



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DEPARTMENT
OF AGRICULTURAL
AND FOOD SCIENCES

**Dottorato in Scienze e Tecnologie Agrarie,
Ambientali e Alimentari**

GIORNATA DEL DOTTORATO 2025
Tematica di ricerca:
“Scienze e Biotecnologie degli
Alimenti”

30 Maggio 2025
Villa Almerici, Cesena



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

PHD PROGRAMME

AGRICULTURAL, ENVIRONMENTAL AND FOOD SCIENCE
AND TECHNOLOGY

INDICE

DOTTORANDI ISCRITTI AL I ANNO (XL CICLO)

Erica Bensmail, *“Ingredienti ed alimenti contenenti fonti proteiche alternative: valutazione della qualità sensoriale e dell'accettabilità”*

Martina Filippini, *“Microbial biodiversity as a sustainable strategy for innovative plant-based fermented products”*

Irene Gandolfi, *“Valorizzazione biotecnologica di leguminose per l'ottenimento di ingredienti ad alto valore aggiunto da impiegare in formulazioni alimentari plant based”*

Mario Guida, *“Metodologie innovative e sostenibili per l'estrazione e la caratterizzazione di composti bioattivi e ad alto valore aggiunto ottenuti da sottoprodotti della filiera agro-alimentare”*

Ruiqi Hu, *“Study on the effect and mechanism of action of chitosan on fixed compounds, polyphenolics, volatiles substances and color of red wines and beers”*

Rui Song, *“Application of non-thermal assisted processing for food stabilization and functionalization”*

DOTTORANDI ISCRITTI AL II ANNO (XXXIX CICLO)

Davide Addazii, *“Risk assessment dell'effetto degli xenobiotici sul microbiota intestinale umano”*

Emilia Luigia Antenucci, *“Poultry meat downgrading: insights on the underpinning factors to improve the sustainability of the production”*

Valentina Antonioni, *“Antiossidanti naturali tailor made: valutazione comparativa di antiossidanti nell'elaborazione di alimenti, mangimi e pet food e determinazione delle condizioni d'uso ottimali”*

Silvia Arduini, *“Strategie di autenticazione di bevande spiritose e di prodotti del settore vitivinicolo”*

Giulio Giannini, *“Development and optimization of new processing and packaging technologies for fresh-cut fruit”*

Sona Hajiyeva, *“Determination of new types of food coloring and application in food products with a biotechnological basis”*

Busra Oktar, *“Emerging processing technologies for sustainable production of innovative foods”*

Lorenzo Oliverio, *“Application of high-resolution nuclear magnetic resonance (HR-NMR) to evaluate the antioxidant properties of natural compounds used to extend the shelf life of food products rich in unsaturated lipid components”*

Claudia Troisi, *“Approcci innovativi per la messa a punto e la valutazione delle performance di nuove miscele di frittura attraverso analisi chimico-fisiche e sensoriali”*

DOTTORANDI ISCRITTI AL III ANNO (XXXVIII CICLO)

Solidea Amadei, *“Valorisation of alternative protein sources by tailored biotechnological processes and non-thermal technologies to obtain new ingredients to be used in the formulation of innovative foods”*

Chiara Angelucci, *“Use of non-thermal treatments to improve the quality, safety, and shelf-life of fresh sausages”*

Marianna Ciccone, *“Microbial biopolymers for innovative packaging to increase food shelf-life and safety”*

Federico Drudi, *“Application of innovative technologies for the functionalisation of alternative proteins and the associated functional and rheological characterisation”*

Mara Antonia Gagliano, *“Combining instrumental and sensory methods to assess food products of animal origin”*

Yogesh Kumar, *“Study on dealcoholized wine and exploitation of winery byproducts: a multidisciplinary perspective from processing and sensory science”*

Joel Armando Njieukam, *“Messa a punto di un coating attivo bio-based per cartone ondulato ad azione antimicrobica”*

Giulia Salvatori, *“Impatto dei fattori di processo e dei sottoprodotti agro-alimentari sulla stabilità ossidativa e chimico-fisica di oleogel”*

Giovanni Selva, *“Novel algorithms and software tools for LR-NMR applications in food science and technology”*

Fatemeh Shanbeh Zadeh, *“Improvement of quality and nutritional value of foods using natural compounds and mild biotechnologies”*

Rosalba Tucci, *“Analysis of volatilome of virgin olive oils and flavoured oils: quality grade evaluation and study of modification during storage”*

Sofia Zantedeschi, *“Fostering sustainability in the olive oil supply chain: valorization of typical virgin olive oils, olive mill by-products and waste”*

DOTTORANDI ISCRITTI AL I ANNO

(XL CICLO)

Ingredienti ed alimenti contenenti fonti proteiche alternative: valutazione della qualità sensoriale e dell'accettabilità

Erica Bensmail (email: erica.bensmail2@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: XL; Anno di frequenza: I

Tutor: Prof.ssa Tullia Gallina Toschi; Co-tutor: Dott.ssa Matilde Tura, Dott.ssa Rosalba Roccatello

1. Curriculum

Dottoranda presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari dell'Università di Bologna da ottobre 2024. Tutor didattico presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari dell'Università di Bologna per l'insegnamento "Analisi chimiche e sensoriali dei prodotti alimentari (c.i.)" del Corso di Laurea in Tecnologie Alimentari.

Formazione: Laureata in Tecnologie Alimentari (Università di Bologna) nel 2022, consegue presso l'Università di Bologna la Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari con lode nel 2024.

Attività didattica: Nell'A.A. 2021-2022 ha svolto attività di supporto alla didattica nel contesto dell'insegnamento "Scienze merceologiche e tecnologie alimentari" (SSD AGR/15) del Corso di Laurea in Dietistica e dell'insegnamento "Tecnologie alimentari e impatto ambientale", relativamente al modulo tenuto dalla Prof.ssa Tullia Gallina Toschi (SSD AGR/15) del corso di Laurea in Scienze del territorio e dell'ambiente agro-forestale.

Negli A.A. 2022-2023 e 2023-2024 è stata tutor didattico per l'insegnamento "Scienze merceologiche e tecnologie alimentari" (SSD AGR/15) del Corso di Laurea in Dietistica.

Attività scientifica: Borsista di ricerca presso il Laboratorio di Chimica, Analisi Strumentali e Sensoriali degli Alimenti del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari dell'Università di Bologna, da maggio 2022 a settembre 2022 (titolo della borsa: "Caratterizzazione strumentale di semi di canapa contenenti lipidi").

Altre attività: Nel 2022 ha partecipato alla Summer School "Measuring Sensory Preferences of Consumers" organizzata dall'Alma Mater Studiorum-Università di Bologna.

2. Stato dell'arte

Diversificare le abitudini alimentari della popolazione, attraverso l'inclusione di fonti proteiche alternative, è una strategia efficace per affrontare sfide globali come il cambiamento climatico, la scarsità di risorse naturali, la sicurezza alimentare e la malnutrizione (European Commission, 2023). Tuttavia, per diversificare la composizione proteica nella dieta, è necessario identificare fonti proteiche sostenibili, accessibili e accettate dai consumatori. Si stima che entro il 2050 la popolazione mondiale raggiungerà i 9 miliardi, con un conseguente ipotetico raddoppio della domanda di alimenti di origine animale, considerando anche l'incremento del reddito nei paesi industrializzati (Fiorentini *et al.*, 2020). L'incremento della produzione di carne è responsabile di elevate emissioni di CO₂, di un consumo significativo di acqua e di potenziali rischi per il benessere animale e la salute umana (Sogari *et al.*, 2023; Bonnet *et al.*, 2020). Per questo motivo, è auspicabile associare all'apporto di proteine di origine animale altri ingredienti sostenibili (Cordelle *et al.*, 2022). Inoltre, si registra un incremento dell'interesse verso regimi alimentari che riducono o eliminano il consumo di carne, come quelli vegetariani, vegani e flexitariani e questo stimola lo sviluppo di alimenti a base di ingredienti proteici di origine vegetale da parte delle industrie (Sogari *et al.*, 2023). Legumi, cereali, funghi e semi oleosi sono i prodotti più studiati talora anche, a ragione o a torto, con l'intento di replicare gusto, aspetto e consistenza dei prodotti carnei (Starowicz *et al.*, 2022). D'altro canto, la produzione di proteine alternative con caratteristiche sensoriali simili a quelle di prodotti di origine animale, a costi contenuti, rappresenta ancora una sfida (Fiorentini *et al.*, 2020; Sogari *et al.*, 2023). Altre fonti proteiche alternative includono alghe, microalghe, proteine microbiche prodotte tramite fermentazione, carne coltivata e insetti edibili, alcune delle quali classificate come "Novel Food" e soggette, quindi, ad autorizzazione da parte dell'EFSA (European Commission, 2023; Morach *et al.*, 2021). Per favorire l'accettabilità e, di conseguenza, le possibilità di successo di alcune di queste alternative, è fondamentale studiarne le caratteristiche sensoriali, in particolare gusto e aspetto esteriore (Cordelle *et al.*, 2022). In aggiunta, è fondamentale la comprensione delle determinanti che influenzano il comportamento alimentare. Leve e barriere al consumo sono influenzate da variabili biologiche, psicologiche, sociali e culturali. Tra i diversi approcci, strumenti come interviste, questionari e tecniche implicite delle scienze cognitive aiutano a indagare valori, motivazioni e atteggiamenti (Clicerici *et al.*, 2018). Inoltre, gli studi sensoriali sulle consumatrici e consumatori possono fornire una comprensione realistica dell'accettabilità dei prodotti alternativi (Sogari *et al.*, 2023). La combinazione dell'analisi descrittiva e di successivi test edonistici rappresenta un approccio efficace per valutare e migliorare il profilo sensoriale dei prodotti a base di proteine alternative (Fiorentini *et al.*, 2020), sebbene il numero di studi specifici in questo ambito resti ancora limitato (Sogari *et al.*, 2023).

3. Obiettivi e risultati attesi

Il presente progetto di ricerca si propone di valutare la qualità sensoriale e tecnologico-analitica di prodotti alimentari formulati con ingredienti da fonti proteiche alternative di origine vegetale, con l'obiettivo ultimo di determinare le leve e le barriere che influiscono sull'accettabilità di questi prodotti da parte di chi consuma.

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

A1) Ricerca bibliografica sui metodi di indagine relativi alle abitudini alimentari e alle attitudini dei consumatori, nonché sulle metodiche di analisi sensoriale, sia descrittiva che edonica, al fine di valutare nuovi alimenti formulati con proteine alternative; sulle analisi chimiche e strumentali impiegate per valutarne le caratteristiche compositive in grado di influenzarne il profilo sensoriale, ma anche nutrizionale di questi ingredienti/alimenti.

A2) Messa a punto e somministrazione di interviste, questionari e focus group, al fine di determinare le abitudini alimentari e le attitudini delle consumatrici e dei consumatori.

A3) Valutazione delle formulazioni e selezione dei campioni da sottoporre ad analisi

A4) Valutazioni analitiche e strumentali (profilo in composti volatili, profilo proteico e lipidico), al fine di identificare molecole, come i marcatori olfattivi, che possano influire sul profilo sensoriale dei prodotti, nonché i macronutrienti di interesse per questa tipologia di prodotti.

A5) Formazione del panel e analisi sensoriale descrittiva tramite metodi convenzionali (*Quantitative Descriptive Analysis®*) e/o rapidi (*Flash Profile*, *Free Choice Profile*), sulla base dei prodotti oggetto di valutazione.

A6) Analisi sensoriali con i consumatori, metodi descrittivi (*Chack-All-That-Apply*) e affettivi, con particolare attenzione alla valutazione del gradimento, delle attese e delle emozioni (in modalità *blind* e/o informata), nonché della disponibilità a comprare, accompagnati da indagini psico-attitudinali (neofobia alimentare, senso di disgusto, percezione del rischio) e fisiologiche.

A7) Controllo ed elaborazione dei dati costante

A8) Scrittura di poster, relazioni orali, articoli scientifici, della tesi di dottorato e della dissertazione finale

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 e somministrazione dei questionari</i>																			
A3) <i>Valutazione delle formulazioni e selezione dei campioni</i>																			
A4) <i>Valutazioni analitiche e strumentali</i>																			
A5) <i>Formazione del panel e analisi sensoriale descrittiva</i>																			
A6) <i>Analisi sensoriali con le consumatrici e i consumatori</i>																			
A7) <i>Continuo controllo ed elaborazione dei dati</i>																			
A7) <i>Scrittura di poster, relazioni orali, articoli scientifici, della tesi di dottorato e della dissertazione finale</i>																			

4. Bibliografia

- Bonnet C, Bouamra-Mechemache Z, Réquillart V, Treich N (2020) Regulating meat consumption to improve health, the environment and animal welfare, *Food Policy* 97: 101847.
- Clicerì D, Spinelli S, Dinnella C, Prescott J, Monteleone E (2018) The influence of psychological traits, beliefs and taste responsiveness on implicit attitudes toward plant-and animal-based dishes among vegetarians, flexitarians and omnivores, *Food Qual. Prefer.* 68: 276-291.
- Cordelle S, Redl A, Schlich P (2022) Sensory acceptability of new plant protein meat substitutes, *Food Qual. Prefer.* 98: 104508.
- European Commission (2023) Food 2030 Research and Innovation – Pathways for action 2.0: Research and innovation policy as a driver for sustainable, healthy, climate-resilient and inclusive food systems, pp. 69-77.
- Fiorentini M, Kinchla AJ, Nolden AA (2020) Role of sensory evaluation in consumer acceptance of plant-based meat analogs and meat extenders: A scoping review, *Foods* 9(9): 1334.
- Morach B, Witte B, Walker D, von Koeller E, Grosse-Holz F, Rogg J, Brigl M, Dehnert N, Obloy P, Koktenturk S, Schulze U (2021). Food for thought: The protein transformation, *Ind. Biotechnol.* 17(3): 125-133.
- Sogari G, Caputo V, Petterson AJ, Mora C, Boukid F (2023) A sensory study on consumer valuation for plant-based meat alternatives: What is liked and disliked the most?, *Food Res. Int.* 169: 112813.
- Starowicz M, Poznań KK, Zieliński H (2022) What are the main sensory attributes that determine the acceptance of meat alternatives?, *Curr. Opin. Food Sci.* 48: 100924.

Microbial biodiversity as a sustainable strategy for innovative plant-based fermented products

Martina Filippini (email: martina.filippini4@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: XL; Anno di frequenza: I

Tutor: Prof.ssa Giulia Tabanelli; Co-tutor: Dott.ssa Federica Barbieri

1. Curriculum

Novembre 2024 - Oggi: Dottorato di ricerca in Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari presso l'Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Campus di Cesena

Aprile 2023: Laurea Magistrale in Food Safety and Food Risk Management presso l'Università di Bologna e l'Università di Parma. Tesi sull'analisi del rischio nella filiera alimentare e sul benessere animale dal titolo “*Caratterizzazione genomica di ceppi di Enterobacter spp. isolati da alimenti artigianali di origine animale*” (tutor: Prof.ssa Frédérique Pasquali)

Novembre 2021: Abilitazione alla professione di Agrotecnico e Agrotecnico Laureato conseguita presso l'Istituto di Istruzione Superiore Lazzaro Spallanzani (MO).

Marzo 2020: Laurea Triennale in Scienze del territorio e dell'ambiente agro-forestale presso l'Università di Bologna, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari. Tesi triennale in biotecnologie microbiche in ambito agroforestale dal titolo “*Sintesi microbica di bioplastiche: una soluzione per il futuro?*” (tutor: Prof.ssa Loredana Baffoni)

2. Stato dell'arte

Con l'aumentare della popolazione globale e la conseguente urbanizzazione, si è assistito ad un aumento della domanda di alimenti ricchi di proteine, soprattutto nei paesi in via di sviluppo. La dieta mediterranea, nota per la sua versatilità e adattabilità tra culture diverse, promuove la salute e il benessere generale. Una dieta più sana comporta la riduzione del consumo di grassi saturi e trans, zuccheri e sale, e l'aumento del consumo di alimenti di origine vegetale (Caprara, 2021). Negli ultimi 50 anni, la domanda di proteine di origine animale è più che raddoppiata, generando sfide ambientali quali l'uso del suolo, l'eutrofizzazione delle acque e le rilevanti emissioni di gas serra (Seto & Ramankutty, 2016; Global Panel, 2016). Con la crescente consapevolezza degli effetti negativi della carne sull'ambiente e sulla salute, i sostituti vegetali della carne stanno emergendo come alternative sane e sostenibili.

Frutta secca e legumi sono ricchi di nutrienti e contengono composti bioattivi, rendendoli ideali per lo sviluppo di alimenti multifunzionali (Aschemann-Witzel *et al.*, 2021). Queste materie prime possono essere impiegate per lo sviluppo di alimenti fermentati a base vegetale. La fermentazione è un metodo sostenibile e a basso impatto che offre vantaggi rispetto alle tecniche convenzionali di trasformazione per l'ottenimento di alimenti ultra-processati. Tuttavia, gli alimenti fermentati di origine vegetale sono ancora poco diffusi sul mercato.

Le comunità microbiche, in particolare i batteri lattici (LAB) e gli Stafilococchi, svolgono un ruolo fondamentale nella fermentazione, contribuendo alla sicurezza del prodotto, al prolungamento della sua shelf life, alla sua qualità ed al profilo aromatico (Sánchez Mainar *et al.*, 2017). Studiare e selezionare nuovi ceppi microbici da fermentazioni naturali è essenziale per migliorare le innovazioni future nel campo degli alimenti vegetali e mettere a punto dei processi “su misura” per determinati prodotti e materie prime.

3. Obiettivi e risultati attesi

L'obiettivo di questo progetto è quello di valorizzare la biodiversità microbica riscontrata nelle fermentazioni spontanee di matrici di diversa origine attraverso la caratterizzazione delle popolazioni microbiche e lo studio di ceppi peculiari e delle loro performance tecnologiche e funzionali *in vitro* e in sistema alimentare.

