post mortem dei muscoli avicoli</b>		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1) Caratterizzazione del profilo di acidificazione <i>post mortem</i>		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2) Analisi dei fattori di variazione fra muscoli a diverso metabolismo		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<b>A3) Metabolismo post mortem di muscoli affetti da anomalia Wooden Breast</b>		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1) Analisi dei metaboliti e degli enzimi glicolitici		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2) Studio dell'acidificazione muscolare <i>in vitro</i>		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
3) Valutazione del grado di contrazione miofibrillare		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<b>Preparazione della tesi, poster e articoli</b>		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

#### 4. Principali risultati

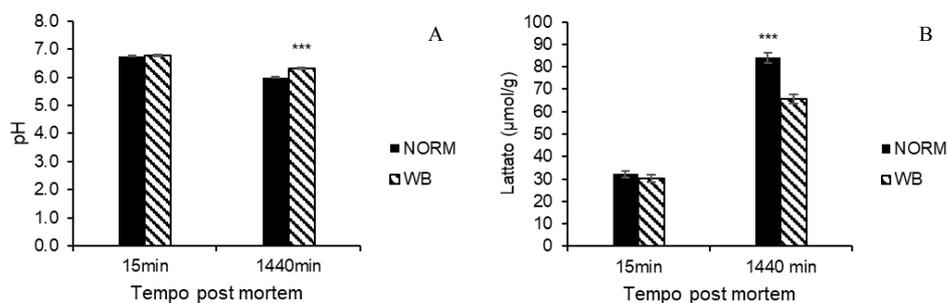
Per quanto concerne le attività di ricerca relative all'obiettivo A1.1, i risultati ottenuti hanno consentito di evidenziare che la presenza dell'anomalia White Striping (WS) comporta una limitata modificazione della composizione della carne di petto di tacchino, se confrontato con quanto precedentemente osservato nel pollo da carne. Difatti, non è stata evidenziata alcuna differenza nelle caratteristiche tecnologiche e nel tenore di umidità, collagene e proteine, mentre solo i campioni affetti in modo grave hanno presentato un maggiore tenore in grassi (1,38 vs. 1,04%), a discapito del contenuto delle ceneri (1,22 vs. 1,32%). La presenza dell'anomalia WS esercita un'influenza molto limitata sulle caratteristiche qualitative delle carni di tacchino, pertanto è ragionevole ipotizzare l'esistenza di una risposta fisiologica specie-specifica alle modificazioni a carico dello sviluppo muscolare indotte dalla selezione.

Successivamente sono stati svolti una serie di studi finalizzati a valutare simultaneamente l'effetto esplicito dalle miopatie WS, Wooden Breast (WB) e Spaghetti Meat (SM) sulle principali caratteristiche qualitative, sulla composizione chimica e sul profilo proteico delle carni di pollo anomale, tramite l'impiego di metodiche tradizionali ed innovative, quali risonanza magnetica nucleare e calorimetria differenziale a scansione (A1.2). Nel complesso, è stato evidenziato che la manifestazione delle anomalie WB e SM è associata ad un notevole aumento del tenore di umidità e ad una diminuzione del contenuto proteico, in particolar modo nella zona superficiale del muscolo dove la presenza di anomalie WS e WB è altresì associata ad un aumento del tenore di lipidi. L'analisi della forza di compressione al 40% ha mostrato profonde modificazioni in relazione alla presenza dell'anomalia WB a prescindere dalla posizione di campionamento e, analogamente, l'analisi calorimetrica differenziale ha consentito di identificare un significativo incremento dell'entalpia di denaturazione delle proteine dello stroma. Tali andamenti sono in accordo con i risultati riscontrati dall'analisi del collagene intramuscolare, che ha permesso di evidenziare che i campioni WB presentano quantità di tessuto connettivo significativamente superiori rispetto a tutti i gruppi sperimentali considerati ( $P < 0,001$ ). Infine, l'analisi dell'idrossilisipiridinolina ha evidenziato il ridotto grado di reticolazione del collagene dei muscoli affetti dall'anomalia SM.

Nell'ambito dell'obiettivo A.2, l'attività di ricerca ha avuto come scopo quello di valutare la cinetica di acidificazione di tre differenti muscoli del pollo da carne, caratterizzati da diverso metabolismo *in vivo* e composizione in fibre (petto: *Pectoralis major*; fuso: *Peroneus Longus*; sovracoscia: *Extensor iliotibialis lateralis*). Il muscolo pettorale, composto pressoché interamente da fibre di tipo glicolitico, ha presentato un'acidificazione di maggiore entità rispetto a quanto riscontrato nel fuso (pH ultimo=5,79 vs. 6,18;  $P < 0,001$ ), mentre il muscolo iliotibiale ha mostrato valori intermedi (5,99). Il petto, se paragonato al fuso, ha presentato una concentrazione notevolmente superiore di composti istidinici ad elevata capacità tampone (anserina e carnosina), in grado di agire come buffer nel muscolo al fine di mitigare un'eccessiva acidificazione. Difatti, il muscolo pettorale, in relazione allo spiccato metabolismo glicolitico, avrebbe dovuto presentare un'acidificazione *post mortem* più ampia rispetto ai muscoli della coscia. In aggiunta, il petto di pollo, se paragonato a carni di altre specie dotate di una simile composizione in fibre, ha esibito valori di pH ultimo più elevati: pertanto, l'elevato contenuto di composti istidinici potrebbe giustificare le differenze fra i valori di pH ultimo intra- ed inter-specie. Sono in corso, durante quest'ultimo anno di attività di dottorato, ulteriori studi finalizzati all'approfondimento delle conoscenze riguardanti il metabolismo *post mortem* dei muscoli avicoli, in particolar modo attraverso lo studio dei metaboliti glicolitici durante l'acidificazione muscolare e l'analisi dei fattori in grado di influenzare i processi biochimici che avvengono nei muscoli caratterizzati da un diverso metabolismo energetico *in vivo*.

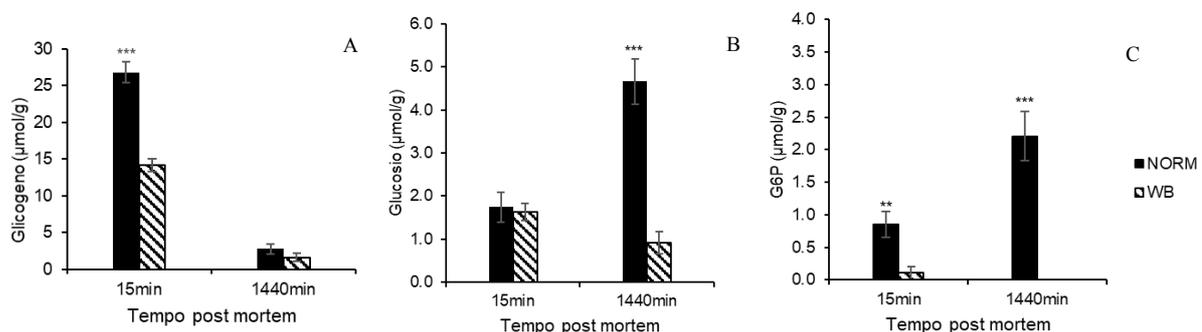
Le attività riguardanti il punto A.3 sono state svolte nell'ambito del periodo di ricerca al Virginia Polytechnic Institute and State University di Blacksburg (Virginia, USA), dove è stato possibile studiare il metabolismo *post mortem* dei muscoli pettorali del pollo da carne affetti da anomalia WB. Dal momento che i muscoli miopatici generalmente presentano elevati valori di pH ultimo, è stato ipotizzato, anche sulla base dei precedenti studi, che l'insorgenza dell'anomalia WB sia associata a dei cambiamenti nel metabolismo energetico del muscolo. Pertanto, questa ricerca ha avuto lo scopo di esaminare gli intermedi glicolitici e il metabolismo muscolare *post mortem* in muscoli affetti o meno dall'anomalia WB. Come atteso, i petti appartenenti al gruppo WB hanno mostrato un pH ultimo significativamente superiore rispetto a quelli non affetti (NORM) (6,31 vs 6,0, rispettivamente;  $P < 0,001$ ) (Figura 1A), mentre a 15 minuti *post mortem* non è stata riscontrata nessuna differenza significativa. Il tenore di lattato ha presentato un trend analogo ed è pertanto risultato significativamente inferiore a 1440 minuti *post mortem* nel gruppo WB (Figura 1B;  $P < 0,001$ ). Successivamente è stata valutata la capacità tampone dei muscoli oggetto di analisi, ossia la loro capacità di opporsi ad una variazione di pH in seguito all'aggiunta di idrossido di sodio. La capacità tampone è risultata essere significativamente inferiore nei muscoli anomali ( $P < 0,001$ ), presumibilmente in relazione alla diminuzione del contenuto di composti istidinici (es. anserina e carnosina) in grado di agire come buffer naturali nel muscolo e contrastare repentine variazioni di pH.

Figura 1. Valori medi di pH (A) e lattato ( $\mu\text{mol/g}$ ) (B) a 15 e 1440 min *post mortem* dei muscoli *P. major* affetti (WB) e non affetti (NORM) dall'anomalia Wooden Breast ( $n=12/\text{gruppo}$ ). I valori sono espressi come media  $\pm$  SEM. \*\*\*=  $P < 0,001$ .



In Figura 2 sono riportati i risultati relativi ai principali metaboliti glicolitici (glicogeno (A), glucosio (B) e glucosio-6-fosfato (G6P; C),  $\mu\text{mol/g}$ ) esaminati a 15 e 1440 minuti *post mortem*. In virtù delle ridotte quantità di lattato (Figura 1B), glicogeno, glucosio e G6P riscontrate a 15 minuti dopo la morte, i muscoli appartenenti al gruppo WB hanno mostrato un potenziale glicolitico significativamente inferiore (62,2 vs. 87,9  $\mu\text{mol}$  di lattato/g;  $P < 0,001$ ) rispetto al gruppo NORM, supportando l'elevato pH ultimo riscontrato tra i petti anomali. Inoltre, le quantità residue di glicogeno muscolare riscontrate a 24h *post mortem* hanno evidenziato che l'acidificazione nei campioni affetti da anomalia WB non si arresta prematuramente a causa della mancanza di substrati energetici.

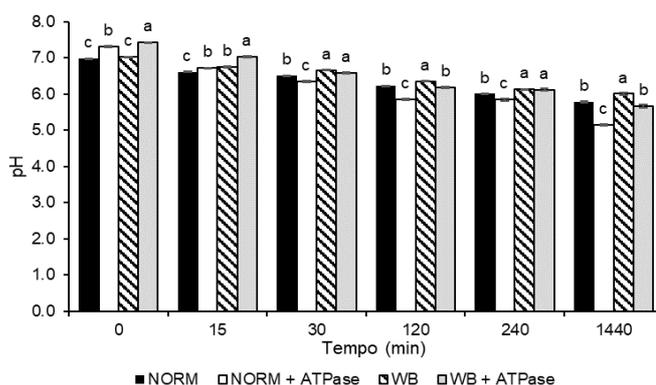
Figura 2. Valori medi di glicogeno (A), glucosio (B) e G6P (C) ( $\mu\text{mol/g}$ ) a 15 e 1440 min *post mortem* dei muscoli *P. major* affetti (WB) e non affetti (NORM) dall'anomalia Wooden Breast ( $n=12/\text{gruppo}$ ). I valori sono espressi come media  $\pm$  SEM. \*\*\*=  $P < 0,001$ ; \*\*=  $P < 0,01$ .



In presenza di glicogeno residuo, il pH ultimo della carne è generalmente determinato dall'attività della fosfofruttochinasi (PFK), enzima glicolitico che catalizza la trasformazione del fruttosio-6-fosfato in fruttosio 1,6-difosfato. La sua attività, strettamente dipendente dal pH e regolata dalle quantità di adenonucleotidi presenti a livello muscolare, non è però risultata essere modificata dalla presenza dell'anomalia WB. Pertanto, tale risultato suggerisce che in questo contesto l'enzima PFK non può essere considerato un fattore limitante nel metabolismo glicolitico dei petti miopatici. Tuttavia, è comunemente riconosciuto come la glicolisi *post mortem* sia regolata dall'attività delle ATPasi muscolari, enzimi che catalizzano svariate reazioni metaboliche grazie all'energia ricavata dall'idrolisi di ATP in ADP e fosfato. Le ATPasi miofibrillari (es. miosina) regolano il flusso glicolitico e la loro attività è direttamente o indirettamente controllata dai livelli cellulari di ADP. Considerando la struttura muscolare severamente compromessa dei petti affetti da

WB, unitamente alle gravi lesioni istopatologiche associate all'anomalia, è stato ipotizzato che l'elevato pH ultimo riscontrato possa essere dovuto ad una ridotta presenza e/o ad un eventuale disfunzione delle ATPasi muscolari. A tale proposito, utilizzando un modello *in vitro* in grado di riprodurre le condizioni fisiologiche che si verificano nel muscolo durante il periodo *post mortem*, è stato possibile valutare la dinamica di acidificazione muscolare in presenza o meno di un eccesso di ATPasi nel buffer di reazione. Come si evince dal grafico riportato in Figura 3, l'aggiunta di 2 U/ml di ATPasi ha avuto un effetto significativo sul declino del pH *post mortem* dei muscoli considerati. Infatti, a 1440 minuti *post mortem*, i petti WB in presenza di un eccesso di ATPasi hanno presentato valori di pH paragonabili a quelli del gruppo NORM, mentre il gruppo WB ha coerentemente mostrato valori di pH ultimo significativamente superiori rispetto a quello con ATPasi (6,01 vs 5,67;  $P < 0,05$ ). Pertanto, è possibile ipotizzare che una riduzione e/o un malfunzionamento nelle ATPasi muscolari dei campioni affetti da WB possa essere verosimilmente responsabile della cessazione prematura della glicolisi *post mortem* e quindi del raggiungimento di un pH ultimo più elevato.

**Figura 3. Valori medi di pH dei muscoli *P. major* affetti (WB) e non affetti (NORM) dall'anomalia Wooden Breast (n=6/gruppo) registrati nel modello di acidificazione *in vitro* a 0, 5, 30, 120, 240 e 1440 minuti *post mortem*. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. a-c: valori medi accompagnati da lettere diverse differiscono significativamente nell'ambito dello stesso tempo di campionamento ( $P < 0,05$ ).**



Infine, dal momento che l'entità e la velocità di acidificazione muscolare *post mortem* sono in grado di influenzare il grado di contrazione miofibrillare, è stato valutato se l'estrema rigidità muscolare tipica dei petti affetti da WB potesse essere parzialmente causata da un'iper-contrazione dei sarcomeri dovuta ad un'irregolare acidificazione muscolare *post mortem*. A tal proposito, tramite un microscopio ottico dotato di un obiettivo 100x, è stata valutata la lunghezza dei sarcomeri in campioni prelevati dalla porzione craniale dei muscoli *P. major* affetti o meno dall'anomalia WB. Al contrario di quanto ipotizzato, la lunghezza dei sarcomeri dei muscoli appartenenti al gruppo WB è risultata significativamente superiore se paragonata al gruppo NORM (1,87 vs 1,66  $\mu\text{m}$ ;  $P < 0,001$ ). Pertanto, la durezza dei muscoli pettorali affetti dall'anomalia WB non sembra essere correlata allo stato contrattile delle miofibrille, ma piuttosto alla considerevole deposizione di collagene, come riscontrato anche nell'ambito dello studio A1.2.

## 5. Elenco delle pubblicazioni prodotte nell'ambito dell'attività di dottorato

### Articoli pubblicati su riviste:

- Baldi G, Soglia F, Laghi L, Tappi S, Rocculi P, Tavaniello S, Prioriello D, Mucci R, Maiorano G, & Petracci M. (2019) Comparison of quality traits among breast meat affected by current muscle abnormalities, *Food Res Int* 115:369-376.
- Baldi G, Soglia F, Mazzoni M, Sirri F, Canonico L, Babini E, Laghi L, Cavani C, Petracci M (2018) Implications of white striping and spaghetti meat abnormalities on meat quality and histological features in broilers, *Animal* 12(1):164-173.
- Petracci M, Soglia F, Baldi G, Balzani L, Mudalal S, Cavani C (2018) Technical note: estimation of real rabbit meat consumption in Italy, *World Rabbit Sci* 26(1):91-96.
- Soglia F, Baldi G, Laghi L, Mudalal S, Cavani C, Petracci M (2018) Effect of white striping on turkey breast meat quality, *Animal* 12(10):2198-2204.

### Atti di convegno:

- Baldi G, Soglia F, Mazzoni M, Laghi L, Mudalal S, Cavani C, Petracci M (2018) *Post mortem* acidification pattern in chicken breast and leg muscles, 5<sup>th</sup> International Conference on Foodomics, pp. 48.
- Soglia F, Baldi G, Laghi L, Cavani C, Petracci M (2018) The effect of emerging muscular abnormalities on proximate composition and NMR relaxation properties of chicken breast meat, 5<sup>th</sup> International Conference on Foodomics, pp. 97.
- Petracci M, Baldi G, Soglia F, Mazzoni M, Sirri F, Canonico L, Babini E, Cavani C (2017) Effect of spaghetti meat abnormality on quality and histological traits of broiler breast fillets, *Ital J Anim Sci* 16:83.
- Baldi G, Soglia F, Laghi L, Cavani C, Petracci M (2017) A comparison of water distribution and protein oxidation between poultry and rabbit meat, *Ital J Anim Sci* 16:185-186.

## Condizioni di stress e metabolismo del *Lactobacillus sakei*: impatto sulle caratteristiche dei prodotti fermentati

Michael Magnani (e-mail: michael.magnani2@unibo.it)

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

Corso di Dottorato: Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari

Tematica: Scienze e Biotecnologie degli Alimenti; Ciclo di dottorato: XXXII; Anno di frequenza: III

Tutor: Fausto Gardini

### 1. Stato dell'arte

*Lactobacillus sakei* è un batterio lattico Gram-positivo appartenente al phylum Firmicutes ed è associato a prodotti a base di carne come componente del microbiota responsabile della fermentazione spontanea (McLeod et al., 2008). L'attività principale dei batteri lattici (LAB) nei processi di fermentazione è l'acidificazione della matrice che si traduce in una rapida conversione degli zuccheri fermentescibili principalmente in acido lattico. È stato ottenuto il sequenziamento completo del genoma di *L. sakei* (Chaillou et al., 2005) che ha confermato che questa specie è altamente specializzata per una specifica nicchia ecologica (carne) come dimostrato dalla sua auxotrofia per 18 aminoacidi (solo il glutammato e l'aspartato possono essere sintetizzati ex novo). Poiché questo microorganismo è comunemente isolato da salami fermentati spontaneamente, viene spesso usato come coltura starter nella produzione industriale di salumi fermentati. Il suo ruolo nella fermentazione riguarda in primo luogo l'acidificazione che è essenziale per il raggiungimento delle caratteristiche qualitative ed igienico-sanitarie. Grazie all'abbassamento del pH e alla presenza di specifici acidi organici che ostacolano la crescita di patogeni e/o agenti degradativi, aumenta la sicurezza alimentare e la shelf-life dei salumi. Nei prodotti a base di carne, i carboidrati fermentescibili a sei atomi di carbonio vengono consumati in pochi giorni mentre le operazioni di maturazione possono continuare per tempi molto più lunghi. Durante questo periodo, *L. sakei* rimane la componente dominante del microbiota. Pertanto, a seguito del consumo dei carboidrati, il metabolismo di *L. sakei* viene reindirizzato ad attività "secondarie" che influenzano le caratteristiche del prodotto. Negli alimenti fermentati, la formazione di molecole appartenenti a diverse classi chimiche quali alcoli, aldeidi, chetoni, acidi grassi, esteri e composti di zolfo, è essenziale per la formazione del profilo aromatico del prodotto e la sua riconoscibilità. L'origine di questi composti può essere molto diversa e in ogni caso attribuibile alla trasformazione biochimica di carboidrati, proteine e lipidi. Molte delle attività metaboliche che portano alla produzione di composti aromatici nei LAB richiedono complessi percorsi metabolici piuttosto che singoli enzimi. Nel caso di *L. sakei*, le attività principali riguardano il metabolismo degli aminoacidi e il metabolismo dei prodotti derivanti dai carboidrati. Questi metabolismi alternativi consentono di produrre energia e quindi permettono la sopravvivenza di *L. sakei* anche in ambienti caratterizzati da condizioni ambientali e nutrizionali avverse. L'acido lattico, prodotto in seguito ai metabolismi primari, può anche essere substrato per altre vie metaboliche in grado di fornire energia alle cellule e che possono portare alla produzione di composti aromatici. La variabilità con cui queste vie metaboliche sono presenti nella specie *L. sakei* e l'espressione di geni correlati che può essere ugualmente variabile, rendono necessario intraprendere un lavoro di ricerca approfondito per individuare alcuni ceppi di *L. sakei* e studiarne i meccanismi che regolano la sua attività metabolica. Queste diverse attività metaboliche possono essere sfruttate per ottenere prodotti fermentati innovativi o per conferire connotazioni aromatiche differenti da quelle tradizionali. Infatti, la modifica di parametri chimico-fisici come la temperatura di fermentazione, il pH, la composizione dei nutrienti, la concentrazione di sale e l'osmolarità possono influenzare le performance metaboliche (Smid e Kleerebezem, 2014). Allo stesso tempo, la biodiversità dei prodotti fermentati spontaneamente derivanti da diverse parti del mondo continua ad essere un serbatoio da cui attingere per isolare e caratterizzare nuovi ceppi con specifiche attività enzimatiche coinvolte nella formazione del flavour.