I risultati attesi riguardano lo sviluppo di strumenti biotecnologici per la costituzione di consorzi fermentativi destinati a substrati vegetali non convenzionali come frutta secca e legumi, e la creazione di prototipi alimentari innovativi, sicuri e salutari con caratteristiche peculiari.

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

A 1) Ricerca bibliografica e attività di divulgazione presso convegni.

A 2) Isolamento e caratterizzazione di batteri lattici (LAB) e stafilococchi autoctoni da matrici fermentate naturalmente. Questa fase ha l'obiettivo di delineare un quadro completo della biodiversità microbica presente nelle popolazioni microbiche isolate da alimenti fermentati spontaneamente. I prodotti fermentati spontaneamente, ottenuti senza l'uso di colture starter, verranno utilizzati come fonte di batteri lattici e stafilococchi autoctoni. Una volta costituita la collezione

microbica, i ceppi verranno valutati per caratteristiche di sicurezza (inclusa la resistenza agli antimicrobici (AMR) e la produzione di ammine biogene) e tecnologiche.

A 3) Progettazione di consorzi microbici per la fermentazione di substrati vegetali (es. frutta secca e legumi). Questa fase si concentrerà sull'esplorazione di diverse combinazioni di ceppi microbici per creare consorzi capaci di fermentare efficientemente specifici substrati vegetali, come frutta secca o legumi, anche considerati come loro sottoprodotti o scarti (es. frutta secca rotta, difettosa esteticamente o sottodimensionata). Verranno utilizzati modelli di laboratorio, come piastre a 24 pozzetti profondi, per fermentare piccoli volumi di substrato con i consorzi selezionati.

A 4) Ottimizzazione del processo fermentativo, caratterizzazione dei prototipi ottenuti e miglioramento delle caratteristiche di sicurezza e qualità. Il processo fermentativo verrà avviato su scala di laboratorio e/o pilota, con l'obiettivo di caratterizzare il prototipo ottenuto, ottimizzando la sicurezza del prodotto, il profilo aromatico e la potenziale shelf-life.

A 5) Scrittura della tesi.

Tabella 1. Diagramma di Gantt delle 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) Ricerca bibliografica																			
A2) Isolamento e caratterizzazione dei ceppi microbici																			
1) Isolamento e purificazione degli isolati (LAB e Stafilococchi)																			
2) Identificazione molecolare dei ceppi																			
3) Caratterizzazione dei ceppi per caratteristiche di sicurezza, proprietà tecnologiche e attività antimicrobica																			
A3) Progettazione dei consorzi microbici per la fermentazione																			
1) Fermentazione su di un modello di substrati vegetali con coppie di ceppi LAB																			
2) Aggiunta di stafilococchi selezionati ai consorzi LAB e caratterizzazione del profilo aromatico																			
3) Ottimizzazione della fermentazione di differenti substrati																			
A4) Ottimizzazione del processo fermentativo																			
1) Analisi dei rischi biologici associati ai prodotti fermentati innovativi da frutta secca o legumi																			
2) Miglioramento della funzionalità e della qualità dei prodotti fermentati innovativi ottenuti																			
3) Valutazione sensoriale dei prodotti fermentati innovativi e non convenzionali																			
A5) Scrittura della tesi																			

4. Bibliografia

- Aschemann-Witzel J, Futtrup Gantriis R, Fraga P, Perez-Cueto F (2021) Plant-based food and protein trend from a business perspective: markets, consumers, and the challenges and opportunities in the future, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 61: 3119–3128.
- Global Panel (2016) Global Panel on Agriculture and Food Systems for Nutrition: Food systems and diets. Rome: FAO.
- Caprara G (2021) Mediterranean-Type Dietary Pattern and Physical Activity: The Winning Combination to Counteract the Rising Burden of Non-Communicable Diseases (NCDs). Impact of High Fiber Diet, High Protein Diet and Low Carbohydrate Diet and of Fat mass on Diseases Prevention and Treatment, Nutrients 13(2): 429.
- Sánchez Mainar M, Stavropoulou D, Leroy F (2017) Exploring the metabolic heterogeneity of coagulase negative staphylococci to improve the quality and safety of fermented meats: a review, Int. J. Food Microbiol. 247: 24-37.
- Seto KC, Ramankutty N (2016) Hidden linkages between urbanization and food systems, Science, 352(6288): 943–945.

Valorizzazione biotecnologica di leguminose per l'ottenimento di ingredienti ad alto valore aggiunto da impiegare in formulazioni alimentari plant based

Irene Gandolfi (irene.gandolfi4@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: XL; Anno di frequenza: I

Tutor: Patrignani Francesca; Co-tutor: Gottardi Davide, Lanciotti Rosalba

1. Curriculum

Ho conseguito la Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari presso l'Alma Mater Studiorum – Università di Bologna nel 2024, con la votazione di 110/110 e Lode. La mia tesi sperimentale, dal titolo “*Utilizzo di starter commerciali per differenziare il profilo aromatico di leguminose*”, è stata condotta in collaborazione con le aziende Macè e Novonesis. In precedenza, ho conseguito la Laurea Triennale nella medesima disciplina presso l'Università degli Studi di Parma, approfondendo nella tesi gli aspetti produttivi e qualitativi del latte di capra ad uso alimentare.

Durante il mio percorso universitario ho maturato esperienze pratiche rilevanti attraverso diversi tirocini formativi: presso la Centrale del Latte di Brescia ho svolto attività di controllo qualità su latte e derivati; presso Emmefood ho collaborato a procedure di tracciabilità, shelf-life e sicurezza alimentare; infine, presso Macè srl, ho partecipato a progetti di Ricerca & Sviluppo focalizzati su matrici leguminose fermentate, con attività di laboratorio chimico-fisiche e test su confezionamento.

Nell'anno accademico 2023/24 ho svolto il ruolo di tutor accademico per il corso di Scienze e Tecnologie Alimentari dell'Università di Bologna, sede di Cesena, con compiti di supporto allo studio, interfaccia tra studenti e docenti e partecipazione attiva al Consiglio di Assicurazione Qualità.

Da novembre 2024 ho iniziato il Dottorato di Ricerca in Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari presso l'Università di Bologna. Il mio progetto di ricerca è focalizzato sulla valorizzazione biotecnologica di leguminose al fine di ottenere ingredienti innovativi ad alto valore aggiunto per alimenti plant-based. A maggio 2025 ho presentato al Macfrut di Rimini una relazione sulla collaborazione tra università e impresa. Ho inoltre sottomesso un abstract per EFFoST 2025 a Porto.

2. Stato dell'arte

Negli ultimi anni, la crescente sensibilità dei consumatori verso la sostenibilità ambientale, l'equilibrio nutrizionale e la salute ha favorito un'importante transizione verso alimenti plant-based, come osservato da Sottile (2023). Questo cambiamento si riflette nella diffusione di modelli alimentari come veganismo, vegetarianismo e flexitarianismo (Cramer *et al.*, 2017; Sabaté & Soret, 2014). Parallelamente, la crescita demografica e la necessità di adottare diete più sostenibili comporteranno un aumento della domanda globale di fonti proteiche entro il 2030 (FAO, 2021). In tale contesto, l'industria alimentare è chiamata a sviluppare strategie capaci di soddisfare questa domanda, garantendo al contempo la qualità sensoriale, la sicurezza e il valore nutrizionale dei prodotti (McDermott, 2021). Ciò ha portato allo sviluppo di alternative vegetali che imitano le caratteristiche dei prodotti lattiero-caseari. In particolare, i prodotti a base di legumi offrono un elevato contenuto proteico, ma presentano anche alcune limitazioni, come la presenza di composti indesiderati (es. aldeidi responsabili di sentori erbacei), oligosaccaridi fermentabili (raffinose) e fattori antinutrizionali quali i fitati, che riducono l'assorbimento minerale (Shi *et al.*, 2021; Coda *et al.*, 2015). Per superare queste criticità, si stanno sempre più utilizzando approcci biotecnologici basati sull'impiego di microrganismi sicuri (GRAS), in grado di migliorare le proprietà nutrizionali e sensoriali delle matrici leguminose. Ad esempio, Jhan *et al.* (2015) hanno dimostrato che *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Bacillus subtilis* possono aumentare la concentrazione di antiossidanti nei fagioli rossi, mentre *Lactiplantibacillus plantarum* è stato invece impiegato per attenuare le note sensoriali sgradevoli tipiche dei legumi (Shi *et al.*, 2021) e per ridurre la presenza di inibitori della tripsina e di tannini, migliorando la digeribilità proteica (Coda *et al.*, 2015). A questi processi possono essere affiancate tecnologie non termiche, l'Alta Pressione Idrostatica (HPP), in grado di migliorare la funzionalità, la stabilità e la sicurezza microbiologica degli ingredienti vegetali (Fasolin *et al.*, 2019; Tabilo-Munizaga *et al.*, 2019). Inoltre, l'applicazione dell'HPP a proteine di legumi ha mostrato di facilitare l'idrolisi enzimatica e la liberazione di peptidi bioattivi, mantenendo elevata la sicurezza alimentare (Seyed *et al.*, 2021). Queste tematiche sono strettamente collegate al mio progetto di dottorato, che si propone di sviluppare formaggi vegetali a base di legumi attraverso l'impiego di matrici proteiche fermentate, in combinazione con differenti tipologie di grassi, tecniche di sgrondatura e pressatura. L'obiettivo è ottenere un prodotto alternativo, nutrizionalmente valido e sensorialmente accettabile, valorizzando le leguminose attraverso l'innovazione biotecnologica e tecnologica.

3. Obiettivi e risultati attesi

Il presente progetto di ricerca si propone di valutare e sviluppare sostituti vegetali di prodotti lattiero caseari (plant-based alternative dairy) ad alto tenore proteico, utilizzando legumi come materia prima in combinazione con processi biotecnologici e tecnologie non termiche. Il progetto di tesi di dottorato può essere suddiviso nelle seguenti attività, riepilogate nel diagramma di Gantt riportato in tabella 1:

- A1) Ricerca bibliografica** sulle matrici leguminose e i ceppi microbici utilizzati da altri studi su questi substrati.
A2) Valutazione di diversi sistemi di preparazione dei campioni al fine di individuare la metodica che consenta la creazione di texture e prodotti differenti, modificando le formulazioni e le condizioni di crescita.
A3) Analisi dei campioni mediante varie tecniche di analisi ed elaborazione statistica dei dati ottenuti. L'analisi dei dati consente di osservare le modifiche apportate dalla fermentazione alla matrice sia in termini compositivi (quantitativi e qualitativi) sia strutturali.
A4) Studi di shelf life e applicazioni a livello industriale; in questo senso si intende effettuare uno studio nel tempo dei prodotti realizzati e valutarne uno scale up di processo.
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) Ricerca bibliografica																			
1) studio matrici leguminose e studi affini																			
2) valutazione di ceppi microbiologici applicati a prodotti simili																			
A2) Valutazione di diversi sistemi di preparazione dei campioni																			
1) prove su varie matrici e ceppi differenti																			
2) combinazioni di grassi vegetali e differenti metodi di sgrondo																			
A3) Analisi dei campioni mediante varie tecniche di analisi																			
1) microbiologiche																			
2) altre (proteine, antiossidanti, composti anti nutrizionali...)																			
3) reologiche																			
A4) Studio di shelf life e applicazione a livello industriale																			
1) studio e preparazione dei campioni																			
2) monitoraggio e raccolta dati																			
3) prove scale up																			
A5) Scrittura della tesi di dottorato, poster, articoli scientifici e presentazione orale																			

4. Bibliografia

- Coda R, Melama L, Rizzello CG, Curiel JA, Sibakov J, Holopainen U, Pulkkinen M, Poutanen K (2015) Effect of air classification and fermentation by *Lactobacillus plantarum* VTT E-133328 on faba bean (*Vicia faba* L.) flour nutritional properties, Int. J. Food Microbiol. 193: 34–42.
- Cramer H, Kessler CS, Sundberg T, Leach M J, Schumann D, Adams J, Dobos G (2017) Characteristics of Americans choosing vegetarian and vegan diets: Results from a nationally representative survey, Nutr. J. 16(1): 1-9.
- FAO (2021) The future of food and agriculture – Trends and challenges. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Jhan M, Chang Y, Wang M (2015) Enhancing the antioxidant properties of red beans (*Phaseolus vulgaris*) by fermentation with *Bacillus subtilis*, Int. J. Food Sci. Technol. 50(12): 2615–2622.
- McDermott, J (2021) Future diets: Balancing health, food security, and environmental sustainability, Nature Food 2: 69–70.
- Sabaté J, Soret S (2014) Sustainability of plant-based diets: Back to the future, Am. J. Clin. Nutr. 100(suppl_1): 476S–482S.
- Seyed A, Sun Y, Zhang B (2021) Impact of high-pressure processing on legume proteins: Functional, structural and nutritional aspects, Trends Food Sci. Technol. 115: 492–506.
- Shi Y, Wang Y, Song R, Zhang Q, Wang Y (2021) Application of *Lactiplantibacillus plantarum* fermentation to improve the flavor and quality of legume-based beverages, LWT - Food Sci. Technol. 150: 111958.
- Sottile F (2023) Plant-based food consumption and sustainable diet trends in Europe, Agriculture and Agricultural Science Procedia, 27: 116–123.
- Tabilo-Munizaga G, Pérez-Won M, Vega-Gálvez A, Lemus-Mondaca R (2019) Application of high-pressure homogenization (HPH) to produce lentil protein nanoemulsions: Effect on physicochemical properties and stability, J. Food Eng. 246: 134–141.

Metodologie innovative e sostenibili per l'estrazione e la caratterizzazione di composti bioattivi e ad alto valore aggiunto ottenuti da sottoprodotti della filiera agro-alimentare

Mario Guida (email: mario.guida2@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: XL; Anno di frequenza: I

Tutor: Enrico Valli; Co-tutor: Alessandra Bendini, Enrico Casadei

1. Curriculum

Mi chiamo Mario Guida e sono attualmente dottorando in Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari presso l'Università di Bologna. Nell'ambito del progetto di dottorato mi occupo del recupero di composti bioattivi e ad alto valore aggiunto da sottoprodotti agro-alimentari. Dopo aver conseguito la laurea triennale in Tecnologie Alimentari presso l'Università Federico II di Napoli, ho completato la laurea magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari all'Università di Bologna con lode, con una tesi svolta presso l'università di Wageningen incentrata sulla caratterizzazione proteomica di prodotti analoghi della carne vegetale, tramite indagini analitiche specifiche (LC-MS/MS) e l'utilizzo di software statistici, di reti neurali e di analisi dati. Dopo il conseguimento della laurea magistrale, prima dell'inizio del dottorato, sono risultato vincitore di due borse di ricerca, la prima erogata dall'Alma Mater Studiorum - Università di Bologna dal titolo "Analisi strumentali e sensoriali per valutare la qualità di prodotti alimentari" focalizzata su determinazioni analitiche per la valutazione della qualità e dell'autenticità degli alimenti, in particolare di oli vergini di oliva e la seconda in collaborazione con l'Università di Parma ed EFSA (European Food Safety Authority), dal titolo "Individuazione e analisi di rischi emergenti nella filiera agro-alimentare del territorio della Regione Emilia-Romagna". La tematica scelta riguardava la contaminazione da idrocarburi degli oli minerali negli oli vergini di oliva. Ho contribuito come co-autore a tre poster scientifici, di cui uno dal titolo "Unveiling Extra Virgin Olive Oil Quality: Consumers' Preferences in a Real Tasting Environment" che ho presentato al convegno AISSA under 40. Ho una buona padronanza della lingua inglese (livello C1 nella produzione e interazione orale, B2 nella comprensione e scrittura), che utilizzo regolarmente per attività accademiche, webinar internazionali e collaborazioni scientifiche. Possiedo, inoltre, una conoscenza intermedia di francese e tedesco (livello B1). Durante il mio percorso accademico ho affinato competenze relazionali e organizzative. Sono stato rappresentante degli studenti durante il biennio di laurea magistrale e, attualmente, sono rappresentante dei dottorandi al Collegio docenti del Dottorato. Ho svolto attività di tutoraggio didattico (insegnamento di "Analisi degli alimenti", laurea triennale in Tecnologie Alimentari), contribuito alle attività della segreteria organizzativa di un convegno nazionale (SISTA1 2025) e partecipato attivamente all'associazione studentesca MySTA, contribuendo all'organizzazione di eventi divulgativi e formativi.

2. Stato dell'arte

L'adozione di pratiche innovative circolari per la gestione dei sottoprodotti del settore agro-alimentare è di fondamentale importanza al fine di promuovere la sostenibilità ambientale, economica e sociale. I sottoprodotti della filiera agro-alimentare possono avere un ruolo importante nella formulazione di nuovi prodotti, co-prodotti ed ingredienti funzionali e sostenibili destinati all'alimentazione umana ed animale (es. *pet food*), essendo generalmente ricchi di composti bioattivi e ad alto valore aggiunto (Comunian *et al.*, 2021). Composti quali proteine, lipidi, amidi, vitamine, minerali, fibre ed antiossidanti, possono essere estratti dai sottoprodotti utilizzando diverse tecniche di estrazione fisiche o chimiche (Torres-León *et al.*, 2018).

Negli ultimi anni, sono state impiegate e promosse tecnologie innovative e sostenibili per ottimizzare l'estrazione di componenti ad alto valore aggiunto, migliorandone la qualità e la funzionalità ed aumentandone le rese. Queste tecnologie emergenti, in parte già utilizzate nel settore alimentare, includono campi elettrici pulsati, estrazione assistita da ultrasuoni, essiccazione a radiofrequenza, alta pressione idrostatica e fluidi pressurizzati (estrazione con fluidi subcritici e supercritici) (Pradal *et al.*, 2016, Villacís-Chiriboga *et al.*, 2021).

Al fine di valutare la presenza di composti bioattivi e ad alto valore aggiunto ricavati dai sottoprodotti della filiera agro-alimentare e individuare eventuali composti indesiderati, è fondamentale effettuare indagini analitiche mirate. Tecniche quali la gas cromatografia e la cromatografia liquida abbinate a diversi tipi di rilevatori come lo spettrometro di massa (MS), a ionizzazione di fiamma (FID) e a serie di diodi (DAD) possono risultare idonee al fine di caratterizzare gli estratti ottenuti dai sottoprodotti della filiera agro-alimentare.