### 2. Bibliografia

- Smid EJ, Kleerebezem M (2014) Production of aroma compounds in lactic fermentations, *Annu. Rev. Food. Sci. Technol.* 5: 313-326.
- Chaillou S, Champomier-Verge's MC, Cornet M, Le Coq AMC, Dudez AM, Martin V, Beaufils S, Darbon-Rongère E, Bossy R, Loux V, Zagore M (2005) The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K, *Nat. Biotechnol.* 23: 1527-1533.
- McLeod A, Nyquistb ON, Snipenb L, Naterstada K, Axelsson L (2008) Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods, *Syst. Appl. microbial* 31: 393-403.

### 3. Sviluppo della ricerca

La ricerca è stata sviluppata secondo i seguenti punti principali:

- 1) Ricerca bibliografica ed identificazione di ceppi di *Lactobacillus sakei* isolati da diverse matrici: scelta di ceppi di

- interesse appartenenti alla specie *Lactobacillus sakei*.
- 2) Screening su diversi ceppi di *L. sakei*: screening di ceppi di *L. sakei* su terreni e valutazione delle curve di acidificazione e di crescita, in relazione fattori quali temperatura, sale.
  - 3) Metabolismo in carenza nutrizionale: selezione dei ceppi dotati delle migliori caratteristiche e valutazione del profilo aromatico, della produzione di acidi e del contenuto di amino acidi, in condizioni di carenza nutrizionale.
  - 4) Prove in tampone con cellule vive: produzione di acidi, amine biogene, metaboliti volatili.
  - 5) Prove in sistema reale: valutazione dell'inoculo di colture selezionate in prodotti fermentati su scala pilota.

**Tabella 1. Diagramma di Gantt dell'attività di ricerca del dottorato**

Attività	Mese	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	
A1) <i>Ricerca bibliografica</i>																				
A2) <i>Screening su diversi ceppi di Lactobacillus sakei</i>																				
A3) <i>Metabolismo in carenza nutrizionale</i>																				
1) Selezione dei ceppi dotati delle migliori caratteristiche																				
2) Studio di vie metaboliche alternative (zuccheri pentosi, arginina)																				
A4) <i>Prove in tampone con cellule vive</i>																				
1) Valutazione delle cinetiche di fermentazione																				
2) Valutazione della produzione di metaboliti volatili ed acidi organici																				
A5) <i>Prove in sistema reale</i>																				
1) Valutazione delle cinetiche di fermentazione in prodotti fermentati su scale pilota (es. salami)																				
2) Valutazione dell'impatto di tali colture sulle caratteristiche del prodotto finito (molecole volatili tramite SPME-GC-MS, acidi organici tramite HPLC)																				
3) Valutazione dell'impatto di tali colture sulla sicurezza e shelf-life del prodotto finito (molecole ad attività antagonista es. batteriocine)																				
A6) <i>Preparazione della tesi e di articoli</i>																				

#### 4. Principali risultati

*Lactobacillus sakei* è un LAB caratterizzato da un metabolismo omofermentativo in presenza di zuccheri esosi e da un metabolismo eterofermentativo in presenza di zuccheri pentosi. Un aspetto di grande rilevanza è la sua capacità di sopravvivere anche quando le fonti di zuccheri esosi sono esaurite, ricavando quindi energia da fonti alternative quali zuccheri pentosi (ribosio) ed aminoacidi, tra cui l'arginina, tramite la via dell'arginina deiminasi (ADI).

Nella prima fase del lavoro di Dottorato è stata messa in luce la variabilità fisiologica che ceppi di questa specie mostrano quando posti in condizioni di stress nutrizionale o quando il loro metabolismo primario sia stato indirizzato verso la via omolattica o eterolattica. In particolare, è stato studiato in modo approfondito il ruolo che gli aminoacidi possono avere sul sostentamento energetico delle cellule.

Sulla base dei risultati ottenuti, si è deciso di valutare l'effetto di due diversi fonti di zucchero (ribosio e glucosio), a due diverse concentrazioni di utilizzo, sulle performance di crescita e la risposta fisiologica di un ceppo di *L. sakei* (Chr 82) utilizzato a livello commerciale per la produzione di salami. I campioni, denominati 25 G (4,5 g/L di glucosio), 2.5 G (0,45 g/L di glucosio), 25 R (3.75 g/L di ribosio) e 2.5 R (0,375 g/L di ribosio) sono stati analizzati a tempi definiti nell'arco di 8 giorni per valutare la capacità di crescita e di acidificazione nel mezzo, il consumo di aminoacidi (addizionati nel terreno sintetico a concentrazioni note) e la produzione di acidi organici, per individuare eventuali shift metabolici.

Inoltre, i campioni sono stati analizzati anche mediante citometria di flusso: questa tecnica coltura-indipendente

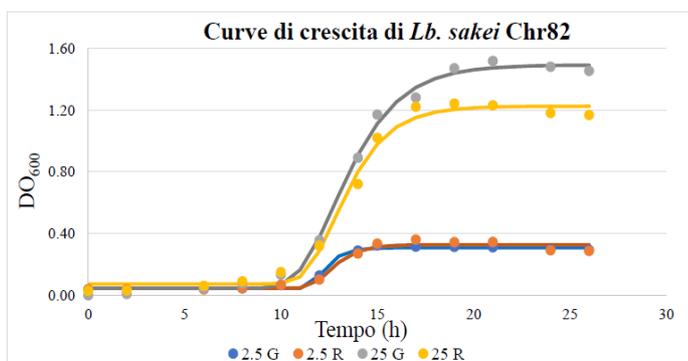


Figura 1: Curve di crescita ottenute a seguito dell'incubazione di *L. sakei* Chr82 a 30°C nelle diverse condizioni

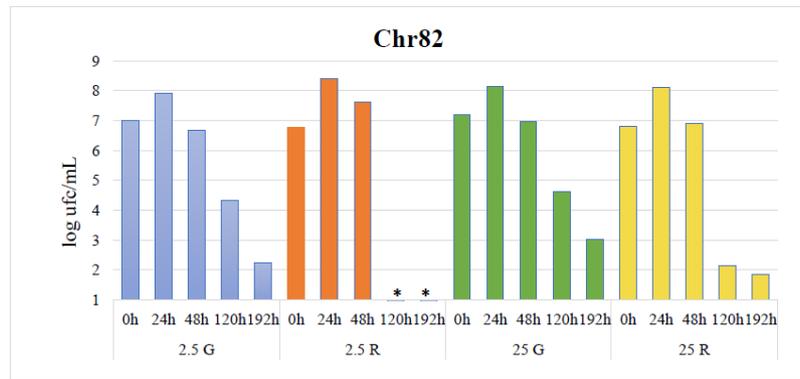
permette di ottenere informazioni a livello di singola cellula mediante l'utilizzo di specifici fluorocromi, correlati a diverse attività metaboliche o stati fisiologici della cellula. In particolare, state valutate:

- la vitalità cellulare, discriminando con una doppia marcatura tre sub-popolazioni, ossia cellule vive, danneggiate o morte,
- lo stato delle membrane cellulari, in termini di permeabilità/integrità e depolarizzazione.

Nella prima fase del lavoro la crescita del ceppo di *L. sakei* è stata monitorata attraverso la valutazione della densità ottica a 600 nm (DO<sub>600</sub>). I dati sperimentali sono stati modellati con l'equazione di Gompertz, come modificata da Zwietering et al. nel 1990. I modelli ottenuti, insieme ai punti

sperimentali, sono riportati in Figura 1.

L'uso di diverse concentrazioni dei due zuccheri non determina effetti particolarmente significativi sulla durata della fase lag, che per altro risulta essere, come atteso, leggermente più ridotta in presenza delle concentrazioni maggiori di zucchero (25 mM) ed in particolare in presenza di glucosio come zucchero fermentescibile (25 G). Gli effetti più evidenti sono stati evidenziati ovviamente sul valore di A, cioè la massima densità ottica raggiungibile, dove si osserva un valore superiore a 1 in presenza di 25 mM di zucchero ed inferiore a 0.3 quando presente a concentrazioni di 2.5 mM. A parità di condizioni, nel campione 25 G si osserva un valore significativamente più elevato (1.446) rispetto al campione contenente ribosio alla stessa concentrazione (25 R), caratterizzato da un valore di 1.151. La concentrazione di zuccheri influenza marcatamente anche la velocità massima di crescita in fase esponenziale ( $\mu_{max}$ ), che risulta circa dimezzata nei campioni 2.5 R e 2.5 G. A parità di concentrazione, la presenza di glucosio determina valori di  $\mu_{max}$  sempre maggiori. A fronte di questi valori di densità ottica, le concentrazioni di cellule espresse come log ufc/ml dopo 24, 48, 120 e 192 ore sono riportate in Figura 2. Come si può osservare, a parità di condizione, dopo 24 ore i conteggi sono tutti nell'ordine di 8 log ufc/mL. Da qui in avanti il decremento del carico cellulare segue cinetiche diverse a seconda dello zucchero aggiunto. Infatti, in presenza di ribosio, dopo 120 e 192 ore, si assiste ad una più rapida diminuzione della concentrazione di cellule coltivabili in piastra: in particolare, nel campione 2.5 R i conteggi sono inferiori al limite di determinazione del metodo (1 log ufc/mL). Anche il campione 25 R è caratterizzato da conteggi ridotti (circa 2 log ufc/mL) nei campioni incubati per almeno 120 ore, mentre la presenza di glucosio sembra garantire una sopravvivenza maggiore. Contestualmente sono stati determinati gli acidi organici presenti nel mezzo di coltura (Tabella 2). Gli acidi organici riscontrati sono stati l'acido lattico e l'acido acetico. Per la quantificazione di quest'ultimo è stato necessario valutare la differenza tra la concentrazione rilevata ai diversi tempi con quella aggiunta nel terreno sintetico (TS) sotto forma di acetato di sodio ( $\Delta$  Acetico). Come atteso, la presenza di acido lattico e acido acetico è fortemente dipendente dal tipo di zucchero aggiunto ed in particolare è decisamente maggiore, indipendentemente dalla concentrazione, laddove è presente glucosio. Inoltre, le quantità massime di acido lattico sono raggiunte nei campioni dopo 48 ore, in tutti i casi. Nei campioni con glucosio