3. Obiettivi e risultati attesi

Questo progetto di ricerca si propone di individuare sottoprodotti della filiera agro-alimentare dai quali estrarre, tramite l'utilizzo di tecniche sostenibili, innovative ed efficienti, composti bioattivi e ad alto valore aggiunto e di caratterizzare

gli estratti ottenuti tramite indagini analitiche specifiche con l'obiettivo di addizionarli alle formulazioni di prodotti per l'alimentazione umana ed animale (*pet food*).

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

A1) Indagine sulle esigenze dei settori del *pet food* e alimentare: studio relativo alla definizione dei composti bioattivi e ad alto valore aggiunto che le industrie del *pet food* e alimentare hanno interesse a valorizzare e ad addizionare ai propri prodotti.

A2) Selezione di sottoprodotti della filiera agro-alimentare: selezione di sottoprodotti della filiera agro-alimentare dai quali estrarre i composti bioattivi e ad alto valore aggiunto.

A3) Selezione e messa a punto di tecniche estrattive efficaci e sostenibili: studio ed applicazione delle tecniche estrattive più idonee e sostenibili per l'estrazione di composti bioattivi da sottoprodotti della filiera agro-alimentare.

A4) Caratterizzazione degli estratti ottenuti: caratterizzazione analitica per la verifica della qualità e salubrità degli estratti ottenuti.

A5) Utilizzo degli estratti nella formulazione di prodotti alimentari: possibile impiego degli estratti in formulazioni per alimenti destinati al consumo umano e animale (*pet food*).

A6) Preparazione di articoli, contributi scientifici e della tesi.

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

Attività - mesi	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
A1) Indagine sulle esigenze dei settori del <i>pet food</i> e dell'alimentare																		
A2) Selezione di sottoprodotti della filiera agro-alimentare																		
1) Ricerca di possibili sottoprodotti da utilizzare: sottoprodotti della produzione di olio extra vergine di oliva quali sansa, acque di vegetazione e impurezze del nocciolino, sansa di pomodoro e canapa esausta.																		
2) Campionamento e stoccaggio dei sottoprodotti																		
A3) Selezione e messa a punto di tecniche estrattive efficaci e sostenibili																		
A4) Caratterizzazione degli estratti ottenuti																		
1) individuazione e quantificazione dei composti bioattivi e ad alto valore aggiunto presenti negli estratti tramite l'utilizzo di tecniche analitiche																		
2) analisi della qualità e salubrità degli estratti																		
A5) Utilizzo degli estratti nella formulazione di prodotti finiti																		
A6) Preparazione di articoli, contributi scientifici e della tesi																		

4. Bibliografia

- Comunian TA, Silva MP, Souza CJF (2021) The use of food by-products as a novel for functional foods: their use as ingredients and for the encapsulation process, *Trends Food Sci. Technol.* 108: 269–80.
- Rațu RN, Ionuț DV, Stoica F, Usturoi A, Nicolae Arsenoaia V, Crivei IC, Postolache AN, Lipsa FD, Filipov F, Florea AM, Chitea MA, Brumă IS (2013) Application of agri-food by-products in the food industry, *Agriculture* 13(8): 1559.
- Pradal D, Vauchel P, Decossin S, Dhulster P, Dimitrov K (2016) Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: extraction and energy consumption optimization, *Ultrason. Sonochem.* 32: 137–46.
- Torres-León C, Ramírez-Guzman N, Londoño-Hernandez L, Martínez-Medina GA, Díaz-Herrera R, Navarro-Macias V, Alvarez-Pérez OB, Picazo B, Villarreal-Vázquez M, Ascacio-Valdes J, Aguilar CN (2018) Food waste and byproducts: an opportunity to minimize malnutrition and hunger in developing countries, *Front. Sustain. Food Syst.* 2: 52.
- Villacís-Chiriboga J, Voorspoels S, Uytendaele M, Ruales J, Van Camp J, Vera E, Elst K (2021) Supercritical CO₂ extraction of bioactive compounds from mango (*Mangifera indica* L.) peel and pulp, *Foods* 10(9): 2201.

Study on the effect and mechanism of action of chitosan on fixed compounds, polyphenolics, volatiles substances and color of red wines and beers

Ruiqi Hu (ruiqi.hu3@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: XL; Anno di frequenza: I

Tutor: Fabio Chinnici

1. Curriculum

Ruiqi Hu graduated in 2024 with a Master's degree in Food Science at the Department of Food Science & Nutritional Engineering at the China Agricultural University.

Since November 2024, she has been studying for a PhD in Food Science at the University of Bologna. Her main research activities concern the changes in wine chemistry after adding chitosan (KT), with a focus on fixed compounds, phenolic and volatile profile and the oxidation status in wine and Fenton-like environment. Based on this, further research will investigate the effects and applications of KT in various alcoholic beverages, including red-white-rosé wines, as well as beers.

2. State of the art

Constituents of wines can react with significant amounts of oxygen, polyphenols being among the most readily oxidized wine constituents. Effective controlled oxidation could be beneficial for wine by enhancing and stabilizing color (Singleton, 1987). Wine polyphenolic substances are usually subdivided into two groups: flavonoids and non-flavonoid compounds. Flavonoids are the main determining factors affecting the color, astringency, and bitterness of grapes and wine. The most common wine flavonoid compounds are flavonols, flavan-3-ols, and anthocyanins. Non-flavonoid compounds are mainly derivatives of benzoic acid and of cinnamic acid.

Oxidation in wine can lead to a decrease in the phenolic compounds such as (+)-catechin, (–)-epicatechin, quercetin, caffeic acid and anthocyanins, and an increase in red polymeric pigments improving the wine color density (Castellari, Matricardi, Arfelli, Galassi, & Amati, 2000). During wine oxidation, a sequence of univalent reduction steps settles from oxygen up to water, via a Fe(II)/Fe(III) redox cycle where hydrogen peroxide (H₂O₂) and the highly reactive hydroxyl radical (HO•) are formed (Danilewicz, 2012; Waterhouse & Laurie, 2006). According to 'thermal' Fenton mechanism (as opposed to light-induced), the reduction of H₂O₂ to HO• is mediated by metals (e.g., by Fe(II)/Fe(III) redox couple) (Marin *et al.*, 2021). In this process wine polyphenols play a major role by redox cycling iron (Oliveira, Ferreira, De Freitas, & Silva, 2011). Fenton-derived HO• will also react with wine carboxylic acids such as tartaric acid, forming a carbon-centered radical derivative which undergoes oxidation and decarboxylation steps to yield glyoxylic acid. Accordingly, reducing the development of aldehydic oxidation intermediates would be a relevant strategy to maintain color and flavor of wines.

Chitosan (KT) is a main derivative of chitin and can be industrially obtained by N-deacetylating chitin through a process involving deproteinization, demineralization, decolorization, and deacetylation (Aranaz *et al.*, 2009). Through deacetylation, free amine groups (-NH₂) are produced along the polysaccharide backbone and result a polycationic character in KT, which depends on the deacetylation degree (DD) and molecule weight (MW) (Friedman & Juneja, 2010). The chemical structure of KT is highly to be functionalized with a vast diversity of ligands by means of reactions such as carbonylation, alkylation, sulfonation, carboxymethylation, and quaternization, which enlarge enormously the potential applicability of modified KT (Brasselet *et al.*, 2019; Higuera, López-Carballo, Gavara, & Hernández-Muñoz, 2015; Rocha, Coimbra, & Nunes, 2017). In the last decade, KT has been accepted by European Commission as a fining agent for treatment of wine, for different purposes: prevention of iron and copper casses, reduction of heavy metals or possible contaminants, especially ochratoxin A, and inhibition of unwanted microbial growth, particularly *Brettanomyces* spp.

It has quite recently been proposed that chitosan can complement sulfites in wine or other beverages, thanks to its antimicrobial behavior (Castro Marín, Donato, Milena, Claudio, & Chinnici, 2021). In addition, the intriguing antioxidant features demonstrated by this polymer make it a promising candidate for the production of sulfite-free wines where both microbial and oxidative stability should be conveniently controlled all along the winemaking process and the shelf life. Some research on these subjects has already been carried out, but the exact impact of its utilization on wine composition and the specific mechanisms of action are still to be precisely defined.

3. Objectives and expected results

This study will focus on the color and astringency of wines, exploring the effects of KT on compositions in red wine, including fixed composition, polyphenolic and volatile substances.

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

- A1) Bibliographic review** about the effects of KT's antioxidant capacity and metal ion adsorption capacity on metal ions and oxidation in a wine-like environment.
A2) Analysis of the effects of chitosan addition on the physicochemical properties, fixed compounds, and Fe (II)/Fe (III) oxidation status.
A3) Evaluation of distinct vinification steps and shelf lives about red/rosè wines with the addition of KT.
A4) Analysis of KT nanoparticles, including the production and characterization of KT nanoparticles, and analysis of white/rosè-red wines with the addition of KT nano particles and its utilization.
A5) Evaluation of KT's ability in controlling the quality of beer environment, including the impact on *Brettanomyces* flavour profiles and the control of contamination in beer-like environment.
A6) Writing and publishing of the doctoral thesis, posters, scientific articles and oral presentation.

Table 1. Gantt chart of the PhD research activity

	Months	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
Year 1	Bibliographic review (continued)																																					
	Investigation of Chitosan activity as a function of pH																																					
	Lab Scale production of red/rosé wines (and shelf life)																																					
	Analysis of wines added of KT in distinct vinification steps																																					
	Dissemination of results																																					
Year 2	Production and characterization of KT nanoparticles																																					
	Utilization of nanoparticles in white/rosé-red wines																																					
	Analysis of wines added of nanoparticles																																					
	Period abroad in an international Institution																																					
	Dissemination of results																																					
Year 3	Confirmation of KT ability to control Brett in Beer environment																																					
	Production of craft beers																																					
	Use of KT in intentionally contaminated Beers																																					
	Dissemination of results																																					
	PhD thesys writing																																					

4. Bibliography

- Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Paños I, Miralles B, Acosta N, . . . Heras Á (2009) Functional characterization of chitin and chitosan, *Curr. Chem. Biol.* 3(2): 203-230.
- Brasselet C, Pierre G, Dubessay P, Dols-Lafargue M, Coulon J, Maupeu J, . . . Michaud P (2019) Modification of chitosan for the generation of functional derivatives, *Appl. Sci.* 9(7): 1321.
- Castellari M, Matricardi L, Arfelli G, Galassi S, Amati A (2000) Level of single bioactive phenolics in red wine as a function of the oxygen supplied during storage, *Food Chem.* 69(1): 61-67.
- Castro Marín, A, Donato C, Milena L, Claudio R, Chinnici F (2021) Relevance and perspectives of the use of chitosan in winemaking: a review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 61(20): 3450-3464.
- Danilewicz JC (2012) Review of oxidative processes in wine and value of reduction potentials in enology, *Am. J. Enol. Viticult.* 63(1): 1-10.
- Friedman M, Juneja VK (2010) Review of antimicrobial and antioxidative activities of chitosans in food, *J. Food Prot.* 73(9): 1737-1761.
- Higueras L, López-Carballo G, Gava R, Hernández-Muñoz P (2015) Reversible covalent immobilization of cinnamaldehyde on chitosan films via schiff base formation and their application in active food packaging, *Food Bioproc. Technol.* 8: 526-538.
- Marin AC, Stocker P, Chinnici F, Cassien M, Thétiot-Laurent S, Vidal N, . . . Pietri S (2021) Inhibitory effect of fungoid chitosan in the generation of aldehydes relevant to photooxidative decay in a sulphite-free white wine, *Food Chem.* 350: 129222.
- Oliveira CM, Ferreira ACS, De Freitas V., Silva AM (2011) Oxidation mechanisms occurring in wines, *Food Res. Int.* 44(5): 1115-1126.
- Rocha MAM, Coimbra MA, Nunes C (2017) Applications of chitosan and their derivatives in beverages: A critical review, *Curr. Opin. Food Sci.* 15: 61-69.
- Singleton VL (1987) Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: Observations and practical implications. *Am. J. Enol. Viticult.* 38(1): 69-77.
- Waterhouse AL, Laurie VF (2006) Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses, *Am. J. Enol. Viticult.* 57(3): 306-313.

Application of non-thermal assisted processing for food stabilization and functionalization

Rui Song (email: rui.song2@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: XL; Anno di frequenza: I

Tutor: Pietro Rocculi; Co-tutor: Junior Bernardo Molina Hernandez

1. Curriculum

Education:

- **MSc Food Science and Technology**, AHPU, China, 2019-2022, thesis: “*Effects of Rice Aging on Pasting Behavior of Starch Granule Aggregations*”
- **BSc Food Science and Technology**, BBU, China, 2014-2019, thesis: “*Saccharomyces Cerevisiae Extract Process Optimization and Production Line Design*”

Publication:

- Guo, YB., Song, R. Zhu, SM., Liu, XY., Wang, XY., “Effects of Ultrasonic Treatment on the Eating Quality of Aged Rice Flour,” *Journal of Cereal Science*, 2024, 117(4), 103918.
- Song, R., Guo, YB., Zhu, SM., Xu, ZX., Wei, Q., “Effects of Rice Aging on the Disaggregation of Starch Granules and Gel Texture,” *Food and Fermentation Industries*. 2023, 49(9), 238-243.
- Guo, YB., Song, R. Chen, S., “A Method for Measuring the Pasting Properties of Rice and Rice Flour,” *Invention Patent*, 2022. (202211280777.9).

Work Experience:

- Research assistant, in the agricultural product processing and Storage group, AHPU, from Feb. 2020 to Jun. 2022
- Quality intern, internship in an analytic instrument company from Sep. 2022 to Jul. 2024

2. State of the art

In response to the growing focus on health and nutrition, there has been a surge in the demand for high-quality food products. However, traditional thermal processing methods often lead to the deterioration of food quality. This demand for minimally processed, high-quality foods has driven significant advancements in the development of non-thermal processing technologies. These emerging technologies offer several advantages, including reduced energy and water consumption, decreased reliance on synthetic additives, and minimal impact on food composition, all while ensuring product safety.

Techniques such as short-wave ultraviolet radiation (UVC), ultraviolet light-emitting diodes (UV-LEDs), pulsed light (PL), cold plasma (CP), and pulsed electric fields (PEF) are increasingly recognized as innovative approaches in food processing. These methods have the potential to extend shelf life and preserve food quality more effectively than traditional methods (Arshad *et al.*, 2022). Moreover, combining non-thermal technologies may further enhance food quality by maintaining sensory attributes, nutritional content, and the stability of organic compounds, thereby offering a viable alternative to conventional processing. Non-thermal techniques are especially relevant in food science due to their ability to alter the functional properties of food components without the adverse effects of heat.

In Chinese cuisine, black tea and rice flour—particularly black rice flour—are important ingredients. Non-thermal treatments could be exploited for obtaining specific quality characteristics or inducing some new properties due to modifications promoted in the structure of the matrix.

The structural and functional properties of rice starch can influence its gelatinization, pasting behavior, and retrogradation—factors that are crucial in various food applications (Liu *et al.*, 2024). Rice is one of the important components of numerous food formulations wherein its composition and cooking quality are mainly related to starch and influenced by genetic, environmental shortcomings, and agronomical factors (Verma *et al.*, 2022). In particular, black rice flour is valued for its distinctive flavor, color, and nutritional profile. However, its functional properties might be affected by variety, season and storage decreasing its economic value. The tailoring of rice starch structure could be a strategy to increase its functionality and increasing its application in food formulation.

Black tea is prized for its health benefits and is commonly used in beverages and baked products. The manufacturing process of black tea mainly includes withering, rolling, fermentation, and drying, where fermentation is considered as the critical step for the substance transformation and quality formation. During fermentation, many reactions take place simultaneously, including oxidation of polyphenols catalyzed by polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD)

(Chen *et al.*, 2023). The application of pulsed electric fields (PEF) to fresh tea leaves is believed to be able to induce the degradation of cell structure favoring enzymatic oxidation and therefore the development of the healthy antioxidant compounds typical of the product.

Similarly, these techniques can enhance the stability of bioactive compounds in black tea during storage by inhibiting enzymatic and oxidative degradation without the use of heat (Raghunath *et al.*, 2023). Understanding how non-thermal processing affects the functionality of rice starch and the storage stability of black tea is essential for developing high-quality, shelf-stable food products.

3. Project Aim

The objective of this project is to explore the potential of innovative non-thermal treatments to modify the functional properties of typical Chinese food ingredients such as rice flour and tea leaves. These optimized ingredients will then be incorporated into food product formulations to meet specific consumer needs.

A1) Literature review of previous studies on the application of non-thermal technologies for food modification and research on the specific needs in the formulation of new plant-based products;

A2) Application of ultrasound treatments to the selected rice flours (different post-harvest season), with the aim of studying the effects on functional properties;

A3) Based on the obtained ingredients, a food product including the modified starch will be developed and optimized

A4) Application of Pulsed Electric Fields (PEF) for the improvement of black tea processing, particularly the withering, fermentation, and drying stages, leading to improved efficiency and quality;

A5) Writing of articles and final dissertation, and attending conferences.

Table 1: Gant chart with the expected duration of different research activities.

RESEARCH ACTIVITY		Time [month]																	
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
A1	Literature review and research																		
A2	Ultrasound Treatments (US) application and optimization for rice flour functionalization																		
A3	Quality evaluation and identification for application of rice flours incorporated on new final product possible usages for the product.																		
A4	Pulsed Electric Fields (PEF) application to improve Black tea processing.																		
A5	Final dissertation, write articles and attend conferences.																		

4. Bibliography

Arshad RN, Abdul-Malek Z, Roobab U, Ranjha MMAN, Jambrak AR, Qureshi M I, Khan N, Lorenzo JM, Aadil R M. (2022) Nonthermal food processing: A step towards a circular economy to meet the sustainable development goals, *Food Chem.* 16: 100516.