\* al di sotto del limite di determinazione

Figura 2: Carico cellulare espresso in log ufc/ml a seguito dell'incubazione di *L. sakei* Chr82 a 30°C in diverse condizioni

La presenza di acido acetico è spiegabile attraverso l'attivazione di vie metaboliche secondarie, che sostituiscono o affiancano quella primaria in carenza o in assenza dello zucchero fermentescibile. Queste vie metaboliche che si attivano possono essere diverse in funzione delle condizioni presenti (soprattutto pH e potenziale di ossidoriduzione) e in qualche modo transitano tutte dall'acido piruvico. Inoltre, da un punto di vista teorico, la via eterofermentante produce quantità equimolari di acido lattico e acido acetico ed anche in questo caso il surplus di acido acetico può essere imputato a vie metaboliche secondarie. Al di là delle diverse tipologie e quantità di zuccheri, sono stati utilizzati aminoacidi liberi come fonte di azoto. *L. sakei* deve trovare nell'habitat in cui vive 18 aminoacidi disponibili non possedendo vie biosintetiche che ne permettono la sintesi. Gli aminoacidi aggiunti nel mezzo per altro servono sicuramente per l'assemblaggio delle molecole di natura proteica presenti nella cellula, ma possono anche divenire, in condizioni di stress nutrizionale, substrati utilizzabili per attivare vie metaboliche energetiche alternative. Mentre alcuni di questi aminoacidi sono caratterizzati da variazioni estremamente ridotte (ad esempio lisina, leucina, isoleucina, fenilalanina, valina, tiramina, prolina e acido aspartico), altri hanno mostrato scostamenti ben più consistenti rispetto ai valori inizialmente presenti, ad indicare che questi aminoacidi vengono utilizzati per cicli metabolici che non necessariamente riguardano solo la gestione del pool aminoacidico. Per quanto riguarda l'arginina, è noto che il suo metabolismo viene utilizzato da alcuni batteri lattici per produrre ATP in assenza di zuccheri fermentescibili seguendo la via arginina deaminasi (ADI).

Campioni	Tempo	L-lattico (mM)	D-lattico (mM)	Acetico (mM)	$\Delta$ Acetico
Bianco		0.23	-	23.72	-
2.5 G	24h	3.91	-	24.24	0.52
	48h	3.88	-	24.33	0.61
	120h	3.59	-	24.25	0.53
	192h	3.73	-	24.85	0.79
2.5 R	24h	1.66	-	26.57	2.85
	48h	1.19	-	26.77	3.05
	120h	0.72	-	27.12	3.39
	192h	0.81	-	27.33	3.61
25 G	24h	39.60	0.41	26.30	2.58
	48h	43.81	0.39	26.50	2.77
	120h	43.54	0.36	26.81	3.08
	192h	43.39	0.33	27.03	3.31
25 R	24h	15.61	1.43	44.72	21.00
	48h	16.02	1.09	46.43	22.70
	120h	15.82	1.00	46.32	22.60
	192h	15.79	1.22	46.87	23.14

Tabella 2: Acidi organici riscontrati nei campioni di *L. sakei* Chr82 incubato a 30°C in diverse condizioni

la presenza di acido acetico è spiegabile attraverso l'attivazione di vie metaboliche secondarie, che sostituiscono o affiancano quella primaria in carenza o in assenza dello zucchero fermentescibile. Queste vie metaboliche che si attivano possono essere diverse in funzione delle condizioni presenti (soprattutto pH e potenziale di ossidoriduzione) e in qualche modo transitano tutte dall'acido piruvico. Inoltre, da un punto di vista teorico, la via eterofermentante produce quantità equimolari di acido lattico e acido acetico ed anche in questo caso il surplus di acido acetico può essere imputato a vie metaboliche secondarie. Al di là delle diverse tipologie e quantità di zuccheri, sono stati utilizzati aminoacidi liberi come fonte di azoto. *L. sakei* deve trovare nell'habitat in cui vive 18 aminoacidi disponibili non possedendo vie biosintetiche che ne permettono la sintesi. Gli aminoacidi aggiunti nel mezzo per altro servono sicuramente per l'assemblaggio delle molecole di natura proteica presenti nella cellula, ma possono anche divenire, in condizioni di stress nutrizionale, substrati utilizzabili per attivare vie metaboliche energetiche alternative. Mentre alcuni di questi aminoacidi sono caratterizzati da variazioni estremamente ridotte (ad esempio lisina, leucina, isoleucina, fenilalanina, valina, tiramina, prolina e acido aspartico), altri hanno mostrato scostamenti ben più consistenti rispetto ai valori inizialmente presenti, ad indicare che questi aminoacidi vengono utilizzati per cicli metabolici che non necessariamente riguardano solo la gestione del pool aminoacidico. Per quanto riguarda l'arginina, è noto che il suo metabolismo viene utilizzato da alcuni batteri lattici per produrre ATP in assenza di zuccheri fermentescibili seguendo la via arginina deaminasi (ADI).

Campione	Tempo	Ac. asp	Ser+Asp	Ac. glu	Gly	His+Glu	Arg	Thr	Ala	Pro	Cys	Tyr	Val	Met	Lys	Ile	Leu	Phe
2.5 G	24h	-0.23	-0.60	-0.31	0.28	-0.81	-0.28	0.04	-0.12	0.15	0.20	-0.01	0.14	-0.05	-0.17	-0.03	-0.09	0.14
	48h	-0.36	-1.17	-0.55	-0.13	-1.23	-1.07	1.04	-0.30	0.02	0.38	-0.06	-0.03	-0.59	-0.11	0.00	0.00	0.28
	120h	-0.05	-1.30	-0.58	-0.14	-1.32	-0.95	1.08	-0.34	0.13	0.52	0.00	0.01	-0.87	-0.12	0.08	0.21	0.20
	192h	-0.06	-1.53	-0.59	-0.23	-1.42	-0.93	0.84	-0.37	0.10	0.37	-0.03	-0.04	-0.77	-0.22	-0.06	0.08	0.17
2.5 R	24h	-0.20	-0.42	-0.18	0.30	-0.48	-1.12	-0.02	0.04	0.08	0.30	0.02	0.10	0.05	0.16	0.02	-0.05	0.11
	48h	-0.18	-0.87	-0.30	-0.04	-0.84	-1.03	0.05	-0.15	0.08	0.64	0.05	-0.30	-0.34	0.20	-0.02	0.01	0.19
	120h	0.15	-1.10	-0.30	-0.04	-0.94	-0.86	0.10	-0.23	0.13	0.68	0.04	0.12	-0.62	0.28	-0.10	0.09	0.20
	192h	0.31	-1.17	-0.22	0.15	-0.80	-0.99	-0.07	-0.12	-0.02	0.37	-0.03	0.14	-0.61	0.08	-0.01	0.34	0.33
25 G	24h	-0.04	-2.51	0.45	0.11	-1.26	-0.24	-0.06	-0.26	0.01	0.02	0.00	-0.27	-0.02	-0.13	0.10	-0.05	0.28
	48h	-0.19	-2.87	0.33	-0.27	-1.63	-0.36	-0.26	-0.44	0.08	0.08	-0.04	-0.34	-0.07	-0.24	-0.09	0.01	0.17
	120h	-0.09	-2.86	0.34	-0.31	-1.68	-0.37	-0.28	-0.54	0.08	0.49	-0.02	-0.33	-0.03	-0.06	-0.01	0.04	0.15
	192h	-0.10	-2.84	0.34	-0.25	-1.63	-0.28	-0.23	-0.41	-0.11	0.05	-0.04	-0.23	-0.13	0.04	-0.05	0.02	0.19
25 R	24h	-0.15	-1.41	0.12	-0.27	-0.59	-1.13	0.09	-0.23	-0.08	-0.01	-0.09	-0.09	-0.25	-0.12	-0.03	-0.22	-0.02
	48h	-0.24	-1.66	-0.06	-0.54	-0.91	-1.09	-0.04	-0.38	-0.02	0.08	-0.05	-0.15	-0.35	-0.22	-0.16	-0.30	-0.05
	120h	-0.19	-1.64	-0.05	-0.54	-0.94	-1.04	0.06	-0.37	0.08	0.05	0.00	0.06	-0.48	0.08	-0.29	-0.19	-0.05
	192h	-0.22	-1.57	0.01	-0.45	-0.87	-0.96	0.17	-0.30	-0.17	0.19	-0.01	-0.11	-0.54	-0.03	-0.09	-0.40	-0.15

Tabella 3: Variazione espressa in mM di ciascun amminoacido aggiunto rispetto alla quantità inizialmente presente nel TS a 24, 48, 120 e 192 ore di incubazione di *L. sakei* Chr82 a 30°C in diverse condizioni

presenza di ribosio (25 R). Questo aspetto potrebbe essere dovuto ai diversi valori di pH raggiunti in presenza delle più alte concentrazioni di zuccheri, infatti è stato dimostrato che la via metabolica dell'ADI è inibita dall'abbassamento del pH. Un'altra coppia di amminoacidi soggetta ad importanti riduzioni durante l'incubazione è quella formata dall'istidina e dalla glutammina. Purtroppo, i picchi corrispondenti a questi due amminoacidi non sono risolvibili alle condizioni adottate. Appare tuttavia evidente che il loro consumo interessa prevalentemente i campioni ottenuti in presenza di glucosio (2.5 G e 25 G). Stesse considerazioni si possono fare per gli amminoacidi serina e asparagina (anch'essi non risolvibili analiticamente), per i quali si osserva un maggiore consumo in presenza di glucosio, in particolare quando questo zucchero è presente in quantità maggiori (25 G). L'amminoacido solforato metionina è consumato prevalentemente quando gli zuccheri sono aggiunti alle più basse quantità (2.5 G e 2.5 R). Nel caso della presenza iniziale di zuccheri a 25 mM di concentrazione, il consumo di metionina è significativamente maggiore nel campione 25 R. Gli stessi campioni sono stati poi soggetti ad analisi citofluorimetriche per definire alcuni parametri legati alla vitalità delle cellule (Figura 3).

Per quanto riguarda i campioni cresciuti su glucosio si osserva in generale ad una vitalità molto più alta fra le cellule coltivate in presenza di 25 mM di tale zucchero. Nei campioni 2.5 G la percentuale di cellule riconosciute come morte era decisamente più alta, passando da 16.4% (dopo 24 ore) a 93.9% (dopo 192 ore). Queste differenze andavano a scapito delle cellule riconosciute come vitali, mentre la proporzione delle cellule danneggiate era relativamente costante. I campioni 2.5 R seguivano un trend simile, con un drastico aumento della mortalità dopo 192 ore (da 1.62% a 98.11%). Da sottolineare il fatto che questi campioni erano caratterizzati, rispetto ai campioni 2.5 G, da una maggiore vitalità sia dopo 48 che dopo 120 ore.

## 5. Elenco delle pubblicazioni prodotte nell'ambito dell'attività di dottorato

Magnani M (2017) Stressful Conditions and Metabolism of *Lactobacillus Sakei*: Impact on the Characteristics of Fermented Products.technology. 22nd Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology, Free University of Bozen, Bozen, September 20th-22nd, 2017.

Arioli S, Montanari C, Magnani M, Tabanelli G, Patrignani F, Lanciotti R, Mora D, Gardini F (2019) Modelling of *Listeria monocytogenes* Scott A after a mild heat treatment in the presence of thymol and carvacrol: Effects on culturability and viability. J. Food Eng., 240, 73-82, 2019.

Montanari C, Barbieri F, Magnani M, Grazia L, Gardini F, Tabanelli G, (2018) Phenotypic diversity of *Lactobacillus sakei* strains. Front. in Microbiol., 2018, 9, pp. 2003 - 2016

Tabanelli G, Montanari C, Arioli S, Magnani M., Patrignani F, Lanciotti R, Mora D, Gardini F, (2018) Physiological response of *Saccharomyces cerevisiae* to citral combined with thermal treatment, LWT Food Sci. Tech., 2019, 101, pp. 827 – 834.

Questa via viene ampiamente utilizzata dal ceppo di *L. sakei* utilizzato, in presenza delle concentrazioni basse di zuccheri, indipendentemente dallo zucchero aggiunto (2.5 G e 2.5 R), mentre alle concentrazioni più alte risulta particolarmente attiva quando il ceppo cresce in



Figura 3: Distribuzione di cellule vive, danneggiate e morte del ceppo *L. sakei* Chr82 in seguito ad incubazione a 30°C per 24, 48, 120 e 192 ore. I dati sono riportati come frequenza relativa della popolazione totale ottenuta con analisi citofluorimetrica a doppia marcatura (SYBR-Green I e PI)

## Soluzioni avanzate per la qualità e la genuinità degli oli d'oliva vergini

Rosa Palagano (email: rosa.palagano@unibo.it)

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

Corso di Dottorato: Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari

Tematica: Scienze e Biotecnologie degli Alimenti; Ciclo di dottorato: XXXII; Anno di frequenza: III

Tutor: Alessandra Bendini

### 1. Stato dell'arte

Considerando la produzione mondiale di oli vegetali, l'olio di oliva si colloca solo al nono posto (dopo quello di palma, soia, colza, girasole, palmisti, arachidi, semi di cotone e cocco) con poco più di 3 milioni di tonnellate di olio ottenuto nella campagna olearia 2018/19 (USDA, 2019). Nonostante ciò, il valore economico e commerciale di questo prodotto è molto elevato grazie alla sua composizione chimica e a peculiari caratteristiche salutistiche ed organolettiche (Tena et al., 2015) che lo rendono un elemento fondamentale della dieta Mediterranea (Bendini et al., 2007). I parametri chimici e sensoriali che devono essere valutati nell'ambito del controllo della qualità e genuinità dell'olio di oliva vergine vengono definiti dall'Unione Europea (Reg. CEE 2568/91 e successive modifiche) che stabilisce anche i metodi analitici per la loro determinazione ed i relativi limiti che consentono di definire l'appartenenza o meno del prodotto ad una specifica categoria merceologica. Tuttavia, nonostante il settore legislativo in ambito oleario sia molto sviluppato, la categoria "oli e grassi", in cui rientra anche l'olio di oliva, si posiziona al terzo posto (dopo carne/prodotti carnei e pesce/prodotti ittici) nella classifica dei prodotti alimentari per cui sono state riscontrate delle non conformità (EU Food Fraud Report, 2016). Per questa ragione, la legislazione europea, tra le più avanzate nel settore, è alla continua ricerca di approcci analitici utili ad individuare le frodi emergenti mediante l'adozione di metodi nuovi o ottenuti da un processo di revisione e miglioramento di quelli già esistenti (Conte et al., 2019).

In questo contesto si inserisce il progetto europeo "OLEUM - Advanced solutions for assuring authenticity and quality of olive oil at global scale" (GA 635690) nell'ambito del quale vengono svolte tutte le attività previste in questo progetto di dottorato.

### 2. Bibliografia

- Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gómez-Caravaca AM, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Lercker G (2007) Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade, *Molecules* 12: 1679-1719.
- Conte L, Bendini A, Valli E, Lucci P, Moret S, Maquet A, Lacoste F, Brereton P, García-González DL, Moreda W, Gallina Toschi T (2019) Olive oil quality and authenticity: a review of current EU legislation, standards, relevant methods of analyses, their drawbacks and recommendations for the future, *Trends Food Sci Technol*, in press.
- Regolamento CEE n. 2568/91 della Commissione dell'11 luglio 1991 relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti.
- Tena N, Wang SC, Aparicio-Ruiz R, García-González DL, Aparicio R (2015) In-depth assessment of analytical methods for olive oil purity, safety, and quality characterization, *J Agric Food Chem* 63: 4509-4526.
- The EU Food Fraud Network and the System for Administrative Assistance & Food Fraud (2016) Annual Report.
- United States Department of Agriculture (2019). Oilseeds: world markets and trade.

### 3. Sviluppo della ricerca

Questo progetto di dottorato mira allo sviluppo e al miglioramento di soluzioni analitiche per il controllo della qualità e genuinità dell'olio d'oliva vergine.

Il progetto, suddiviso in tre linee di ricerca principali condotte in parallelo, è stato sviluppato secondo i seguenti punti:

**A1) Ricerca bibliografica** relativa alle principali criticità del controllo della qualità e genuinità degli oli di oliva vergini e dei metodi analitici attualmente in uso;

**A2) Studio di nuovi approcci analitici** (GC-IMS, differenza tra contenuto sperimentale e teorico di digliceridi) e **revisione**, con successiva validazione *in-house*, **del metodo ufficiale** per la determinazione degli **etil esteri degli acidi grassi (EEAG)** per l'individuazione di oli di oliva vergini di qualità inferiore in oli extra vergini di oliva;

**A3) Applicazione della tecnica Flash Gas Chromatography Electronic Nose (FGC-E-Nose)** per la discriminazione rapida di campioni di oli d'oliva vergini in funzione della diversa origine geografica;

**A3) Sviluppo e validazione *in-house* di un metodo rapido** elettrochimico per la determinazione dell'acidità libera di oli di oliva vergini;

**A5) Scrittura e pubblicazione della tesi di dottorato, poster, articoli scientifici e presentazione orale.**

**Tabella 1. Diagramma di Gantt dell'attività di ricerca del dottorato**

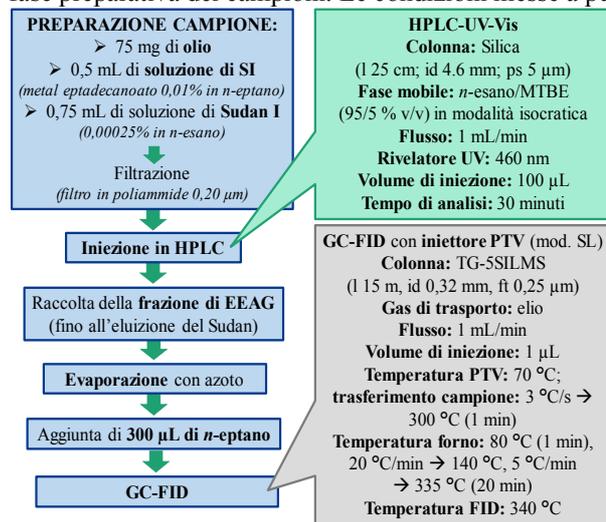
Attività	Mese	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	
<b>A1) Ricerca bibliografica</b>																				
<b>A2) Approcci analitici per l'individuazione di oli di oliva vergini di qualità inferiore in oli extra vergini di oliva</b>																				
Campionamento																				
Revisione del metodo ufficiale per EEAG																				
Studio di nuovi approcci analitici (GC-IMS, DAG <sub>exp</sub> - DAG <sub>teo</sub> )																				
<b>A3) Applicazione del FGC-E-Nose</b>																				
Campionamento																				
Analisi dei campioni mediante FGC-E-Nose																				
Elaborazione multivariata dei dati																				
<b>A4) Sviluppo e validazione di un metodo rapido elettrochimico per la determinazione dell'acidità libera</b>																				
Campionamento																				
Analisi secondo le metodiche ufficiali																				
Analisi mediante nuovi strumenti e confronto dei risultati																				
<b>A5) Preparazione della tesi e di articoli scientifici</b>																				

#### 4. Principali risultati

Allo scopo di fornire una descrizione più chiara delle attività svolte e dei principali risultati raggiunti, le tre linee di ricerca (A2, A3 ed A4) verranno trattate separatamente.

##### A2 – Approcci analitici per l'individuazione di miscele di oli di oliva vergini di qualità inferiore con oli extra vergini d'oliva

Il focus di questa linea di ricerca è lo studio di approcci analitici per l'individuazione di miscele di oli extra vergini di oliva con oli di qualità inferiore (es. vergini o lampanti) o sottoposti a deodorazione soft, un trattamento tecnologico illegale mirato alla rimozione o riduzione di leggeri difetti sensoriali che non consentirebbero di classificare un olio di oliva come extra vergine. Attualmente, l'unico metodo ufficiale, riconosciuto dai regolamenti come parametro di qualità, in grado di poter individuare anche la presenza di oli soft-deodorati è la determinazione degli EEAG. Tuttavia, il metodo in vigore presenta delle criticità legate all'utilizzo di elevate quantità di solventi e ai lunghi tempi di analisi. Un primo obiettivo è stato quindi quello di mettere a punto e validare *in-house* un metodo basato sull'utilizzo di un HPLC-UV-Vis in sostituzione della tradizionale cromatografia liquida su colonna adottata dal metodo ufficiale nella fase preparativa dei campioni. Le condizioni messe a punto ed applicate nel metodo sono riportate in Figura 1.