Chen L, Wang H, Ye Y, Wang Y, Xu P (2023) Structural insight into polyphenol oxidation during black tea fermentation, *Food Chem: X* 17: 100615.

Liu Q, Hou S, Zhang Y, Zhou D, Zhao S, Guo L, Zhuang X, & Ding, C (2024) Applications of novel non-thermal physical field technologies in enhancing the quality and storage stability of grains, *J. Stored Prod. Res.* 108: 102398.

Raghunath S, Budaraju S, Gharibzahedi SMT, Koubaa M, Roohinejad S, Mallikarjunan K (2023) Processing technologies for the extraction of value-added bioactive compounds from tea, *Food Eng. Rev.* 15: 276-308.

Verma D K, Srivastav PP (2022) Isolation, modification, and characterization of rice starch with emphasis on functional properties and industrial application: a review, *Crit. Rev.Food Sci. Nutr.* 62: 6577-6604.

DOTTORANDI ISCRITTI AL II ANNO (XXXIX CICLO)

Risk assessment dell'effetto degli xenobiotici sul microbiota intestinale umano

Davide Addazii (e-mail: davide.addazii2@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: XXXIX; Anno di frequenza: II

Tutor: Andrea Gianotti

1. Stato dell'arte

Gli esseri umani sono esposti, attraverso l'ingestione, a un'ampia varietà di molecole estranee all'organismo, note come xenobiotici, che comprendono componenti della dieta, sostanze chimiche ambientali e farmaci. Il termine "xenobiotico" si riferisce a composti chimici non originari del metabolismo umano, tra cui farmaci, pesticidi, cosmetici, aromi, fragranze, additivi alimentari, sostanze industriali e agenti inquinanti ambientali (Idle & Gonzalez, 2007). Una volta ingeriti, gli xenobiotici possono esercitare un impatto diretto sul microbiota intestinale, modulando selettivamente la crescita di determinati microrganismi e influenzando di conseguenza la salute dell'ospite (Suez *et al.*, 2014; Chassaing *et al.*, 2017). Considerando il ruolo centrale del microbiota nel metabolismo di farmaci e contaminanti ambientali (Spanogiannopoulos *et al.*, 2016), variazioni interindividuali nella composizione della comunità microbica intestinale possono determinare risposte differenti all'esposizione agli stessi composti xenobiotici.

L'ingestione può indurre una disbiosi associata ad un'alterazione della barriera intestinale, all'attivazione dell'infiammazione cronica e a una risposta immunitaria anomala, accelerando l'insorgenza delle Intestinal Bowel Disease (IBD) (Raoul *et al.*, 2022). Lo studio preclinico di tali risposte è da sempre realizzato prevalentemente su modelli animali che oggi stanno perdendo importanza sia per scarsa trasferibilità dei risultati all'uomo che, in tempi più recenti, per una maggiore sensibilità verso l'eticità della sperimentazione animale. Tuttavia, la loro rilevanza è oggi in declino, sia per la limitata trasferibilità dei risultati all'uomo, sia per una crescente attenzione alle questioni etiche legate alla sperimentazione animale. Alla luce di ciò, l'impiego di modelli *in vitro* si rivela sempre più cruciale per la valutazione del rischio (risk assessment), soprattutto quando l'effetto delle sostanze testate dipende dall'interazione con il microbiota intestinale. Tra questi, un modello di riferimento è il Multi-Unit in vitro Colon Model (MICODE), sviluppato presso il DISTAL dell'Università di Bologna. Questo sistema simula l'ambiente del colon umano o animale con elevata flessibilità, e può essere preceduto da una fase di digestione gastro-duodenale simulata.

MICODE si è dimostrato efficace nello studio dell'impatto di formulazioni e processi alimentari sull'ecosistema intestinale, monitorando la dinamica delle popolazioni microbiche (Nissen *et al.*, 2021; Nissen *et al.*, 2022). Il modello fornisce dati rilevanti sulla biodiversità microbica e sul profilo metabolico, contribuendo a chiarire i meccanismi alla base delle proprietà prebiotiche di specifici alimenti o ingredienti. La possibilità di operare in modalità continua o batch ne accresce ulteriormente la versatilità.

2. Bibliografia

- Chassaing B, Van de Wiele T, De Bodt J, Marzorati M, Gewirtz AT (2017) Dietary emulsifiers directly alter human microbiota composition and gene expression *ex vivo* potentiating intestinal inflammation, *Gut*, 66(8): 1414-1427.
- Idle Jeffrey R., Gonzalez FJ (2007) "Metabolomics." *Cell metabolism* 6.5 (2007): 348-351.
- Moreno FJ, Pazos F, Garrido-Romero M, Payen C, Borrego-Yaniz G, Chagoyen M, ... Chemaly M (2024) Roadmap for the integration of gastro-intestinal (GI) tract microbiomes (human and domestic animal) in risk assessments under EFSA's remit, *EFSA Supporting Publications*, 21(2): 8597E.
- Nissen L, Casciano F, Chiarello E, Di Nunzio M, Bordoni A, Gianotti A. (2021) Colonic In Vitro Model Assessment of the Prebiotic Potential of Bread Fortified with Polyphenols Rich Olive Fiber, *Nutrients* 13(3): 787.
- Nissen, L, Casciano F, Di Nunzio M, Bordoni A, Gianotti A (2022) Protein enrichment of gluten free bakery products by *Arthrospira platensis* (spirulina): in vitro study of the effect of formulation and sourdough process on colon microbiota through MICODE gut model. In *FoodMicro 2022 Next Generation Challenges in Food Microbiology* pp. 93-93.
- Raoul P, Cintoni M, Palombaro M, Basso L, Rinninella E, Gasbarrini A, Mele MC (2022) Food Additives, a Key Environmental Factor in the Development of IBD through Gut Dysbiosis, *Microorganisms* 10(1):167.
- Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, Israeli D, Zmora N, Gilad S, Weinberger A (2014) Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota, *Nature* 514: 181-186.
- Spanogiannopoulos P, Bess EN, Carmody RN, Turnbaugh PJ (2016) The microbial pharmacists within us: a metagenomic view of xenobiotic metabolism, *Nat Rev Microbiol.* 14: 273-287.

3. Obiettivi

Il presente progetto di ricerca si propone di studiare *in vitro* gli effetti sulla microflora intestinale derivanti dall'ingestione degli xenobiotici tramite il modello intestinale MICODE e validarne l'utilizzo nell'ambito del risk assesment. Tra i fattori xenobiotici, saranno considerati quelli veicolati all'uomo attraverso la dieta e in particolare: i) contaminanti alimentari, ii) additivi alimentari, e iii) microrganismi patogeni e loro metaboliti tossici. A tale scopo saranno considerati gli effetti perturbativi di tali fattori sia sulle popolazioni microbiche che sui loro metaboliti al fine di ipotizzare meccanismi alla base degli effetti tossici mediati dal microbiota intestinale. Il progetto mira ad ottenere i seguenti risultati:

- Studiare un protocollo sperimentale per adattare il modello intestinale MICODE alla valutazione del rischio derivante da fattori xenobiotici di origine dietetica;
- Individuare target microbici e metabolici o loro indicatori in grado di descrivere gli effetti benefici e dannosi degli xenobiotici considerati
- Individuare alcuni casi studio per realizzare un modello di risk assesment dell'esposizione basato su marcatori microbiologici e metabolici;
- Stabilire delle linee guida per l'utilizzo del modello intestinale MICODE come strumento preclinico nel risk assesment di xenobiotici di origine alimentare.

Per il raggiungimento degli obiettivi del progetto della tesi di dottorato il lavoro è stato suddiviso nelle seguenti attività secondo il diagramma di Gantt riportato in Tabella 1:

- A1) **Ricerca bibliografica** degli xenobiotici come i contaminanti alimentari, additivi alimentari e microrganismi patogeni;
- A2) **Messa a punto** del modello *in vitro* per lo studio dell'ecologia microbica del tratto intestinale e delle metodiche per la determinazione del microbiota e dei suoi metaboliti;
- A3) **Selezione degli xenobiotici** oggetto dello studio sulla base di uno screening delle loro caratteristiche;
- A4) **Valutazione** degli effetti sulla microflora intestinale sul modello *in vitro*;
- 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) Ricerca bibliografica																			
A2) Messa a punto del modello <i>in vitro</i>																			
A3) Selezione degli xenobiotici																			
1) Food contaminants																			
2) Food additives																			
3) Food pathogens																			
A4) Valutazione degli effetti sulla microflora intestinale sul modello <i>in vitro</i>																			
A5) Preparazione della tesi e di articoli																			

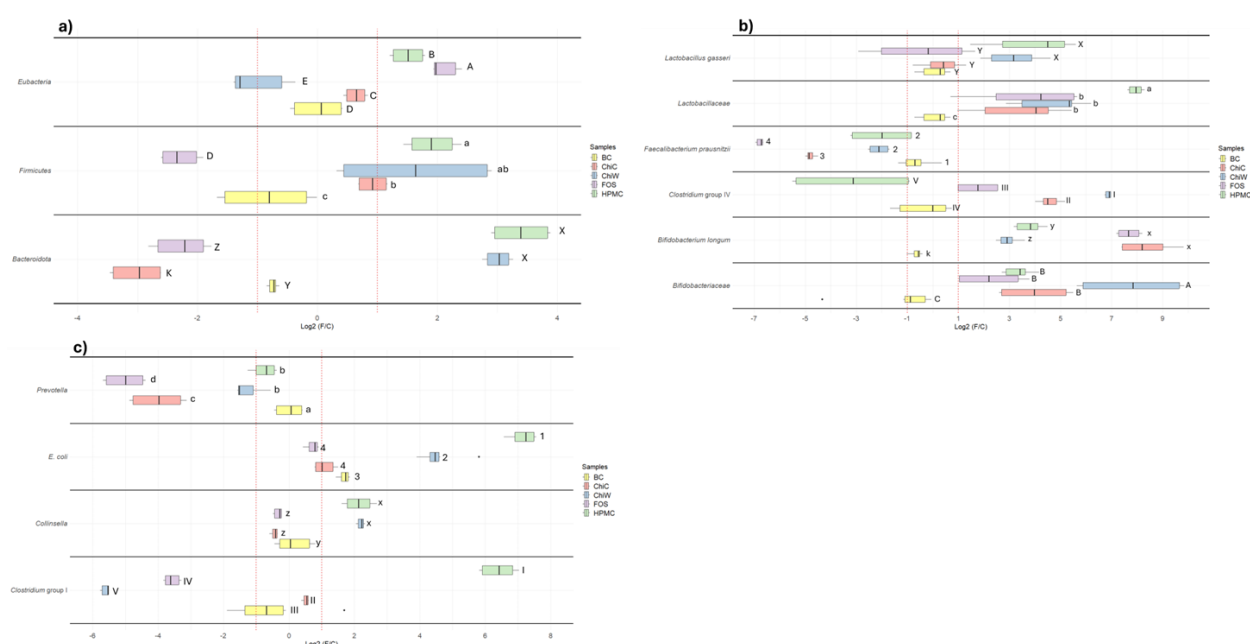
4. Stato di avanzamento della ricerca e principali risultati

Il presente progetto di ricerca si propone di valutare gli effetti *in vitro* dell'ingestione di xenobiotici sulla microflora intestinale di persone sane e di persone con uno stato infiammatorio, utilizzando il modello intestinale MICODE e a validarne l'utilità nella valutazione del rischio. Durante il primo anno di dottorato, a seguito di ricerca bibliografica, sono stati identificati vari xenobiotici uno dei quali Hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC). L'HPMC è un additivo alimentare considerato dall'EFSA come potenziale xenobiotico (Moreno *et al.*, 2024), l'obiettivo è stato di comparare l'effetto dell'HPMC ad altre sostanze non ritenute xenobiotici dall'EFSA.

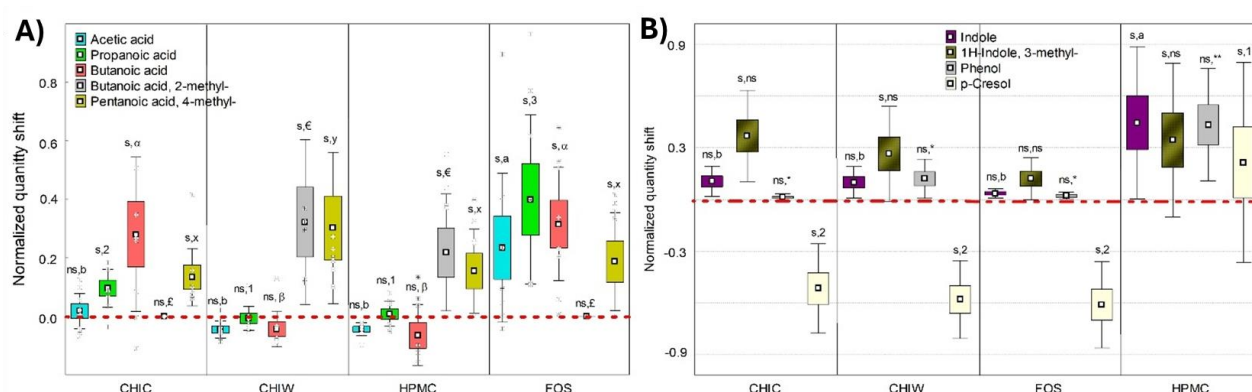
Sono stati selezionati quindi tre additivi: chitosano commerciale (ChiC), chitosano ottenuto da scarti di crostacei (ChiW) e frutto-oligosaccaridi (FOS). Le prove sono state condotte utilizzando il modello gastrointestinale standardizzato *in vitro* che simula la digestione umana e la fermentazione del colon, combinato con analisi qPCR e GC-MS, sono stati valutati i loro effetti sulla composizione microbica e sulla produzione metabolica. I campioni ChiC, ChiW, HPMC e FOS hanno mostrato effetti distinti sulla composizione del microbiota intestinale, influenzando in modo variabile i principali gruppi microbici.

Nel complesso, ChiW ha determinato un aumento marcato di *Firmicutes* e *Bacteroidota* (Figura a), insieme a un significativo incremento di gruppi benefici come *Lactobacillaceae* e *Bifidobacteriaceae* (Figura b), accompagnato da una riduzione di batteri opportunisti come *Escherichia coli*, *Prevotella* e Clostridi del gruppo I (*Clostridium perfringers*) nella figura c. Anche ChiC ha esercitato effetti positivi, seppur più moderati, stimolando la crescita di lattobacilli e bifidobatteri, e contribuendo alla diminuzione di alcuni batteri dannosi come *Prevotella* (Figura c). FOS, noto prebiotico, ha mostrato una stimolazione selettiva di alcuni gruppi benefici, pur con un'intensità inferiore rispetto a ChiW e ChiC, e una riduzione di alcuni taxa opportunisti. Al contrario, HPMC ha mostrato effetti meno favorevoli sulla

composizione microbica. In particolare, ha determinato un incremento significativo di *Clostridium* del gruppo I, *E. coli* e *Collinsella* (Figura c).



Per quanto riguarda i risultati inerenti alla produzione di metaboliti microbici (Figura A), ChiC ha determinato un aumento significativo della produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA), in particolare acido butanoico, anche la produzione di acido propionico e acido pentanoico-4-metile è risultata incrementata rispetto alla baseline (BL). ChiW ha mostrato un comportamento analogo, seppur meno marcato, promuovendo comunque la formazione di acido butanoico e pentanoico in misura significativa. Invece, FOS ha stimolato in modo elevato la produzione di SCFA benefici, tra cui acetato, propionato, butirato. Al contrario, HPMC, non ha stimolato significativamente la produzione di metaboliti benefici. Inoltre, si è distinto per l'induzione significativa di composti microbici potenzialmente dannosi per l'ospite (Figura B). In particolare, la produzione di indolo, 1H-indolo-3-metile e p-cresolo – cataboliti derivanti dalla fermentazione proteica da parte di popolazioni opportuniste, è risultata elevata. Tali metaboliti indicando un impatto negativo di HPMC sul microbiota intestinale.



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

- Nissen L, Addazii D, Casciano F, Danesi F, Rodriguez-Estrada MT, Mercatante D, ... Gianotti A (2024) Carob Syrup: Prebiotic Potential of a Neglected Functional Beverage of Mediterranean Countries, *Foods* 13(24): 4172.
- Addazii D, Nissen L, Casciano F, Aziza Hadj Hassine, Ben Ayache Siwar, Lotfi Achour, Anagnostis Argiriou, Georgia Ayfandopoulou, Gianotti A (2024) Carob Syrup: prebiotic potential of a neglected functional beverage of Mediterranean countries, *Proc. of FoodOmics 2024: fifteen years on from. Where are we now, what's next*, 024 (Cesena, 14\02\24) [atti di convegno-poster].
- Addazii D (2024) In vitro risk assessment of the effect of food additives on the human gut microbiota, *Proc. of the 28th Workshop on the developments in the Italian PhD research on food science, technology and biotechnology, 2024* (Catania, 18 20 September 2024) [atti di convegno-poster].

Poultry meat downgrading: insight on the underpinning factors to improve the sustainability of the production

Emilia Luigia Antenucci (email: emilia.antenucci2@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: XXXIX; Anno di frequenza: II

Tutor: Prof.ssa Francesca Soglia; Co-tutor: Prof. Massimiliano Petracci

1. State of the art

The poultry sector faced a phenomenal increase over the past 60 years (Barbut *et al.*, 2024). Indeed, the consumers' preference for poultry meat in general, and for chicken meat in particular, led to the implementation of selection programs based on quantitative traits with the aim to develop fast-growing and high breast-yield commercial hybrids (Tixier-Boichard, 2020). These practices resulted in a significant improvement in the production performance of the birds and, consequently, the poultry meat production in currently considered as the most efficient and sustainable. Beside these undeniable progresses, these selection practices resulted in a lower ability of the chickens to cope with stressors ultimately leading to an increased incidence of abnormalities mainly affecting the *Pectoralis major* muscles (Petracci *et al.*, 2019; Soglia *et al.*, 2021). These include White Striping (WS), Wooden Breast (WB) and Spaghetti Meat (SM) abnormalities (Barbut *et al.*, 2024). Muscle affected by these defects exhibit distinctive macroscopic features, such as white striations of variable thickness aligned with the muscle fibers' direction - WS, the appearance of pale, out-bulging area with a hardened consistency -WB, and a tendency for the separation of the fiber bundles composing the muscle tissue -SM (Petracci *et al.*, 2019; Soglia *et al.*, 2021; Barbut *et al.*, 2024). These abnormalities occur with a high prevalence (that can reach up to 30% according to the flock) and results in meat downgrading or high condemnation rates therefore undermining the sustainability of the sector itself. Given the above, this PhD research project aims at evaluating the main quality traits and technological properties of poultry meat affected by muscle abnormalities and set-up an innovative rapid method for meat color evaluation.

2. Bibliografy

- Barbut S, Mitchell R, Hall P, Bacon C, Bailey R, Owens CM, Petracci M (2024) Myopathies in broilers: Supply chain approach to provide solutions to challenges related to raising fast growing birds, Poultry Sci. 103(8): 103801.
- Petracci M, Soglia F, Madruga M, Carvalho L, Ida E, Estévez M (2019) Wooden-breast, white striping, and spaghetti meat: causes, consequences, and consumer perception of emerging broiler meat abnormalities, Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 18(2): 565-583.
- Soglia F, Petracci M, Davoli R, Zappaterra M (2021) A critical review of the mechanisms involved in the occurrence of growth-related abnormalities affecting broiler chicken breast muscles, Poult. Sci. 100(6): 101180.
- Tixier-Boichard M (2020) From the jungle fowl to highly performing chickens: are we reaching limits?, Worlds Poult. Sci. J. 76(1): 2-17.

3. Objectives

To achieve the objectives, the project was divided into the following activities reported in the Gantt diagram below (Table 1):

- A1) **Bibliographic research** and study of the literature.
- A2) **Assessment of the potential involvement of collagen type IV in onset of the growth-related abnormalities** by evaluating its content in PMs affected by WB.
- A3) **The conversion of muscle to meat in chickens belonging to ECC approved genotypes:** evaluation of meat quality and *post-mortem* metabolism.
- A4) **Set up of a rapid method for meat color evaluation** by innovative sensor.
- A5) **Statistical analysis:** univariate and multivariate analysis.
- A6) **Dissemination, writing scientific papers and final thesis.**

Table 1. Gantt diagram showing the PhD activities

Activity	Month	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
A1)	Bibliographic research																		
A2)	Investigating COL IV involvement in the onset of WS and WB																		
	1) Fillet classification and meat quality analyses																		
	2) Quantification of COL IV																		
	3) COL IV extraction and cross-link analyses																		
A3)	The conversion of muscle to meat in chickens belonging to ECC approved genotypes																		
	1) Sampling																		
	2) Meat quality analyses																		
	3) Adenine nucleotide concentrations																		
	4) Glycolytic metabolites																		
A4)	Implementation of an innovative tool for color evaluation of rabbit and poultry meat																		
	1) Rabbit meat																		
	2) Chicken meat																		
A5)	Statistical analysis (Univariate and multivariate approaches)																		
A6)	Dissemination, writing scientific papers and final thesis																		

4. Research progress and main results

This PhD project is focused on evaluating the main quality traits and technological properties of poultry meat affected by muscle abnormalities, with the specific aim of improving the current knowledge concerning the causative mechanisms likely involved in their occurrence and the eventual role of peri-mortem factors in exacerbating their severity. Moreover, trials were carried out to develop a novel and efficient approach for the instrumental assessment meat color.

As for research activity A2, a total of 180 breast fillets belonging to three homogeneous flocks were collected in the deboning area of a commercial abattoir 3 h post-mortem and classified according to their macroscopic features as normal (NORM, n=30/flock) and abnormal (ABN, severe WB; n=30/flock) to perform analyses at the protein level with the aim of improving the knowledge on the potential involvement of collagen type IV in the onset and progression of the growth-related abnormalities in broilers and to evaluate the main quality traits (pHu and color) and technological properties of breast meat. The results concerning the effect of the occurrence of wooden breast abnormality on the main quality traits and technological properties of chicken breast meat are reported in Table 2. As expected, meat quality evaluation revealed significant differences between NORM and ABN for pHu, redness (a*), cooking loss, and shear force. These parameters were useful to characterize the samples and identify those to be selected for further analyses at protein level. In detail, Western Blot analyses were performed against collagen type IV alpha 1 chain and collagen type IV was extracted by limited pepsin digestion and collected by selective salt precipitation. Currently, the evaluation of the results is ongoing.

Table 2 Effect of the occurrence of wooden breast abnormality on the main quality traits and technological properties of chicken breast meat (N=180; 90 Pectoralis major muscles/group)

Parameter	NORM	ABN	sem	P-value
Ultimate pH	5.69	5.73	0.01	*
Lightness – L*	56.97	57.33	0.22	ns
Redness – a*	2.10	2.35	0.05	**
Yellowness – b*	5.28	5.71	0.12	ns
Drip loss (%)	2.32	2.04	0.10	ns
Cooking loss (%)	18.0	23.1	0.36	***
Shear Force (N)	7.30	8.90	0.20	***

*=P≤0.05; **=P≤0.01; ***=P≤0.001; ns=not significant.

Within research activity A3, analyses of meat quality and technological properties were conducted on breast samples from three genotypes with different growth rates (slow-, medium-, and fast-growing) fed diets with different protein-to-energy ratio. The results showed that genotype significantly affected breast meat quality. Breast meat from fast-growing chickens showed higher pHu and cooking loss if compared with slow-, and medium-growing groups (Table 3). Instead, breast meat from slow-growing chickens when fed an experimental diet with 10% less protein, on the other hand, exhibited higher lipid oxidation, affecting meat quality traits such as color, WHC, and protein oxidation. In addition, the quantification of glycolytic and adenosine metabolites is currently in progress.

Table 3 Quality traits of breast meat of fast (FG), medium (MG) and slow-growing (SG) chickens fed diets with different protein to energy ratio

N.	Group						Genotype			Diet		P-value			
	FG- CON	FG- LOW	MG- CON	MG- LOW	SG- CON	SG- LOW	FG	MG	SG	CON	LOW	SEM	GxD	G	D
	15	15	15	15	15	15	30	30	30	45	45				
pHu	5.77	5.76	5.53	5.56	5.43	5.55	5.77x	5.55y	5.49y	5.58	5.62	0.02	0.094	<0.001	0.067
L*	46.68	46.19	54.07	53.21	53.45	51.15	46.43y	53.64x	52.30x	51.40	50.19	0.42	0.309	<0.001	0.018
a*	1.97	2.66	2.27	3.24	2.53	2.89	2.32y	2.76x	2.71x	2.26	2.93	0.09	0.280	0.046	<0.001
b*	2.76	3.19	4.91	5.20	4.90	6.10	2.97y	5.05x	5.50x	4.19	4.83	0.18	0.344	<0.001	0.020
Cooking loss (%)	17.7	18.7	13.5	12.8	16.8	16.2	18.2x	13.2z	16.5y	16.0	15.9	0.31	0.168	<0.001	0.766
Shear force (kg/g)	4.30	4.37	6.36	5.74	6.22	6.78	4.34y	6.05x	6.50x	5.63	5.63	0.14	0.071	<0.001	0.974
TBARS (mg MDA/kg meat)	0.52	0.47	0.48	0.50	0.90	0.82	0.50y	0.50y	0.86x	0.63	0.60	0.40	0.880	<0.001	0.625
Carbonyls (nmol/ mg of protein)	2.64ab	3.27ab	1.98ab	1.63ab	3.70a	1.44b	2.96	1.81	2.57	2.78	2.12	0.22	0.022	0.085	0.125

es= error standard means; ***= <0.001; **= <0.01; *= <0.05; ns= not significant x-z, a-c= mean values followed by different letters significantly differ among the groups (p<0.05)

With regard of research activity A4, an innovative sensor (Nix Spectro 2 Color Sensor) was tested for the evaluation of rabbit meat colour. In particular, the research was conducted on rabbit muscle having a different energetic metabolism (i.e., loin and hind leg meat), these were stored up to 12 days and used to measure color by using a tristimulus colorimeter and the innovative color sensor. Overall, the data collected using the Chroma Meter and Color Sensor different values were found (Table 4). These results can likely be attributed to variations in the light source used by each device, leading to a different scattering of the incident light because of its interaction with the meat surface and/or structure. Although Nix Colour Sensor is not equivalent to Minolta Chroma Meter, our results indicated that it guarantees higher sensitivity for assessing rabbit meat colour changes during refrigerated storage.

Table 4 Color changes measured by Chroma Meter (Minolta, CR-400) and Colour Sensor (Nix Spectro 2 Color Sensor) of *Longissimus dorsi* muscle (medial part) and *Biceps femoris* during refrigerated storage at 4±1°C for 12 days.

Longissimus dorsi							Biceps femoris						
Chroma Meter				Colour Sensor			Chroma Meter				Colour Sensor		
day	L*	a*	b*	L*	a*	b*	day	L*	a*	b*	L*	a*	b*
0	53.0b±1.9	2.1±0.7	0.7b±1.0	38.7c±2.5	-2.0b±0.5	0.7±1.9	0	55.8±2.9	2.5±0.6	0.1a±1.3	41.0b±2.3	-1.2b±0.7	0.3a±1.4
3	55.3ab±2.1	2.2±0.8	3.1a±1.5	39.4bc±1.4	-1.2a±0.5	0.5±1.3	3	57.5±3.0	2.6±0.6	-1.3b±1.3	42.4ab±2.3	-0.4a±0.5	-3.1b±1.9
5	56.4a±2.7	2.1±0.9	3.3a±1.1	40.8abc±2.6	-1.4a±0.5	1.0±1.9	5	57.4±3.0	2.6±0.5	-1.7b±1.0	42.7ab±1.4	-0.5a±0.3	-4.0b±1.7
7	55.8ab±3.2	1.8±0.8	3.1a±1.5	41.5ab±3.2	-1.8ab±0.5	0.8±2.1	7	57.1±3.1	2.7±0.5	-1.1ab±1.2	42.7ab±1.5	-0.7a±0.3	-2.6b±1.4
12	55.2ab±3.9	1.8±0.9	3.5a±1.6	42.2a±0.5	-1.8ab±0.5	1.3±1.7	12	57.4±3.0	2.6±0.7	-1.4b±1.3	43.0a±2.0	-0.6a±0.2	-3.1b±1.5
p-value	0.019	0.588	<0.001	0.001	<0.001	0.797	p-value	0.475	0.968	0.002	0.063	<0.001	<0.001

a,b = For each parameter, means value (± standard deviation) followed by different letters significantly differ over the different storage times considered (Tukey-HSD, P < 0.05)

5. List of publications during doctoral activities

- Antenucci EL**, Bordini M, Soglia F, Petracci M, Nix Colour Sensor as potential tool for evaluating colour in rabbit meat, in: Proceedings of 13th World Rabbit Congress, 2024, pp. 732 – 735, Tarragona, October 2-4, 2024
- Antenucci EL**, Gagliano MA, Soglia F, Cartoni Mancinelli A, Petracci M (2024) Comparison of meat quality traits among the main chicken categories marketed in Italy: 2. lipid and protein oxidative stability, in: Proc. of the XVIth European Poultry Congress, Valencia, June 24-28, 2024, p. 450
- Antenucci EL**, Soglia F, Zampiga M, Petracci M, Sirri F (2024) Supplementation of olive oil-derived phytocomplexes in broiler chicken diets: effects on breast meat quality and oxidation changes of thigh meat during refrigerated storage, in: Proc. of the XVIth European Poultry Congress, Valencia, June 24-28, 2024, p. 453
- Bordini M, **Antenucci EL**, Petracci M, Soglia F, Validation of a macroscopic classification at the processing plant of breast muscles affected by growth-related abnormalities through meat quality evaluation in broilers, in: Proc. of the XVIth European Poultry Congress, Valencia, June 24-28, 2024, p. 937
- Gagliano MA, **Antenucci EL**, Soglia F, Cartoni Mancinelli A, Petracci M (2024) Comparison of meat quality traits among the main chicken categories marketed in Italy: 1. Technological properties, in: Proc. of the XVIth European Poultry Congress, Valencia, June 24-28, 2024, p. 449
- Gagliano MA, Zampiga M, Soglia F, **Antenucci EL**, Petracci M, Sirri F (2024) Effect of the dietary inclusion of *Hermetia illucens* oil on fatty acid composition and technological properties of chicken meat, in: Proc. of the XVIth European Poultry Congress, Valencia, June 24-28, 2024, p. 454

Antiossidanti naturali tailor made: valutazione comparativa di antiossidanti nell'elaborazione di alimenti, mangimi e pet food e determinazione delle condizioni d'uso ottimali

Valentina Antonioni (e-mail: valentina.antonioni@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: XXXIX; Anno di frequenza: II

Tutor: Maria Fiorenza Caboni; Co-tutor: Federica Pasini, Silvia Marzocchi, Sauro Passeri

1. Stato dell'arte

L'irrancidimento ossidativo dei lipidi rappresenta una delle principali cause di riduzione della *shelf life* degli alimenti trasformati a bassa umidità contenenti grassi (compresi *pet food* e mangimi). Anche quando i lipidi sono presenti in piccole quantità, la loro ossidazione può essere determinante per la qualità del prodotto. Infatti, questa modificazione chimica non pregiudica solo la salubrità dell'alimento, ma ne influenza soprattutto le caratteristiche organolettiche rendendolo scarsamente appetibile, agli esseri umani come agli animali. I perossidi e i prodotti secondari dell'ossidazione, che hanno origine da queste reazioni, sono i diretti responsabili della durata della *shelf life* di questi prodotti e sono un importante indice qualitativo soggetto a specifici limiti di legge. Un altro aspetto non trascurabile è l'impatto che l'ossidazione degli alimenti può avere sulla salute, a partire dalla co-ossidazione di vitamine e altre molecole funzionali, causando un abbassamento della qualità nutrizionale dell'alimento, fino ad arrivare alla formazione di composti dannosi per la salute. (Hu & Jacobsen, 2016; Kanner, 2007).

L'ossidazione è una reazione non reversibile e auto-catalitica e quando si innesca non c'è più possibilità di fermarla o annullarla. L'unica possibilità di azione è quella di prevenirla e/o rallentarla, per esempio tramite l'impiego di antiossidanti nella formulazione dei prodotti. Per quanto riguarda gli additivi per alimenti, *pet food* e mangimi soggetti all'ossidazione lipidica, vengono impiegate diverse molecole antiossidanti, suddivisibili in due principali categorie: sintetiche e "naturali". Tra gli antiossidanti sintetici, i più comuni sono il BHA (butilidrossianisolo, E320), il BHT (butilidrossitoluene, E321) e il TBHQ (terzbutilidrochinone, E319). Tra quelli considerati naturali si utilizzano principalmente gli estratti ricchi di tocoferoli (E306, E307, E308, E309) e l'estratto di rosmarino (E392). Negli ultimi anni, l'industria alimentare, così come i settori del *pet food* e del *feed*, hanno mostrato un interesse crescente verso l'impiego di additivi in grado di garantire etichette più "pulite" e rassicuranti dal punto di vista del consumatore. Il concetto di *clean label*, inizialmente appannaggio di una nicchia di consumatori particolarmente attenti, è oggi diventato un requisito atteso anche dal consumatore medio, sempre più incline a leggere l'etichetta dei prodotti acquistati, sia per sé che per i propri animali domestici. In questo contesto, la presenza di nomenclature "chimiche" o di *E numbers* può generare diffidenza, a favore di ingredienti riconoscibili e percepiti come naturali. Questa tendenza rappresenta una sfida concreta per i produttori, che si trovano a dover garantire la stessa efficacia tecnologica degli additivi di sintesi, ricorrendo però a molecole naturali spesso più costose e meno caratterizzate dal punto di vista tecnico-scientifico. In particolare, nel caso degli antiossidanti naturali, risulta necessario studiare non solo l'efficacia nella stabilizzazione lipidica, ma anche l'idoneità tecnica e organolettica rispetto alla specifica matrice alimentare, il momento ottimale di addizione nel processo produttivo, la resistenza alle alte temperature, le dosi più efficaci e l'eventuale persistenza nel prodotto finito, con l'auspicio che possa derivarne anche un beneficio bioattivo in vivo per il consumatore.

All'interno di questo scenario, si inserisce il forte interesse verso nuove fonti naturali di antiossidanti, soprattutto se queste possono essere convenientemente estratte da sottoprodotti dell'industria alimentare, abbattendo così sia i costi, che l'impatto ambientale. Un esempio di prodotto che risponde a questi requisiti è il *Cashew Nut Shell Liquid* (CNSL), un liquido oleoso contenuto nel mesocarpo spugnoso della noce dell'*Anacardium occidentale* L. Il CNSL rappresenta circa il 25% del peso totale della noce e viene ottenuto come sottoprodotto della lavorazione meccanica del gheriglio di anacardio destinato all'uso alimentare. La composizione di questo prodotto è caratterizzata da diverse molecole alchilfenoliche, principalmente: l'acido anacardico, il cardanolo, il cardolo ed il metilcardolo. Il CNSL, nella noce di anacardio "cruda", è composto prevalentemente da acido anacardico, in quantità variabili tra il 50% e l'85%, e da percentuali inferiori di cardanolo, cardolo e metilcardolo. Il trattamento termico a 180-200° C, subito dalle noci di anacardio durante la tostatura, determina la decarbossilazione di larga parte dell'acido anacardico con l'ottenimento di cardanolo. Di conseguenza, il CNSL che si ottiene a seguito della tostatura delle noci di anacardio, cioè il sottoprodotto vero e proprio, sarà composto principalmente da cardanolo (40-50%) e cardolo (20-30%), e da percentuali inferiori di acido anacardico e metilcardolo. Questo sottoprodotto dell'industria alimentare rappresenta un inquinante pericoloso per l'ambiente, ma può essere facilmente trasformato in una fonte rinnovabile di derivati fenolici per l'industria chimica. Primo tra tutti, il cardanolo, ottenuto dalla distillazione del CNSL, il quale trova svariate applicazioni nella chimica fine grazie alle sue proprietà chimico-fisiche paragonabili a quelle dei composti fenolici di sintesi. Ma il CNSL non è interessante solamente dal punto di vista della chimica dei materiali: numerosi studi ne dimostrano le proprietà fungicide, molluschicide, insetticide, ma anche antimicrobiche, antinfiammatorie e addirittura antitumorali. Un'altra

proprietà del CNSL che sta iniziando a suscitare interesse è l'attività antiossidante dei composti alchilfenolici che lo compongono (Andrade *et al.*, 2011; Attanasi & Filippone, 2003; Gómez-Caravaca *et al.*, 2010).