**Figura 1. Schema del metodo e condizioni applicate.**

Le attività relative al secondo obiettivo, ovvero lo studio di nuovi approcci analitici per l'individuazione di tale problematica, sono state svolte presso l'Istituto de la Grasa di Siviglia (Spagna) nel periodo novembre 2018-marzo 2019. Uno degli approcci presi in considerazione riguarda la valutazione della differenza tra il contenuto di digliceridi determinato sperimentalmente (DAG<sub>exp</sub>) e quello teorico (DAG<sub>teo</sub>), misurato a partire dall'acidità libera. Nel caso di oli extra vergini di oliva caratterizzati da una bassa acidità libera la differenza tra DAG<sub>exp</sub> e DAG<sub>teo</sub> è vicina a 0 o negativa; si verifica invece il contrario, cioè un abbassamento del valore di DAG<sub>teo</sub> e quindi un incremento di DAG<sub>exp</sub> - DAG<sub>teo</sub>, negli oli frutto di una miscela tra un extra vergine e un vergine o lampante, qualora questi ultimi siano stati sottoposti a trattamenti non dichiarati quali una blanda deacidificazione ed una soft-deodorazione (per rimuovere gli acidi grassi liberi e gli *off-flavor*, rispettivamente). Il secondo approccio, invece, ha riguardato l'utilizzo di un GC-IMS (Gas

L'applicazione di un HPLC-UV-Vis ha permesso di ridurre il volume di solventi ed il tempo necessario per ogni analisi. È stato testato, inoltre, l'utilizzo di un iniettore PTV in alternativa a quello on-column previsto per l'analisi GC e non sono emerse differenze significative dall'analisi degli stessi campioni con le due modalità di iniezione. Successivamente, per valutare l'efficacia del metodo proposto, sono stati determinati alcuni parametri necessari per la validazione *in-house* del metodo: linearità, LOD e LOQ, robustezza, accuratezza e precisione *intra-day* ed *inter-day*. Il metodo proposto presentava un intervallo di linearità compreso tra 2,5 e 50 ppm e valori di LOD e LOQ inferiori a 1 e 1,5 ppm, rispettivamente, per tutti gli EEAG presi in esame. Il metodo si è, inoltre, dimostrato robusto pur attuando piccole variazioni del profilo di flusso della fase mobile. Anche per quanto riguarda accuratezza e precisione *intra-day* ed *inter-day* sono stati ottenuti ottimi risultati.

Chromatograph - Ion Mobility Spectrometer) come metodo di screening rapido basato sull'analisi dello spazio di testa. Tale strumento non necessita di una fase preparativa del campione e la separazione delle molecole avviene sia nella colonna cromatografica (*Retention Time*), sia in funzione della loro mobilità ionica dopo essere state ionizzate e sottoposte ad un campo elettrico (*Drift Time*). In entrambi i casi è stato analizzato un ampio set di campioni costituito da oli extra vergini di oliva, oli di oliva con difetti sensoriali prima e dopo essere stati sottoposti ad una deodorazione soft e loro miscele. I dati ottenuti sono attualmente in fase di elaborazione.

*A3 - Applicazione di un FGC-E-Nose per la discriminazione di campioni di olio d'oliva vergine sulla base dell'origine geografica*

L'obiettivo di tale linea di ricerca è stato quello di valutare l'applicabilità e l'efficacia di un FGC-E-Nose come metodo strumentale rapido, basato sulla separazione delle molecole volatili presenti nello spazio di testa di campioni di olio, per la discriminazione in funzione dell'origine geografica. A tal fine, durante due annualità (2017 e 2018) sono stati reperiti ed analizzati 174 oli di oliva vergini caratterizzati da diversa provenienza geografica (Tabella 1).

Categoria	Tot.	Provenienza
UE	116	29 Spagna, 28 Italia, 20 Croazia, 16 Grecia, 12 Portogallo, 11 Slovenia
Extra-UE	40	21 Turchia, 15 Marocco, 3 Tunisia, 1 Cile
Miscela	18	12 miscele UE, 6 miscele UE/Extra-UE

**Tabella 1.** Numero di campioni per ogni categoria considerata con dettaglio del Paese di provenienza.

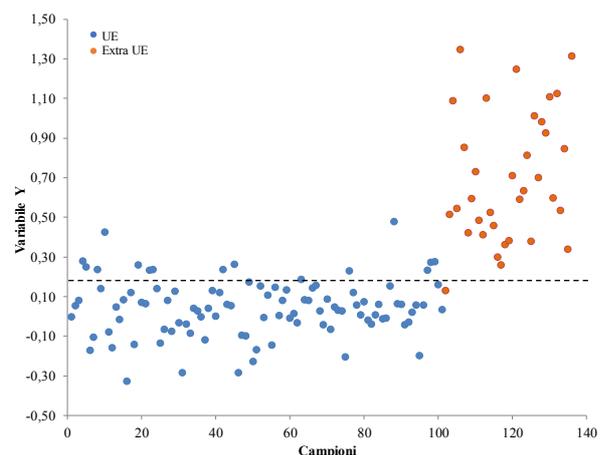
**UE:** oli provenienti da stati dell'Unione Europea; **Extra-UE:** oli provenienti da stati esterni all'Unione Europea; **Miscela:** oli costituiti da miscele di soli oli europei o oli europei e non.

I dati ottenuti sono stati poi elaborati statisticamente attraverso un approccio chemiometrico *non-targeted*, che non prevede l'identificazione e quantificazione dei singoli analiti ma l'elaborazione dell'intero profilo, al fine di sviluppare un modello multivariato PLS-DA (Partial Least Square-Discriminant Analysis) in grado di discriminare i campioni in funzione dell'origine geografica. Le categorie considerate nella costruzione del modello sono state: i) "UE", contenente campioni provenienti da Stati Membri dell'Unione Europea e le "miscele UE"; ii) "Extra-UE", che comprendeva oli provenienti da Stati esterni all'UE e le "miscele UE/Extra-UE". Il modello PLS-DA è stato calibrato e validato internamente (*full-cross validation*) utilizzando il 75% dei campioni selezionati in maniera casuale, mentre è stato validato esternamente utilizzando il restante 25% dei campioni. In Tabella 2 sono riportate le percentuali (valori medi calcolati considerando 5 repliche di validazione) di campioni correttamente classificati dal modello PLS-DA per ognuna delle categorie prese in esame. Per entrambe le tipologie di validazione è stata ottenuta una percentuale maggiore di campioni correttamente classificati in funzione dell'origine geografica per la categoria "Extra-UE" che aveva, però, una numerosità di campioni molto inferiore rispetto alla classe "UE". I valori ottenuti per la validazione esterna, inoltre, sono risultati più bassi rispetto a quella interna trattandosi di un metodo di validazione più robusto in quanto il modello ha come obiettivo quello di classificare campioni esterni, cioè non utilizzati per la costruzione del modello stesso.

	Cross validation	Validazione esterna
UE	86% (~ 87/101)	80% (~ 26/33)
Extra UE	98,5% (~ 29/30)	92,5% (~ 9/10)
Tot.	89% (~ 116/131)	84% (~ 35/43)

**Tabella 2.** Valori medi relativi alle percentuali dei campioni correttamente classificati dal modello PLS-DA per entrambe le categorie considerate. **UE:** oli provenienti da stati dell'Unione Europea; **Extra-UE:** oli provenienti da stati esterni all'Unione Europea.

**Figura 2.** Grafico dei valori della variabile Y stimati dal modello PLS-DA in Cross Validation (75% dei campioni analizzati). In azzurro i campioni UE, in arancio i campioni Extra-UE.



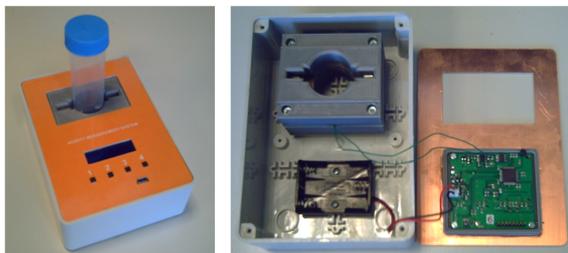
In Figura 2 sono riportati i valori della variabile Y stimati dal modello in *full-cross validation* per i campioni analizzati. La linea tratteggiata identifica la soglia di classificazione, un valore variabile in funzione della numerosità dei campioni appartenenti alle categorie in esame. In merito al posizionamento dei campioni nel grafico, in linea generale, una maggiore distanza dalla linea di soglia può essere interpretata come una migliore capacità di discriminazione del modello. Viceversa, più un campione è posizionato vicino al valore soglia, peggiore è stata la capacità del modello statistico di classificarlo. Osservando quindi la figura, i punti azzurri posizionati al di sopra della linea di soglia rappresentano i campioni appartenenti alla categoria "UE" che non sono stati classificati in modo corretto dal modello. Considerando invece le "miscele UE" ed "UE/Extra-UE", nonostante il numero ridotto di campioni di questa tipologia, la maggior parte di esse è stato classificato correttamente per entrambe le tipologie di miscele.

Questi risultati evidenziano quindi come la FGC-E-Nose associata ad un modello statistico PLS-DA possa ritenersi un approccio promettente per la discriminazione rapida di oli di oliva vergini in funzione dell'origine geografica. Tale

modello potrà, tuttavia, essere ulteriormente migliorato in termini di robustezza e capacità discriminante ampliando la numerosità e la variabilità del set di campioni analizzato, in particolare per quanto riguarda le miscele UE ed UE/Extra.

#### A4 - Sviluppo e validazione in-house di un metodo elettrochimico rapido per la determinazione dell'acidità libera negli oli di oliva vergini

La terza ed ultima linea di ricerca seguita in questo progetto di dottorato ha come obiettivo lo sviluppo e validazione di un metodo rapido per la determinazione dell'acidità libera in campioni di olio d'oliva vergine. Tale metodo innovativo offre vantaggi quali la semplicità d'uso, la possibilità di effettuare le analisi direttamente in frantoio e la rapidità (2-3 minuti per analisi).



**Figura 2.** Interno ed esterno dello strumento per la determinazione rapida dell'acidità libera.

Lo strumento (Figura 2), sviluppato in collaborazione con il Dott. Grossi del Dipartimento di Ingegneria dell'Energia Elettrica e dell'Informazione (DEI) dell'Università di Bologna, ha dimensioni ridotte (11 x 15 x 5 cm), può essere alimentato mediante porta USB o batterie alcaline ed è dotato di una serie di tasti ed uno schermo LCD (2 righe e 16 colonne) che consentono di realizzare le misure e visualizzare direttamente i risultati. Il principio di funzionamento è basato sulla creazione di un'emulsione tra l'olio ed una soluzione idroalcolica, quindi l'acidità libera viene misurata a partire dalla conduttività elettrica dell'emulsione.

La misura viene realizzata utilizzando delle provette da 50 mL di tipo Falcon modificate con due elettrodi in acciaio inossidabile. È presente, inoltre, un sensore per la rilevazione della temperatura al momento dell'analisi: i valori di temperatura e conduttività misurati vengono quindi utilizzati per determinare la conduttività dell'emulsione alla temperatura di calibrazione mediante l'applicazione di una formula specifica.