Il presente studio si propone di contribuire alla caratterizzazione del CNSL e del cardanolo distillato di uso industriale come potenziali antiossidanti naturali, valutandone le prestazioni in confronto a composti di riferimento comunemente utilizzati nell'industria alimentare e mangimistica.

2. Bibliografia

Andrade TJAS., Araújo BQ, Citó AMGL, Silva J, Saffi J, Richter M, Alexandre Ferraz ABF (2011) Antioxidant properties and chemical composition of technical Cashew Nut Shell Liquid (tCNSL), Food Chem. 126:1044-1048.

Attanasi OA, Filippone P (2003). Cardanolo: una preziosa materia prima rinnovabile, La chimica e l'industria 85: 11-12.

Gómez-Caravaca AM, Verardo V, Caboni MF (2010) Chromatographic techniques for the determination of alkylphenols, tocopherols and other minor polar compounds in raw and roasted cold pressed cashew nut oils, *J. Chromatogr. A* 1217: 7411-7417.

Hu M, Jacobsen C (2016) Oxydative stability and shelf life of foods containing oils and fats, Amsterdam: Elsevier.

Kanner J (2007) Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health, *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 1094 – 1101.

3. Obiettivi

Per il raggiungimento degli obiettivi del progetto della tesi di dottorato il lavoro è stato suddiviso nelle seguenti attività secondo il diagramma di Gantt riportato in Tabella 1:

- A1) Studio della letteratura scientifica e della normativa europea relativa agli antiossidanti autorizzati e al loro impiego in alimenti e mangimi. Studio mirato della letteratura scientifica su antiossidanti naturali innovativi, con particolare attenzione a quelli caratterizzati da un basso impatto ambientale ed etico (es. composti estraibili convenientemente da sottoprodotti) e/o potenzialmente positivi per la salute del consumatore.
- A2) Selezione di uno più composti antiossidanti naturali innovativi di potenziale interesse. Caratterizzazione chimico-fisica e valutazione preliminare della loro attività antiossidante.
- A3) Sviluppo di un “sistema modello” costituito da matrici lipidiche di origine vegetale e/o animale, addizionate con l’antiossidante innovativo oggetto di studio e con antiossidanti tradizionali, sia sintetici che naturali. Valutazione comparativa dell’efficacia antiossidante tramite test di ossidazione accelerata e analisi chimiche quali-quantitative dei principali marker di ossidazione a seguito di stress termici.
- A4) Produzione su scala di laboratorio e/o impianto pilota di alimenti/mangimi addizionati con l’antiossidante innovativo e con gli antiossidanti tradizionali. Monitoraggio delle performance antiossidanti nel tempo tramite studi di *shelf life*, integrando analisi chimiche periodiche e valutazioni sensoriali mirate per valutare l’evoluzione della qualità del prodotto.
- A5) Valutazione critica dei metodi analitici impiegati e dei marker molecolari utilizzati per monitorare l’ossidazione lipidica, al fine di identificare le strategie più adatte al contesto specifico e trasferibili ad una realtà aziendale di piccole-medie dimensioni.
- A6) Valutazione della fattibilità tecnica, economica e della sostenibilità ambientale riguardo l’impiego dell’antiossidante innovativo su scala industriale. Analisi delle possibili modalità di *scale-up* e ottimizzazione del processo.
- A7) Redazione della tesi di dottorato e di articoli scientifici, elaborazione di poster e presentazioni orali in occasione di eventi scientifici nazionali e internazionali.

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

[illegible]

4. Stato di avanzamento della ricerca e principali risultati

Finora, le attività sperimentali si sono concentrate sulla caratterizzazione e valutazione del CNSL e del cardanolo distillato come potenziali antiossidanti innovativi. L'analisi della composizione dei campioni, ancora in corso, è stata condotta tramite cromatografia su strato sottile (TLC) e gascromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC-FID). Sono inoltre in valutazione ulteriori tecniche analitiche, quali la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) e la gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS).

Anche lo studio dell'attività antiossidante e il confronto con gli antiossidanti tradizionali sono tuttora in corso. In una prima fase è stata condotta un'indagine per determinare le concentrazioni minime efficaci di CNSL e cardanolo in "sistemi modello" a base di olio di soia e olio di girasole, basandosi sul valore dei perossidi di questi oli additivati dopo averli sottoposti ad uno stress termico. Una volta identificate alcune concentrazioni target, che rappresentano un compromesso tra efficacia e applicabilità industriale, si è proceduto con il confronto diretto con antiossidanti di uso comune. Attualmente, sono in corso studi sui parametri ossidativi in "sistemi modello" costituiti da olio di girasole additivato con quantità crescenti di CNSL e cardanolo, e con concentrazioni di riferimento di antiossidanti tradizionali. I campioni sono stati sottoposti a test di ossidazione accelerata mediante strumento OXITEST[®]; i risultati ottenuti hanno evidenziato un'efficacia del CNSL allo 0,6% comparabile a quella del BHT allo 0,01%, e del CNSL all'1% non distante da quella ottenuta con estratto di tocoferolo allo 0,04%, estratto di rosmarino allo 0,005%, BHA allo 0,02% e TBHQ allo 0,02% (Fig. 1). Il cardanolo, invece, ha mostrato un'attività antiossidante minore del CNSL, facendo sorgere l'ipotesi di una sinergia tra i vari composti alchilfenolici del CNSL per quanto riguarda il loro potere antiossidante. Per confermare ulteriormente questi risultati, sono in corso ulteriori analisi su parametri indicativi dell'ossidazione, condotte sugli stessi campioni di olio dopo esposizione a stress termici. In particolare, è stata determinato il numero di perossidi (indice di ossidazione primaria) mediante metodo titrimetrico. I risultati ottenuti confermano in larga parte quanto osservato con OXITEST[®], anche se alcune analisi hanno evidenziato problemi di interferenza. I prossimi passi prevedono l'ottimizzazione della procedura di analisi dei perossidi e la prosecuzione delle analisi sui prodotti di ossidazione secondaria. A tal fine, è già in corso la quantificazione dei composti volatili mediante GC-MS con analisi dello spazio di testa e micro-estrazione in fase solida (SPME-GC-MS), nonché lo studio della formazione di acidi grassi ossidati (OFA) tramite GC-FID. È inoltre prevista la sperimentazione di concentrazioni più elevate di CNSL e cardanolo, così come la valutazione di ulteriori dosaggi degli antiossidanti tradizionali per un confronto più ampio e approfondito.

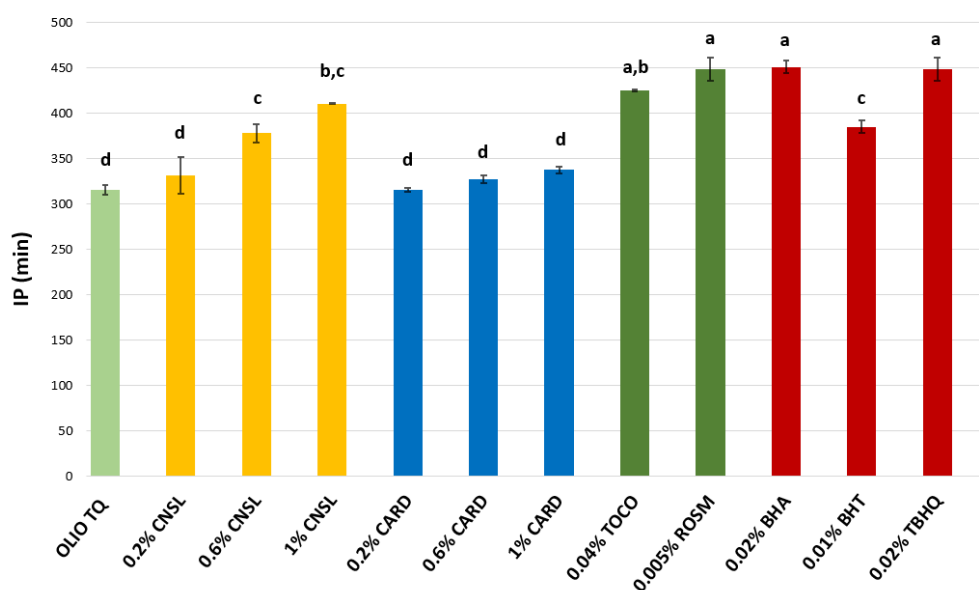


Figura 1 - IP (Induction Period) ottenuto tramite OXITEST[®]: confronto tra olio di girasole tal quale e additivato con CNSL, cardanolo e antiossidanti tradizionali

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

Antonioni V, Pasini F, Marzocchi S, Passeri S, Caboni MF. Evaluation of antioxidant strategies in pet food shelf life management: same case studies, in: Euro Fed Lipid – Book of Abstracts (Atti di: 5th International Symposium on Lipid Oxidation and Antioxidants, 08-10 July 2024, Bologna, Italy).

Strategie di autenticazione di bevande spiritose e di prodotti del settore vitivinicolo

Silvia Arduini (e-mail: silvia.arduini2@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: XXXIX; Anno di frequenza: II

Tutor: Prof. Fabio Chinnici; Co-tutor: Prof.ssa Alessandra Bendini

1. Stato dell'arte

Negli ultimi anni, l'autenticazione degli alimenti e la tracciabilità dell'origine geografica hanno assunto un ruolo sempre più rilevante, in risposta alla crescente diffusione di frodi nel settore agroalimentare. Bevande spiritose e prodotti vitivinicoli, per il loro elevato valore economico e identitario, sono tra i più esposti alla contraffazione, in particolare quelli a Indicazione Geografica (IG) e Denominazione di Origine Protetta (DOP).

In ambito europeo, sono riconosciute 47 categorie di bevande spiritose e circa 250 IG, con l'Italia in posizione di primo piano. Queste ultime devono rispettare sia i requisiti di categoria comunitari che specifici disciplinari di prodotto IG, richiedendo metodi analitici efficaci per garantirne autenticità e tracciabilità. Attualmente, i metodi di autenticazione si articolano principalmente in due categorie. Il primo approccio si basa sull'identificazione di specifici marcatori chimici, che possono differire per natura e capacità discriminante. Tra quelli maggiormente impiegati figurano i polifenoli, i composti volatili, gli isotopi stabili e nel caso dei vini la composizione elementare. La rilevazione e la quantificazione di tali marcatori viene generalmente effettuata mediante tecniche cromatografiche, quali HPLC o GC-MS oppure tramite tecniche spettroscopiche quali NMR, IRMS, spettrofotometria di assorbimento atomico (AAS), o plasma accoppiato induttivamente (ICP)-MS. Sebbene tali metodologie offrano generalmente elevata accuratezza analitica, esse presentano alcune limitazioni, tra cui l'elevato costo, la lunga durata delle analisi e l'impiego di reagenti chimici potenzialmente nocivi per l'ambiente. Il secondo approccio si basa sull'analisi del profilo compositivo globale del campione (fingerprinting). Questo tipo di analisi impiega generalmente la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR), nelle regioni del vicino (NIR) e medio (MIR) infrarosso, combinate con metodi di analisi statistica multivariata. Tali tecniche sono comunemente utilizzate per la determinazione dell'origine geografica e della varietà botanica. Tuttavia, la classificazione in base all'origine, al processo produttivo o alla qualità del prodotto risulta complessa, poiché non esistono composti singoli o gruppi di composti univocamente associabili a ciascun parametro. Nonostante ciò, questi approcci si distinguono per rapidità, costi contenuti e buona accuratezza, configurandosi come strumenti promettenti per l'autenticazione analitica. In alcuni casi, si ricorre a strategie analitiche integrate, che combinano l'identificazione di marcatori specifici, l'analisi del profilo chimico e l'applicazione di modelli statistici avanzati, al fine di aumentare l'affidabilità e la robustezza dei modelli di classificazione e autenticazione.

2. Bibliografia

- Giannetti V, Mariani MB, Marini F, Torrelli P, Biancolillo A (2020) Grappa and Italian spirits: Multi-platform investigation based on GC-MS, MIR and NIR spectroscopies for the authentication of the Geographical Indication, *Microchem. J.* 157: 104896.
- Petrozziello M, Rosso L, Portesi C, Asproudi A, Bonello F, Nardi T, Rossi AM, Schiavone C, Scuppa S, Cantamessa S, Pollon M, Chiarabaglio, PM (2022) Characterisation of Refined Marc Distillates with Alternative Oak Products Using Different Analytical Approaches, *Appl. Sci.* 12: 8444.
- Pontes MJC, Santos SRB, Araújo MCU, Almeida LF, Lima RAC, Gaião EN, Souto UTCP (2006) Classification of distilled alcoholic beverages and verification of adulteration by near infrared spectrometry, *Int. Food Res.* 39: 182–189.

3. Obiettivi

Il presente progetto di dottorato si propone di individuare strategie analitiche efficaci per la caratterizzazione e l'autenticazione di bevande spiritose e prodotti vitivinicoli, anche in relazione alle tecnologie di produzione impiegate. L'indagine si concentra su prodotti italiani tutelati da denominazione di origine o indicazione geografica. Le strategie selezionate saranno valutate non solo per la loro affidabilità analitica, ma anche in termini di impatto ambientale, sostenibilità economica e rapidità di esecuzione. Per perseguire l'obiettivo della ricerca si prevede di utilizzare varie tecniche analitiche, sia cromatografiche che spettroscopiche abbinate a metodi di analisi statistica univariata e multivariata.

Il progetto può essere suddiviso nelle seguenti attività secondo il diagramma di Gantt riportato in Tabella 1:

A1) Ricerca bibliografica sulle tecniche di analisi per l'autenticazione e la caratterizzazione di bevande spiritose e di prodotti del settore vitivinicolo.

A2) Individuazione matrici e tecnologie produttive da investigare, nell'ambito delle categorie merceologiche relative ai distillati, ai vini ed ai prodotti della filiera vitivinicola il cui processo produttivo sia disciplinato in modo riconosciuto ed accettato, anche a seguito di previsioni che discendono dalla legislazione nazionale e/o europea. Dovranno essere prese in considerazione anche le modalità di campionamento delle suddette matrici che oltre ad essere rappresentative di una certa categoria dovranno essere accompagnate da informazioni che ne descrivano quanto più dettagliatamente la tecnologia di produzione utilizzata.

A3) Caratterizzazione dei campioni mediante tecniche analitiche tradizionali ed elaborazione statistica dei dati ottenuti.

A4) Caratterizzazione dei campioni mediante tecniche analitiche rapide di tipo “fingerprint” ed elaborazione statistica multivariata dei dati sperimentali.

A5) Confronto tra le varie tecniche di analisi al fine di individuare la metodica e/o le metodiche con caratteristiche di rapidità e semplicità di esecuzione, che consentano la migliore discriminazione e caratterizzazione in ambito controllo qualità/verifica di genuinità, anche in relazione alle differenze conseguenti le possibili varianti tecnologiche produttive.

A6) Periodo di ricerca presso istituzione internazionale

A7) Scrittura e redazione della tesi di dottorato, di articoli scientifici e/o di poster e comunicazioni orali.

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) Ricerca bibliografica																			
1) tecniche di analisi tradizionali																			
2) tecniche di analisi di tipo “fingerprint”																			
A2) Individuazione matrici e tecnologie produttive da investigare																			
1) individuazione matrici/tecnologie di interesse economico-produttivo																			
2) valutazione modalità di campionamento presso aziende																			
A3) Analisi dei campioni mediante SPE-GC-MS ed HPLC-DAD-FLD																			
1) ottimizzazione metodica di estrazione (per analisi delle sostanze volatili)																			
2) determinazione sostanze volatili e composti fenolici																			
3) analisi statistica dei dati sperimentali																			
A4) Analisi dei campioni mediante tecniche di tipo “fingerprint”																			
1) ottimizzazione analisi strumentale per tipologia di matrice																			
2) determinazione segnale delle varie matrici																			
3) elaborazione statistica multivariata dei dati sperimentali																			
A5) Confronto tra le varie tecniche di analisi																			
A6) Periodo di ricerca presso istituzione internazionale																			
A7) Scrittura e pubblicazione della tesi di dottorato, poster, articoli scientifici																			

4. Stato di avanzamento della ricerca e principali risultati

- **Ricerca bibliografica.** È stata svolta una ricerca bibliografica per analizzare lo stato dell'arte riguardo ai più recenti sviluppi nelle strategie analitiche utilizzate per l'autenticazione e il controllo di qualità di vini e bevande spiritose, con particolare attenzione ai prodotti a IG e DOP. Questa panoramica dei principali studi ha permesso di orientare il successivo lavoro sperimentale. La ricerca ha inoltre portato alla pubblicazione di una review in una rivista scientifica.
- **Individuazione matrici e tecnologie produttive da investigare.** Sono stati selezionati tre prodotti come oggetto di studio: il brandy italiano e la grappa IG, per il comparto delle bevande spiritose, e il vino DOP Romagna Sangiovese, per il settore vitivinicolo. Nella selezione delle matrici sono state valutate la rilevanza economico-produttiva, la necessità di studi di autenticazione e la fattibilità del reperimento dei campioni. Un aspetto critico negli studi di autenticità è la disponibilità di campioni statisticamente rappresentativi della matrice in esame. Inoltre, l'approvvigionamento da canali commerciali può introdurre incertezze legate all'origine e ai processi produttivi. Per ovviare a tali limitazioni, sono stati coinvolti i consorzi di tutela per la fornitura di campioni tracciati e corredati da informazioni tecniche. A supporto, sono stati predisposti questionari specifici da compilare a cura delle aziende, relativi alle tecnologie produttive impiegate.
- **Brandy Italiano IG: effetti dell'invecchiamento e dei trattamenti subiti dal legno delle botti sul rilascio di composti nei distillati.** La prima matrice analizzata è stata l'IG “Brandy Italiano”. Attualmente esistono pochissime pubblicazioni scientifiche relative ai metodi di autenticazione di questa IG italiana, che deve rispettare specifiche di prodotto peculiari riguardanti l'origine, la produzione e i processi di invecchiamento. Considerato che le condizioni di invecchiamento rivestono un ruolo cruciale nella produzione delle acquaviti di vino, permettendo lo sviluppo delle caratteristiche organolettiche distintive, determinanti per il valore commerciale del prodotto, si è deciso di studiare l'effetto di differenti tecnologie di invecchiamento sulle sostanze volatili e sui composti fenolici, al fine di identificare anche possibili composti marker utili

all'autenticazione. La prima fase dello studio ha valutato l'effetto della durata dell'invecchiamento su campioni maturati per 10, 16, 23 e 33 anni. La seconda fase ha invece previsto l'analisi dell'influenza di due diversi gradi di tostatura (leggera e intensa) e di due diverse durate di stagionatura (24 e 36 mesi) del legno utilizzato per la costruzione delle botti, su campioni invecchiati per 8 mesi. Il profilo dei composti aromatici è stato determinato mediante analisi HPLC-DAD-FLD e SPE-GC-MS. I risultati hanno evidenziato che la durata dell'invecchiamento incide in modo differenziato sui vari composti ceduti dal legno; inoltre, la stagionatura del legno ha mostrato un'influenza significativa sul contenuto di specifici composti fenolici e sul rapporto tra le forme *cis*- e *trans*- del β -metil- γ -ottalattone, mentre il grado di tostatura ha avuto un impatto rilevante su quasi tutti i composti derivanti dalla degradazione della lignina e della cellulosa. È stata infine identificata la 5-acetossimetil-2-furaldeide come possibile composto marker associato al grado intenso di tostatura del legno.