Prima della validazione *in-house*, il sistema è stato calibrato analizzando 5 campioni di olio di girasole raffinato addizionati con differenti concentrazioni di acido oleico (da 0% a 3,75% per coprire un intervallo di acidità libera riscontrabile nelle diverse categorie merceologiche dell'olio di oliva vergine). I campioni sono stati quindi analizzati determinando l'acidità libera mediante il metodo ufficiale e la conduttività mediante il metodo rapido: in tutti i casi la conduttività elettrica misurata aumentava in funzione dell'acidità libera dei campioni con una relazione non-lineare. I parametri considerati per la validazione *in-house* del metodo sono stati: LOD e LOQ, precisione *intra-day* ed *inter-day* e accuratezza. I valori ottenuti per LOD e LOQ sono stati rispettivamente di 0,02 % e 0,06 % di acido oleico. Accuratezza e precisione *intra-day* sono stati valutati analizzando 30 campioni di olio di olive vergine di cui 20 extra vergini, 7 vergini e 3 lampanti. Per l'accuratezza tutti i campioni sono stati analizzati mediante i due approcci (rapido ed ufficiale) e dal confronto dei valori ottenuti (*two-tailed paired t-test* con  $p < 0,05$ ) non sono emerse differenze significative. Inoltre, la regressione tra le due serie di valori ha evidenziato un coefficiente di correlazione  $R^2$  di 0,97. Per quanto riguarda la precisione *intra-day* il metodo rapido ha riportato risultati soddisfacenti con valori di RSD (deviazione standard relativa) inferiori al 15%. Infine, considerando la precisione *inter-day*, 6 campioni (2 oli per ogni categoria merceologica) sono stati analizzati per 3 giorni consecutivi ed i risultati per uno stesso campione misurati nelle diverse giornate non hanno evidenziato differenze significative (*Test di Student* con  $p < 0,05$ ).

## 5. Elenco delle pubblicazioni prodotte nell'ambito dell'attività di dottorato

- Palagano R (2017) Advanced solutions for authenticity and quality of olive oil. Proc. of 22<sup>nd</sup> Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology.
- Valli E, Palagano R, Berardinelli A, Ragni L, Moreda W, Pérez Camino MC, Bendini A, Gallina Toschi T (2017) Time Domain Reflectometry as a promising analytical approach for the determination of fatty acid ethyl esters in extra virgin olive oils. Proc. of 3<sup>rd</sup> IMEKO Foods-Metrology Promoting Standardization and Harmonization in Food and Nutrition, 239.
- El-Gharbi S, Tekaya M, Bendini A, Valli E, Palagano R, Gallina Toschi T, Hammami M, Mechri B (2018) Effects of archaic olive and oil storage methods still used in southern Tunisia on olive oil quality. Ital. J. Food Sci. 30: 102-5.
- Palagano R (2018) Advanced solutions for authenticity and quality of olive oil. Proc. of 23<sup>rd</sup> Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology.
- Palagano R, Bendini A, Valli E, Tura M, Pérez-Camino MC, Joffre F, Lacoste F, Moreda W, Gallina Toschi T (2018) Determination of fatty acids ethyl esters in virgin olive oils: proposals to enhance the EU official method. Proc. of 6<sup>th</sup> International Conference on the Olive Tree and the Olive Products – OLIVE BIOTEQ'18.
- Bendini A, Palagano R, Valli E, Cevoli C, Winkelmann O, Gallina Toschi T (2018) Application of a non-targeted approach by Flash Gas Chromatography-E-nose to discriminate the geographical origin of virgin olive oils. Proc. of 6<sup>th</sup> International Conference on the Olive Tree and the Olive Products – OLIVE BIOTEQ'18.
- Grossi M, Palagano R, Bendini A, Riccò B, Servili M, García González DL, Gallina Toschi T (2019) Design and in-house validation of a portable system for the determination of free acidity in virgin olive oil. Food Control, under review.

# **<sup>1</sup>H-NMR spectroscopy to investigate the connection between food characteristics and health**

Chenglin Zhu (email: chenglin.zhu2@unibo.it)

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, *Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna

Corso di Dottorato: Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari

Tematica: Scienze e Biotecnologie degli Alimenti; Ciclo di dottorato: XXXII; Anno di frequenza: III

Tutor: Luca Laghi

## **1. State-of-Art**

Metabolomics is a powerful systems biology approach that aims to measure simultaneously low molecular weight metabolites (<900 Da) present in a biofluid or tissue. This approach to global untargeted and non-selected characterization of the metabolic phenotype allows the study of multidimensional biochemical responses of complex biological systems to genetic or environmental stimuli (Nicholson, Lindon, & Holmes, 1999). Metabolic profiling captures information from both intrinsic (genetics, protein expression) and environmental inputs (diet, gut microbiota), providing holistic information on the global system. This strategy has proven highly effective for unravelling the complex metabolic interactions between the mammalian host and its resident gut microbiota. Metabolomics is a tool of particular interest to food researchers, given the vast impact of the gut microbiome on the bioavailability of food, medication and energy (Baldassarre et al., 2018). Indeed, metabolomics, along with other ‘omic’ approaches such as genomics, proteomics and transcriptomics, is increasingly showing potential in clinical settings as both a screening tool and a mean for mechanistic elucidation of disease pathways (Gowda et al., 2008).

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy has a long tradition as a powerful platform in the hands of food scientists, with several applications related to food safety, traceability and authenticity. High-resolution proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) spectroscopy, when applied to metabolomic studies, has provided significant information when connections between health status of people and dietary habits were looked for (De Filippis et al., 2016; Siroli et al., 2017) or when the connection between food composition and technological treatment was investigated. This is because an NMR profile contains qualitative and quantitative information on hundreds of different small molecules present in a sample at 1mM concentration (Bertini et al., 2009). Moreover, NMR-based metabolomics makes no assumption on the identity of the metabolites that are relevant for the selected study because information on the significant metabolic pattern features is directly obtained through statistical analysis of the NMR profiles (Parolin et al., 2018).

The metabolic composition of biofluids can provide important diagnostic and prognostic information. Among the biofluids most commonly analyzed in metabolomic studies, urine appears to be particularly useful. It is abundant, readily available, easily stored and collectable by simple, noninvasive techniques. Moreover, given its chemical complexity, urine is particularly rich in potential biomarkers of diseases. This makes it an ideal biofluid for detecting or monitoring disease processes. In order to obtain useful pieces of information from the metabolome of biofluids, two key issues should be faced. Firstly, the extrapolation of molecules concentrations from NMR spectra can be severely hindered by shifts of the signals caused by factors like pH and ionic strength. The design of convenient SOP for samples manipulation seems therefore a key step to create robust databases. Secondly, it should be considered that the connection between metabolome and health status is obscured by molecules brought by diet. In this respect, such issue could be better dealt with, as a first approach, in simplified environments. They can be represented by food interventions with remarkably high effects of metabolome, such as probiotic. Therefore, for the first time, we tested a probiotic mix of several strains of live bacteria typically employed for humans to improve the training performance of Standardbred horses in athletic activity through urine metabolome.

## **2. Bibliography**

- Baldassarre ME, Di Mauro A, Tafuri S, Rizzo V, Gallone MS, Mastromarino P, Capobianco D, Laghi L, Zhu C, Capozza M and Laforgia N (2018) Effectiveness and safety of a probiotic-mixture for the treatment of infantile colic: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial with fecal real-time PCR and NMR-based metabolomics analysis, *Nutrients*, 10(2):195.
- Bertini I, Calabró A, De Carli V, Luchinat C, Nepi S, Porfirio B, Renzi D, Saccenti E and Tenori L (2009) The metabonomic signature of celiac disease, *J Proteome Res*, 8(1):170–177.
- De Filippis F, Pellegrini N, Vannini L, Jeffery IB, La Storia A, Laghi L, Serrazanetti DI, Di Cagno R, Ferrocino I, Lazzi C, Turrone S, Cocolin L, Brigidi P, Neviani E, Gobbetti M, W O’toole P and Ercolini D (2016) High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut*, 65(11).
- Gowda GA, Zhang S, Gu H, Asiago V, Shanaiah N and Raftery D (2008) Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*, 8(5):617-633.

- Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E (1999) “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data, *Xenobiotica*, 29(11):1181-1189.
- Parolin C, Foschi C, Laghi L, Zhu C, Banzola N, Gaspari V, D’Antuono A, Giordani B, Severgnini M, Consolandi C, Salvo M, Cevenini R, Vitali B and Marangoni A (2018) Insights into vaginal bacterial communities and metabolic profiles of chlamydia trachomatis infection: positioning between eubiosis and dysbiosis, *Front Microbiol*, 9:600.
- Siroli L, Patrignani F, Serrazanetti DI, Parolin C, Nahui Palomino RA, Vitali B and Lanciotti (2017) Determination of antibacterial and technological properties of vaginal lactobacilli for their potential application in dairy products, *Front Microbiol*, 8:166.

### 3. Objectives and Milestones

The project of the doctoral thesis may be divided in the following activities:

- 1) Literature review about latest researchers related to investigating the relationship between food and health through a metabolomics approach.
- 2) Set up and apply specific NMR SOP (Standard operation procedures).
- 3) Metabolomics oriented experiments focusing on the relationship between probiotics assumption and health status
- 4) Metabolomics oriented experiments focusing on the relationship between food processing and food composition and, in turn between food composition and health.
- 5) To write and publish the doctoral thesis, posters, scientific articles and oral presentations.

**Table 1. Gantt Chart for the research activities in scope of doctoral study**

Attività	Mese	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
A1) <b>Literature review and Experimental design</b>		■	■	■	■	■													
1) preliminary studies in metabolomics		■	■																
2) experiment design				■	■	■													
A2) <b>Set up and apply specific NMR SOP</b>						■	■												
A3) <b>Experiments focusing on probiotics assumption and health status</b>								■	■	■	■	■	■						
1) read papers to choose proper probiotics								■	■										
2) assessments of the relationship between probiotics and health										■	■	■	■						
A4) <b>Experiments focusing on the food processing and health</b>															■	■	■	■	
1) assessments of the relationship between food processing and composition															■	■	■	■	
2) assessments of the relationship between food composition and health																■	■	■	
3) investigate the relationship through metabolomic approach																	■	■	
A5) <b>Writing the doctoral thesis and publishing articles</b>										■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

### 4. Main results

During my first year, I focused on projects allowing me to set up NMR-based SOP (Standard Operating Procedure) designed to obtain information about human and animal health status from biofluids metabolome. A group of works, dealing with women, children and horses urines allowed me to design a universally applicable SOP for urine metabolome investigation. In the work described in the paper “Urine metabolome in women with Chlamydia trachomatis infection” healthy or chlamydia affected women donated urines to look for biomarkers of this disease. As the selected women were allowed a free diet during the experiment, the obtained samples were perfectly tailored for the purpose.

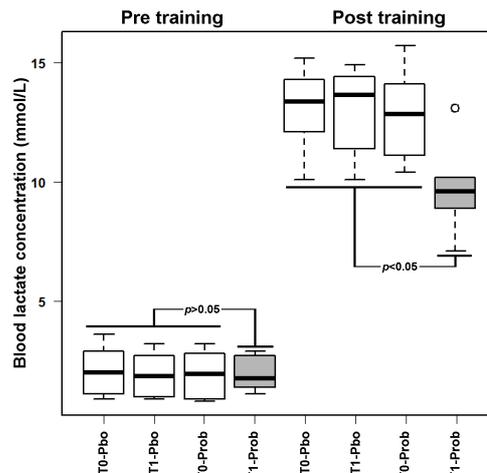
A second group of work allowed me to set up SOP for feces related metabolomics works. One of them gave rise the communication by Tursi “Impact of treatments on fecal microbiota and fecal metabolic profiling in symptomatic uncomplicated diverticular disease of the colon”. Other SOP were setup on serum samples from chicken and human beings, humor samples from pigs, tracheal wash samples and exhaled breath condensates from horses and meat samples from chicken.

Women affected by Chlamydia described above donated also a sample of vaginal swab, so to find further biomarkers of Chlamydia. In the context of my research plan, this work served as a first insight into the relationship between microbiota and metabolome in an environment that, from two key points of view, could be considered simpler than feces. On one side, previous works highlighted the connection between microbiota and most of the molecules that can be quantified by NMR. On the other side, diets habits that may act as strong confounding variables in the study of other biofluids play a minor role in vaginal environment.

Thanks to the SOP which I set up in the first year, mainly two experiments have been done at the beginning of my second year. In order to highlight potential health issues in subjects, a key factor is the possibility to compare quantitatively the metabolome of their biofluids with reference values from healthy individuals. First, I could accurately evaluate the metabolic profiles of yak (*Bos grunniens*) serum, feces and urine by using proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR), to serve as a reference guide for the healthy yak milieu. A total of 108 metabolites, giving

information about diet, protein digestion and energy generation or gut-microbial co-metabolism, were assigned across the three biological matrices. As a part of yak project, such work was described in the paper “Characterization of yak common biofluids metabolome by means of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy”. Second, 54 molecules in healthy trotter horse urine were characterized and quantified. Moreover, how gender, age and exercise affected their concentration, by means of a two steps protocol based on univariate and robust principal component analysis was highlighted. This work was published in *Metabolomics* titled “Characterization of trotter horses urine metabolome by means of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy”.

Some of the works described before allowed me to explore the relationship between probiotics and biofluids metabolome which was the main goal of my second year. The work described in Laghi *et al* investigated the possibility to use a high concentration multispecies probiotic formulation (a mix of 8 bacterial strains of live lactic acid bacteria and bifidobacterial) typically employed for humans, to improve the training performance of Standardbred horses. The study was designed as a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial with crossover, ten Standardbred horses (4 male and 6 female) were enrolled. Blood lactate concentration was tested on whole blood using a portable device (Accutrend® Plus, Roche, Mannheim, Germany) both at T0 and T1 immediately before (pre) and after (post) the exercise of the respective day. Urine was collected before (pre) and after (post) each training session both at T0 and at T1 during spontaneous urination.

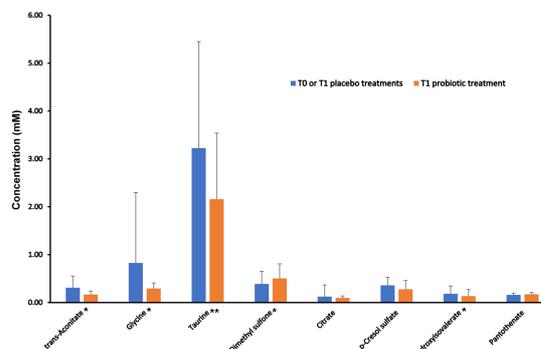


**Figure 1.** Blood lactate concentration in horses before (T0) or after (T1) treatment with probiotics (Prob) and placebo (Pbo), and pre- and posttraining. Samples obtained at T0 and after treatment with placebo were considered as constituting a single group (white boxplots). Samples obtained after treatment with probiotics (gray boxplots) were compared with them by nonparametric univariate analysis test (P values).

Taking into account the natural fluctuations in the concentration of this molecule as a result of postprandial conditions and other confounding factors, we considered the samples obtained at the two T0 points, together with the sample obtained after placebo administration, as describing the animal under no treatment.

Before all training sessions, the horses showed a similar blood lactate concentration, equal to  $2.0 \pm 0.9$  mmol/L. Post-training, every horse but those at T1 treated with placebo showed again a similar value of lactate, equal to  $13.0 \pm 1.8$  mmol/L. On the opposite, horses at T1 treated with probiotics showed post-training a blood lactate concentration of  $9.9 \pm 1.9$  mmol/L, significantly lower than the other groups observed post training (Figure 1).

Blood lactate response to exercise can be used in field test for assessing performance and fitness, because it reflects the reduction of lactic acid production and accumulation in muscular cells, with direct consequences on the onset of fatigue in athletic horses. Lactate accumulation in muscles, can lead to impairment of glycolysis and respiratory capacity of mitochondria (the main source of plasmatic AST), decreasing in ATP concentration and availability, and to sarcoplasmic reticulum swelling. Since a lower blood lactate concentration has been found in treated group after exercise, probiotics seem to promote the performance of the athletic horses, which could be correlated with better performance during the race.



**Figure 2.** Concentration (mM, mean±SD) of the molecules which concentration pre-training varied because of probiotic supplementation. For readability reasons, only comparisons characterized by a *p*-value lower than 0.1 are reported. The concentration of *p*-cresol sulfate and 2-hydroxyisovalerate was multiplied by 10 for the same reasons. \* *p*<0.05.

The molecules that could be quantified pertained mainly to the chemical groups of amino acids, short chain fatty acids, organic acids, and monomeric carbohydrates. The molecular profile for probiotics at T1 differed from the others in the concentration of eight molecules (Figure 2).

The concentration of trans-aconitate, in particular, was found to be significantly modified by the administration of probiotics and was found to correlate with lactate concentration in blood post-exercise. Trans-aconitate offers an insight of TCA cycle, as this molecule is endogenously originated from the cycle's intermediates, through cis-aconitate, by means of trans-aconitate decarboxylase. As a confirm, the concentration of trans-aconitate in human urines has been recognized as modified by exercise sessions.

Citrate concentration trend pairs the one of trans-aconitate in giving information about TCA cycle efficiency in the horses under investigation. Indeed, citrate concentration in urine can be considered as an indirect biomarker of the horses training status. In fact, endurance training is known to modulate the concentration in mitochondria of citrate synthase enzyme, which in turn modulates the concentration of TCA intermediates.

Among the molecules characterized by urine metabolomics, these are the only containing sulfur and the concentration of all of them has been found altered by probiotics administration. Moreover, p-cresol sulfate and taurine have been found also positively correlated to lactate concentration in blood post-exercise. These molecules seem therefore to suggest that sulfur metabolism may play a role in the highlighted energy metabolism changes. The non-proteogenic amino acid taurine plays a pivotal role in skeletal muscle development and high excretion of it through urine has been even associated to disuse-related muscle atrophy. Dimethyl sulfone has been found to protect horses from systemic inflammation connected to exercise injuries, probably by exerting a scavenging effect on reacting oxygen species, so that it may even be employed as a horse food additive.

## **5. List of publications produced as part of the doctoral study**

- Zhu C, Li C, Wang Y and Laghi L (2019) Characterization of yak common biofluids metabolome by means of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Metabolites* 9(3):41.
- Zhu C, Vitali B, Donders G, Parolin C, Li Y and Laghi L (2019) Univariate statistical analysis as a guide to <sup>1</sup>H-NMR spectra signal assignment by visual inspection, *Metabolites*, 9(1):15.
- Zhu C, Faillace V, Laus F, Bazzano M and Laghi L (2018) Characterization of trotter horses urine metabolome by means of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Metabolomics*, 14(8):106.
- Laghi L, Zhu C, Campagna G, Rossi G, Bazzano M and Laus F (2018) Probiotic supplementation in trained trotter horses: effect on blood clinical pathology data and urine metabolomic assessed in field, *J Appl Physiol*, 125(2):654-660.
- Elmi A, Ventrella D, Laghi L, Carnevali G, Zhu C, Pertile G, Barone F, Benfenati F and Bacci ML (2019) <sup>1</sup>H NMR spectroscopy characterization of porcine vitreous humor in physiological and photoreceptor degeneration conditions, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 60(2):741-747.
- Foschi C, Salvo M, Laghi L, Zhu C, Ambretti S, Marangoni A and Re M.C (2018) Impact of meropenem on *Klebsiella pneumoniae* metabolism, *PLoS ONE*, 13(11): e0207478.
- Foschi C, Laghi L, D'Antuono A, Gaspari V, Zhu C, Dellarosa N, Salvo M and Marangoni A. (2018) Urine metabolome in women with *Chlamydia trachomatis* infection, *PLoS ONE*, 13(3): e0194827.
- Parolin C, Foschi C, Laghi L, Zhu C, Banzola N, Gaspari V, D'Antuono A, Giordani B, Severgnini M, Consolandi C, Salvo M, Cevenini R, Vitali B and Marangoni A (2018) Insights into vaginal bacterial communities and metabolic profiles of *chlamydia trachomatis* infection: positioning between eubiosis and dysbiosis, *Front Microbiol*, 9:600.
- Baldassarre ME, Di Mauro A, Tafuri S, Rizzo V, Gallone MS, Mastromarino P, Capobianco D, Laghi L, Zhu C, Capozza M and Laforgia N (2018). Effectiveness and safety of a probiotic-mixture for the treatment of infantile colic: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial with fecal real-time PCR and NMR-based metabolomics analysis, *Nutrients*, 10(2):195.
- Bazzano M, Laghi L, Zhu C, Magi GE, Serri E, Spaterna A, Tesei B and Laus F (2018) Metabolomics of tracheal wash samples and exhaled breath condensates in healthy horses and horses affected by equine asthma, *J Breath Res*, 12(4):046015.
- Laghi L, Mastromarino P, Elisei W, Capobianco D, Zhu C, Picchio M, Giorgetti G, Brandimarte G. and Tursi A (2018) Impact of treatments on fecal microbiota and fecal metabolome in symptomatic uncomplicated diverticular disease of the colon: a pilot study, *J Biol Regul Homeost Agents*, 32(5):1421-1432.
- Zampiga M, Laghi L, Petracci M, Zhu C, Meluzzi A, Dridi S and Sirri F (2018) Effect of dietary arginine to lysine ratios on productive performance, meat quality, plasma and muscle metabolomics profile in fast-growing broiler chickens, *J Anim Sci Biotechnol*, 9(1):79.