- **Grappa IG monovitigno: caratterizzazione e autenticazione mediante SPE-GC-MS e Flash-GC accoppiata a chemiometria.** La seconda tipologia di prodotto distillato oggetto di studio è stata la grappa IG. Trattandosi di un distillato che, nella maggior parte dei casi, non subisce processi di invecchiamento, la cultivar di origine assume un ruolo chiave nella definizione delle caratteristiche organolettiche del prodotto finale. Per questo motivo, lo studio si è focalizzato sulla differenziazione di grappe monovitigno. Sono stati analizzati campioni mono-varietali ottenuti da quattro vitigni distinti, Moscato, Barolo, Brunello e Prosecco, utilizzando due differenti tecniche analitiche: una tradizionale (SPE-GC-MS) e una rapida di tipo “fingerprinting” (Flash-GC). L'analisi qualitativa e semi-quantitativa della frazione volatile, condotta tramite SPE-GC-MS, ha evidenziato una marcata caratterizzazione delle grappe di Moscato, dovuta all'elevata concentrazione di composti terpenici, in particolare il linalolo. L'elaborazione statistica dei dati mediante ANOVA è in fase di svolgimento. I dati preliminari ottenuti tramite Flash-GC, elaborati tramite PCA, mostrano una discreta separazione tra le varietà analizzate. Ulteriori elaborazioni chemiometriche sono in corso per approfondire il potenziale discriminante del metodo.
- **Romagna Sangiovese DOP: caratterizzazione e autenticazione mediante fluorescenza a raggi X a dispersione di energia (ED-XRF) e chemiometria.** Questa fase del progetto di dottorato è tuttora in corso presso i laboratori del Joint Research Centre della Commissione Europea, situati a Geel (Belgio). La tecnica ED-XRF, applicata all'autenticazione di prodotti alimentari, in particolare bevande alcoliche, consente l'analisi multielementare dei campioni con una preparazione minima, senza l'utilizzo di reagenti chimici, comportando una significativa riduzione dei costi e dell'impatto ambientale. Nonostante il potenziale della tecnica, la letteratura scientifica riguardante l'impiego dell'ED-XRF per la caratterizzazione elementare di bevande alcoliche a fini di autenticazione risulta ancora molto limitata. Nel presente studio sono stati analizzati 30 campioni di vino “Romagna Sangiovese” DOP, con l'obiettivo di determinarne la composizione elementare media e di valutare l'efficacia dell'ED-XRF, in combinazione con tecniche chemiometriche, nella discriminazione di questa denominazione rispetto alla DOP Chianti e ad alcune DOP spagnole. La composizione media degli elementi nei campioni di Sangiovese ha mostrato il seguente ordine decrescente di concentrazione: $K > P > Ca > S > Na > Cl > Mg > Fe > Rb > Sr > Mn > Zn > Ti > Sn > Cu > Ba > Br > Cr > Ni > Pb$. Ai fini dell'autenticazione, i dati ottenuti per il Sangiovese sono stati integrati con dataset precedentemente acquisiti dal JRC su vini DOP Chianti e su vini DOP spagnoli, utilizzando la medesima tecnica analitica, e successivamente elaborati mediante diverse tecniche di analisi statistica multivariata (PCA, SIMCA e PLS-DA). L'analisi PCA ha evidenziato una buona separazione tra le diverse DOP a livello sia nazionale che regionale, mentre i modelli di classificazione basati su SIMCA e PLS-DA hanno mostrato un'accuratezza superiore al 98% in validazione incrociata nella discriminazione tra campioni provenienti da paesi e regioni differenti. Inoltre, sono stati calcolati i punteggi VIP dei modelli PLS-DA, consentendo l'identificazione degli elementi più rilevanti per la discriminazione tra le categorie analizzate.

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

- Arduini S, Chinnici F (2024) Advancements in Analytical Strategies for Authentication and Quality Control of Grappa and Wine Brandy with Geographical Indications, *Appl. Sci.* 14, 8092.
- Arduini S (2024) Strategies for the authentication of spirit drinks and products from the wine sector, *Proc. of 28th Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology*, pp. 12-13.
- Arduini S, Chinnici F (2025) Brandy Italiano I.G.: Effetti dell'Invecchiamento e dei Trattamenti subiti dal Legno delle Botti sul Rilascio di Composti nei Distillati, *Convegno SISTAL “Gli alimenti del futuro”*, Contributo a convegno accettato per la presentazione.
- Arduini S, Chinnici F (2025) Geographical indication “Brandy Italiano”: study on the influence of wood barrel toasting and natural seasoning on endogenous and wood-derived compounds of aged distillates, *Conferenza Macrowine 2025*, Contributo a convegno accettato per la presentazione.

Development and optimization of new processing and packaging technologies for fresh-cut fruit

Giulio Giannini (giulio.giannini3@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: XXXIX; Anno di frequenza: II

Tutor: Marco Dalla Rosa; Co-tutor: Pietro Rocculi

1. State of the art

Nowadays, consumer habits are changing in terms of food consumption and the way food is consumed; consequently, the way food is offered must also change. The average European citizen is evolving towards an increasingly fast-paced and intensive lifestyle; the time spent preparing food is decreasing and workers are increasingly taking their meals outside home (Testa *et al.*, 2021). Consequently, ready-to-eat fruits, which are also categorized as modern convenience foods, are receiving considerable attention from the market as they are designed to save time and preparation work (Contini *et al.*, 2018). Fresh-cut or minimally processed products are defined by IFPA (2002) as fruits or vegetables that undergo minimal physical changes, such as trimming, peeling and/or slicing into a packaged product that is 100% edible and provides high nutritional value, convenience and flavor while retaining its freshness.

The main problem associated with fresh-cut is rapid spoilage, resulting in a shelf life of less than two weeks. The main factors responsible for the quality of fresh-cut fruits include the variety, ripeness at harvest, physiological state of the raw material, storage conditions, preparation steps, packaging characteristics, and processing and storage temperatures (Beaulieu, 2016). The loss of quality of minimally processed fruit is the result of complex chemical and biochemical mechanisms that influence color, texture and organoleptic properties (Sucheta *et al.*, 2019).

For this reason, the fruit undergoes a washing/sanitizing treatment after slicing to improve the deactivation of enzymes and microorganisms. This phase can be carried out by immersion, brushing, spraying or by using new technologies. The classic immersion treatment combines antimicrobial, anti-browning and texturizing substances (Iturralde-García *et al.*, 2022). These include all chlorine derivatives, cysteine, ascorbic acid, citric acid, sorbic acid, sulphites and calcium forms (ascorbate, chloride and calcium lactate). New formulations include the elimination of sulphites and the reduction of chlorine. Examples are concentrated fruit extracts, essential oils, resorcinol, nisin, melatonin (Iturralde-García *et al.*, 2022).

To improve the shelf life of these products, modified atmosphere packaging is also a valid option (Belay *et al.*, 2019). New techniques for stabilizing minimally processed fruit include edible coatings, electrolyzed oxidizing water (EOW), ozone, ultrasound, ionizing radiation and ultraviolet light (De Corato, 2020; Maringgal *et al.*, 2020).

2. References

- Beaulieu JC (2016) Fresh-cut Fruits. In The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks. https://www.academia.edu/en/32669425/Fresh_cut_Fruits_In_The_Commercial_Storage_of_Fruits_Vegetables_and_Florist_and_Nursery_Stocks_USDA_ARS_Agriculture_Handbook_66
- Belay ZA, Caleb OJ, Opara UL (2019) Influence of initial gas modification on physicochemical quality attributes and molecular changes in fresh and fresh-cut fruit during modified atmosphere packaging. Food Packag. Shelf Life 21: 100359. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100359>
- Contini C, Boncinelli F, Gerini F, Scozzafava G, Casini L (2018) Investigating the role of personal and context-related factors in convenience foods consumption, Appetite 126: 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2018.02.031>
- De Corato U (2020) Improving the shelf-life and quality of fresh and minimally-processed fruits and vegetables for a modern food industry: A comprehensive critical review from the traditional technologies into the most promising advancements, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 60 (6): 940–975. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1553025>
- IFPA (2002). International Fresh-Cut Produce Association.
- Iturralde-García RD, Cinco-Moroyoqui FJ, Martínez-Cruz O, Ruiz-Cruz S, Wong-Corral FJ, Borboa-Flores J, Cornejo-Ramírez YI, Bernal-Mercado AT, Del-Toro-Sánchez CL (2022) Emerging Technologies for Prolonging Fresh-Cut Fruits' Quality and Safety during Storage, Horticulturae (Vol. 8(8):731. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080731>
- Maringgal B, Hashim N, Mohamed Amin Tawakkal IS, Muda Mohamed MT (2020) Recent advance in edible coating and its effect on fresh/fresh-cut fruits quality, Trends Food Sci. Tech. 96:253–267. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.024>
- Sucheta A, Singla G, Chaturvedi K, Sandhu PP (2019) Status and recent trends in fresh-cut fruits and vegetables. In Fresh-Cut Fruits and Vegetables: Technologies and Mechanisms for Safety Control. Elsevier Inc., pp. 17–49. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816184-5.00002-1>

Testa R, Schifani G, Migliore G (2021) Understanding consumers' convenience orientation. An exploratory study of fresh-cut fruit in Italy, Sustainability 13(3): 1–13. <https://doi.org/10.3390/su13031027>

3. Objectives

The present research project aims to identify, develop and optimize different technologies for the stabilization of fresh-cut fruits in order to slow down the occurrence of microbiological and physicochemical phenomena responsible for the loss of safety and quality of the products during shelf life. In addition, the project focuses on the elaboration of operating procedures to be developed and implemented in an industrial context by carrying out experimental tests at laboratory/pilot scale up to pre-industrial/industrial tests in the plant, also with the possible support of equipment manufacturers.

The doctoral thesis project can be divided into the following activities, summarized in the Gantt chart shown in Table 1:
A1) Study and formulation of dipping treatments in order to create new blends or optimize the old ones to be integrated them in the company processes.

A2) Study e and formulation of edible coatings to improve product quality and sensorial acceptance by incorporation of active molecules.

A3) Study and application of emerging sanitizing treatments such as plasma activated water, electrolyzed water, ozone treatments.

A4) Conducting preliminary tests with high-pressure CO₂ treatments in order to explore this new processing technology and its feasibility on fruit.

A5) Transfer of knowledge gained in the laboratory to industrial scale in order to significantly improve process quality of the company

A6) Thesis preparation and publication of scientific articles

Table 1: Gant chart with the expected duration of different research activities.

		Time [month]																						
RESEARCH ACTIVITY		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	36						
A1	Study and formulation of dipping treatments																							
	1) Trials with different solutions for preventing browning and improving texture																							
	2) Formulation of effective dippings and testing in the company																							
A2	Study and application of emerging sanitizing treatments																							
	1) Trials with different non-thermal technologies for improving microbial quality																							
	2) Testing in the company																							
A3	Study e and formulation of edible coatings																							
	1) Formulation of coatings with different materials																							
	2) Formulation of coatings encapsulated with active molecules																							
A4	Metabolic understanding of fresh-cut fruit behavior to stresses																							
	1) Assessing the feasibility of the technology for fresh-cut fruit																							
A5	In plant testing and application of studied innovations																							
A6	Thesis preparation and publication of scientific articles																							

4. Research advancement and main results

The first relevant activity of my research was the formulation and optimization of the dipping solution for fresh cut avocado. The blend was composed of cysteine and calcium chloride. Apricot is a difficult fruit to preserve and is not sold in the Italian market as ready-to eat. However, a formulation to preserve apricot from browning and textural losses have been carried out and won the third price for innovation “Better Future Award” at TuttoFood26 exhibition contest. At last, another optimization was successfully performed on strawberries. All these three new dipping are applied in the company production lines on a daily basis.

In parallel, shelf life studies applying non-thermal sanitizing technologies were carried out. At first, electrolyzed water technology from Sanodyna was tested. The treatments were applied with a final washing step in the company on multiple fruits (coconut, peaches, melon, water melon) with mixed results. On average, 1 log of bacterial reduction from TBC was achieved, but this was not sufficient for the company to apply the technology on a daily basis. The interest switch on

ozone. Ozone has been used as disinfectant for fruit and vegetables since many years. However, treating the fruit after cutting leaves the bacteria in a perfect condition to build up defenses. The ozone treatment followed a more structured approach and also metabolic responses of fresh cut apples were measured (fig. 1). The apples were sliced in the company line and followed four treatment combinations (control (ctrl), company dipping (aa), ozone (oz), company dipping plus ozone (ozaa)). Ozone was applied in a prototype tunnel simulating the end of a production line. Water was sprayed and ozone gas was dissolved into the water vapor fog. The apple slices had a contact time of 90 seconds and the ozone concentration was 60 mg/L.

Despite having no effect on the microbes, the data clearly showed a metabolic stimulation for the ozone treated samples; however, the treatment ozaa showed a reduction of the metabolic response, hence improving quality.

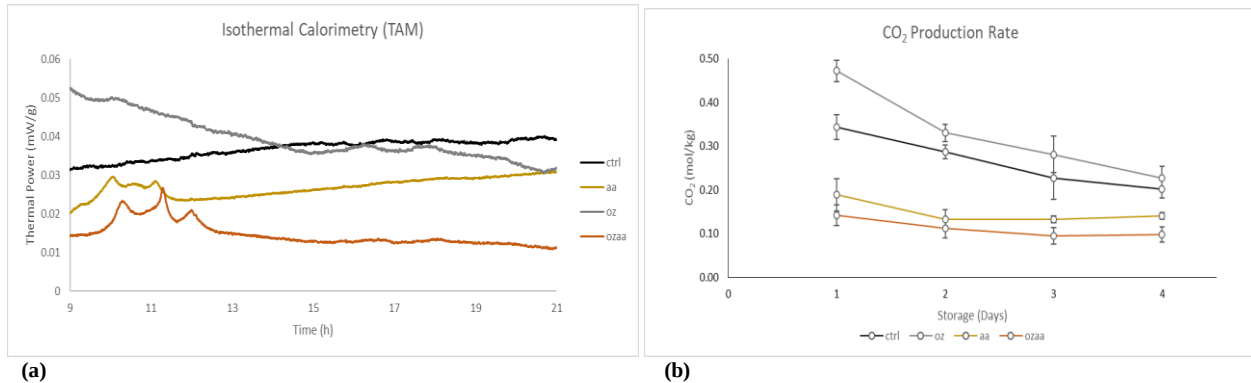


Figure 1. Metabolic heat released in time (a). CO₂ production rates in days (b)

Edible coatings have been proved to be effective but also not accepted by consumers. However, some coatings are absorbed by the vegetal tissue without been visible. Chitosan extracted from fish waste behaves in such way and it is tasteless. Therefore, commercial chitosan (sigma) and our chitosan (mantis) were dissolved in ascorbic acid and tested on fresh cut apples. The microbial results showed a reduction of 1 log ufc/g for yeasts. However, the performance for color preservation was lower than control: ascorbic acid dipping (2 %).

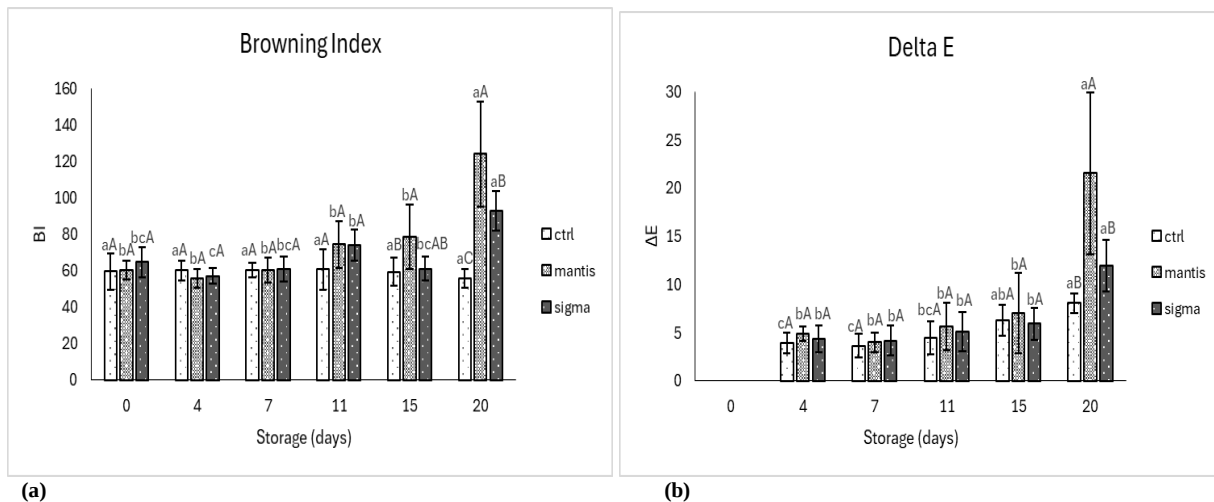


Figure 2. Browning development during storage (a). Delta E changes during storage (b).

The fresh cut industry produces tons of food waste from the processing operations. This food material is a big expense for companies in order to dispose it. However, this by-product is rich in active compounds that can be extracted. An extraction ultrasound-assisted with NaDES based solvent was carried on a dried powder from avocado kernel aiming to extract antioxidant compounds to be used to treat fresh-cut avocado as browning inhibitors. A central composite design was carried out and the extraction was optimized for total phenols content (TPC) giving an amount of sample of 1.00 g and an extraction time of 10, 20 and 30 minutes. In order to prove the best condition of the result the pure extracts are planned to be tested directly of avocado fruit.

Determination of new types of food coloring and application in food products with a biotechnological basis

Sona Hajiyevea (email: sona.hajiyevea2@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: XXXIX; Anno di frequenza: II

Tutor: Assoc. Prof. Francesca Patrignani; Co-tutor: Prof. Rosalba Lanciotti, Asst. Prof. Saida Aliyeva

1. State of the art

The food industry has increased interest in microbial pigments due to their natural sources and multifunctionality. The trend of consumers demanding natural sources and solutions has driven up demand from various sources of microbial pigments, especially in more specific health markets such as β -carotene, riboflavin, and pulcherrimin, monacolin, (Sharma *et al.*, 2024). Pigments provide food products with vibrant colours that are pleasing to consumers visually and provide antioxidant and preservative functions (Sharma *et al.*, 2024). A movement away from synthetic colourants (often associated with health impacts) has created a market for synthetic color alternatives (Sharma *et al.*, 2024).

Color is an important determinant of food acceptance and food perception. Visual changes to food, particularly in storage, can be perceived as a decline in quality. Color changes generally indicate oxidation changes, microbial changes, or even a defect in production, transportation, or storage. Therefore, microbial pigments could serve as a sustainable alternative to artificial dyes and be healthy, providing bright colors while providing additional functional benefits (Kumar *et al.*, 2022). For instance, the ability of *Monascus species* to produce red, orange, and yellow pigments has been the subject of much research. Optimizing environmental and nutritional factors to increase pigment production in these species has been the subject of numerous studies (El-Sayed *et al.*, 2022). Because of its capacity to inhibit spoilage organisms, *Metchnikowia pulcherrima*, a yeast species frequently found in the wine and fermentation industries, has been identified as a natural biocontrol agent. It produces a reddish secondary metabolite called pulcherrimin, which has garnered attention because of its demonstrated antioxidant and antimicrobial properties in some biological tests (Testa *et al.*, 2024).

According to, some species of *Rhodotorula* sp. are among the top microorganisms that produce carotenoid pigments. They are especially well-known for their effectiveness in synthesizing β -carotene, torulene, and torularhodin. Apart from their capacity to produce pigment, these yeasts are prized for their diverse nutritional makeup, which includes significant amounts of proteins, fats, and vitamins (Tong *et al.*, 2025).

Microorganisms have been the leading source of natural colorants due to their efficiency and flexibility over plants and other multicellular organisms in an industrial context (Vaidya *et al.*, 2021). Their rapid growth, ability to use cheap, renewable substrates, and high tolerance under controlled conditions make them ideal for the large-scale, sustainable production of pigments. (Mohd, 2023). Microbial pigments have two advantages over manufactured and inorganic pigments. First, compared to traditional chemical synthesis, fermentation-based production is more cost-effective, scalable, and faster. Second, microbes possess a large and highly manipulable genomic architecture. The biosynthesis of microbial pigments occurs under numerous conditions. Multiple variables such as temperature, aeration, light exposure, mineral and vitamin content, the type and concentration of a carbon and nitrogen source, in addition to stressors in their environment have been shown to affect the type and quantity of pigment produced.

Microbial pigments compare favorably with synthetic dyes and colors, though the most impactful probably being economic, along with the scale of production, and the possibility of production from microbial fermentation technologies (Marey *et al.*, 2024). In many cases, processes can provide maximum yield during fermentations, with lower costs and simpler extraction (Marey *et al.*, 2024). Pigments can also be supplied throughout the year, independent of seasonal sources (Poorniammal *et al.*, 2021). That is attractive and follows the clean label trend and demand for naturally sourced food ingredients (Lee *et al.*, 2025).

This research will investigate the application of microbial pigments to food systems with consideration for color (visual attributes) and food safety compliance. Several microorganisms have been investigated to produce pigments, such as *Monascus ruber*, *Metchnikowia pulcherrima*, and *Rhodotorula mucilaginosa*, in a controlled laboratory environment. Central Composite Design (CCD) have been set-up for each microorganism considered to optimize the fermentation/growth parameters for maximum pigment production, establishing optimal conditions for pigment biosynthesis.

In the second stage of the study, the biological characterization of the produced microbial pigments will be set-up. Activities measured include, but are not limited to, antioxidant activities, antimicrobial properties, and stability under various environmental conditions. After evaluating these data, the pigments will be incorporated into model food systems and measure sensory attributes to assess qualities such as stable shelf life and regulatory compliance. The goal is to assess the feasibility of these pigments as natural colorants in real food applications and to develop functional, visually appealing formulations suitable for industry use.

2. References

- El-Sayed ESR, Gach J, Olejniczak T, Boratyński F (2022) A new endophyte *Monascus ruber* SRZ112 as an efficient production platform of natural pigments using agro-industrial wastes, *Sci. Rep.* 12(1): 12611.
- Lee CC (2025) Microbial Pigments: Fermentative Production and Biological Activities. In *Bio-prospecting of Novel Microbial Bioactive Compounds for Sustainable Development: Management of Natural Resources Through Microbial Conversion into Valuable Products*, Cham: Springer Nature Switzerland, pp. 43-65.
- Marey MA, Abozahr R, El-Nikhely NA, Kamal MF, Abdelhamid SM, El-Kholy MA (2024) Transforming microbial pigment into therapeutic revelation: extraction and characterization of pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* and its therapeutic potential as an antibacterial and anticancer agent, *Microb. Cell Fact.* 23(1): 174..
- Mohd Said F (2023) Production of Microbial Pigment in a Bioreactor. In *Plant Specialized Metabolites: Phytochemistry, Ecology and Biotechnology*, Cham: Springer Nature Switzerland, pp. 1-19.
- Morata A, Loira I, Escott C, del Fresno JM, Bañuelos MA, Suárez-Lepe JA (2019) Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in wine biotechnology, *Fermentation* 5(3): 63.
- Poorniammal R, Prabhu S, Dufossé L, Kannan J (2021) Safety Evaluation of Fungal Pigments for Food Applications, *JoF* 9(7): 692.
- Sharma N, Shekhar P, Kumar, Kaur H, Jayasena V (2024) Microbial pigments: Sources, current status, future challenges in cosmetics and therapeutic applications, *J. Basic Microbiol.* 64(1): 4-21.
- Sen T, Barrow C, Deshmukh S (2019) Microbial Pigments in the Food Industry—challenges and The Way
- Testa B, Coppola F, Iorizzo M, Di Renzo M, Coppola R, Succi M (2024) Preliminary Characterisation of *Metschnikowia pulcherrima* to Be Used as a Starter Culture in Red Winemaking, *Beverages* 10(3): 88.
- Tong B, Yu Y, Shi S (2025) *Rhodotorula* sp. as a promising host for microbial cell factories, *Metab.Eng.* 90:178-196.
- Vaidya H, Upasani N, Wagh PS (2021) Microbial Pigments: Natural Colorants and their Industrial Applications, *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 5: 2319-7706.
- Venil CK, Dufossé L, Renuka Devi P (2020) Bacterial pigments: sustainable compounds with market potential for pharma and food industry, *Front. Sust. Food Syst.* 4: 100.

3. Objectives

The demand for natural and safe food colorants has increased significantly in recent years due to growing consumer health and environmental awareness. Microbial pigments, derived from microorganisms like bacteria, fungi, algae, and yeast, have emerged as promising alternatives to synthetic food dyes. This project explores the feasibility, safety, and effectiveness of using microbial pigments in food applications. To reach this purpose, the doctoral thesis project can be divided into the following activities, summarized in the Gantt chart shown in Table 1:

- A1) Microorganism Selection for Biotechnological Food Coloring and performance optimization.** The best candidates for the project purpose were selected according to the literature and different Central Composite Design (CCD) were used to identify, for each microorganism, the most suitable conditions for pigment production. Temperature, pH, carbon, and nitrogen source were key parameters investigated in searching for the ideal conditions for food colorant production. The experimentation phase is complete, and now the ideal conditions for a specific microorganism have been identified and established.
- A2) Pigment Production and Extraction.:** This study determined the extraction method according to each bacterium's cellular structure and pigment production capacity. The applied extraction methods were suitable for these microorganisms, and additional studies may have improved them further.
- A3) Purification and Characterizations.** In the purification process, a chromatographic approach, to isolate the pigment and characterize it using techniques like UV-vis, and FTIR-will be used. The goal is to achieve successful isolation of a pure pigment with stable color properties suitable for food applications. Through comprehensive characterization, a deeper understanding of the pigment's chemical and biological properties will be reached, ensuring their safety and quality for use in food products.
- A4) Biological Activities Determination:** The research will evaluate the biological activities of microbial pigments, focusing on their antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory properties. This assessment aims to uncover their potential health benefits, emphasizing their value in functional foods and nutraceuticals.
- A5) The utilization of microbial pigments in foods.** This project will optimize microbial pigments through safety and shelf-life studies, evaluating their impact on food safety, shelf-life, and sensory properties. The goal is to enhance their application, validate their safety, and improve both sensory and functional attributes in food products.
- A6) Writing and publication of the doctoral thesis, posters, scientific articles and oral presentation:** Since some studies have been completed, we are working on manuscript preparation and oral and poster presentations.

Table 1. Gantt chart with the expected duration of different research activities

Attività	Mese	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
A1) Literature review and microorganism selection																			
2) Central Composite Design (CCD) for pigment production related to growth conditions																			
A2) Pigment Production and Extraction																			
1) Extracellular pigments analysis																			
2) Intracellular pigments analysis																			
A3) Purification and Characterizations																			
1) Purification of pigment by column chromatography																			
2) Characterization of pigment by UV-vis, and FTIR																			
A4) Biological Activities Determination																			
1) Antimicrobial activity																			
2) Antioxidant activity determined by DPPH/ABTS assay																			
A5) The Utilization of Microbial Pigments in Foods																			
1) Determination of the Toxicity Properties of Pigments																			
2) Stability studies evaluated under different conditions																			
3) Sensory evaluation of colored foods																			
A6) Preparation of the thesis and articles																			

4. Research advancement and main results

For each considered microorganism, microbial pigment production was investigated under varying cultivation conditions, including different carbon and nitrogen sources, mineral concentration, pH levels, and incubation temperatures. Central Composite Designs (CCD) were applied to optimize key parameters for each microorganism. Pigments were extracted using appropriate solvents and quantitatively analyzed by spectrophotometric methods to evaluate yield under each condition.

According to this study's preliminary findings, carbon, nitrogen, and mineral sources significantly influence pigment production across all three microbial strains: *Rodotorula mucilaginosa*, *Metschnikowia pulcherrima*, and *Monascus ruber*. These nutritional factors play a crucial role in determining the intensity and yield of the pigments produced. To gain deeper and more precise insight into these effects, optimization studies were conducted using CCD. This approach is expected to provide a detailed understanding of the interactions between selected variables and to help identify the optimal conditions for maximizing pigment yield. For *Monascus ruber*, the highest total red pigment production was observed under the condition using glycerol as the carbon source and peptone as the nitrogen source (GL-P), reaching 152.75 U/g·L. In *Rhodotorula mucilaginosa*, among all tested combinations, the highest carotenoid concentration was recorded in the medium containing malt extract and yeast extract (M-Y), reaching 0.040 mg/100 mL. The highest pigment concentration produced by *Metschnikowia pulcherrima* was measured as 0.487 mg/mL in a medium containing glucose (20 g/L), peptone (3 g/L), yeast extract (2 g/L), (NH₄)₂SO₄ (3.2 g/L), K₂HPO₄·3H₂O (0.5 g/L), MgSO₄·7H₂O (0.5 g/L), and FeCl₃ (0.5 g/L), under moderate cultivation conditions.

This study demonstrates the importance of optimizing nutritional and environmental conditions to enhance microbial pigment production. The preliminary findings suggest that each strain responds differently to carbon, nitrogen, and mineral sources, highlighting the need for targeted optimization strategies. Through the application of CCD, tailored production conditions can be developed that can increase pigment yield and ensure reproducibility. These findings support the potential use of microbial pigments as sustainable natural colorants in food applications.

The selected production conditions will assess the pigments' chemical, physical, and biological properties in the step study phases. Based on these properties, potential industrial applications will be evaluated through the formulation studies. Once we have selected the pigments that respond to promising food-coloring potential, they will be assessed for safety through toxicity studies and stability. After selecting the pigments with promising potential as food colorants, they undergo toxicity and stability analyses to ensure their safety and suitability for food applications.

5. List of publications produced as part of the doctoral activity

- Hajiyeva S, Cankili MY, Kilic V, Gorgulu S, Patrignani F, Lanciotti R (2025) An insight into the potential antioxidant, anticancer and antimicrobial activities of *Geitlerinema* sp. C-phycoerythrin extracts, *Algal Research* 85: 103836.
- Hajiyeva S, Patrignani F, Lanciotti R, Aliyeva S, Siroli L (2025) Optimizing Microbial Pigments as Natural Food Colorants with Nutritional Benefits for Future Sustainable Food Systems. Poster presented at EFFoST2025 – Fostering the Transition to Sustainable Food Systems, Porto, Portugal, November 2025.

Emerging processing technologies for sustainable production of innovative foods

Busra Oktar (email: busra.oktar@unibo.it)

Department of Agro-Food Sciences and Technologies, *Alma Mater Studiorum* – University of Bologna

Doctoral Course: Agricultural, Environmental and Food Sciences and Technologies

Topic: Food Science and Biotechnology; Doctoral cycle: XXXIX; Year of the attendance: II

Tutor: Pietro Rocculi; Co-tutor: Ana Cristina De Aguiar Saldanha Pinheiro

1. State of the art

The human population is growing day by day. The United Nations predicts that the world's population will reach about 10 billion people by 2050. The demand for food will increase in direct proportion to the increase in population, and in particular, the need for protein will increase. Because of the increasing demand for protein, the consumption of animal protein is also increasing. Annual meat production is expected to increase from 218 million tons in 1997-1999 to 376 million tons by 2030. In order to reduce the damage that of animal-based foods cause to environmental sustainability, the consumption of protein-rich foods of plant origin has increased and various plant-based foods have entered the market (FAO, 2018). The market for plant-based meat analogs is booming and has developed from niche to mainstream. Since 2015, over 6485 new products have been launched on the market worldwide (Boukid, 2021).

Proteins are modified primarily by altering their structure (secondary and tertiary rearrangement and subunit disaggregation) and then changing their primary molecular characteristics to enhance or alter their techno-functional properties when used as a food ingredient (Nikbakht Nasrabadi *et al.*, 2021). There have been many different modification techniques investigated, which, depending on the method, can be divided into physical, chemical, and biological. Physical alterations primarily include creating conformational changes in the protein structure without using particular chemicals. The water-holding capacity (WHC) is a measure that represents the amount of water that a food material can retain and it is a significant quality measure for food. Protein solubility is an important parameter for sensorial and functional properties, and stability of the food products. WAI is an essential feature that influences food cooking properties (Xinhong *et al.*, 2011).

Pulsed Electric Fields (PEF), High Pressure Processing (HPP), Ultrasound (US), and Cold Plasma (CP) are some of the techniques which makes physical alterations on food. Modification of the structure could have an impact on the technofunctional properties as well as allergenicity and nutritional changes (Nowacka *et al.*, 2023). The PEF technique is an emerging technique for the extraction of proteins from raw biomaterials due to its non-thermal and chemical-free processing advantages (Zhang *et al.*, 2021). Ultrasonication is generally used as a pretreatment method in traditional protein disruption protocols as it can disrupt the cell matrix to improve extractability. In addition to simultaneous extraction and modification, ultrasonication is also used to alter the physical, structural and functional properties of protein-based ingredients (Rahman & Lamsal, 2021).

PEF technology is one such green technology that also can reduce drying time and energy consumption. In this technique, an external electric field is applied to disrupt the cell membranes, a process known as electroporation. This facilitates the passage through the permeabilized cell walls and improves mass transfer (Ostermeier *et al.*, 2018). Recent studies have demonstrated the effectiveness of PEF pre-treatment in improving drying processes. For instance, Wiktor *et al.* (2016) have shown that PEF treatment reduces the drying time of carrots by 6.9–8.2% compared to untreated samples. In kiwifruit, PEF improved drying rate however PEF in combination with osmotic dehydration not only increases the drying rate, but also improves the sensory and nutritional quality of the kiwi fruit snacks (Tylewicz *et al.*, 2022). PEF pre-treatment also reduces the drying time of onions by 6.4–30.0% (Ostermeier *et al.*, 2018). However, the use of PEF pre-treatment for drying green peas has not yet been sufficiently researched.

Spirulina platensis, a non-toxic cyanobacterium rich in nutrients such as polysaccharides, vitamins, minerals, unsaturated fatty acids, carotenoids and phycobiliproteins, is often used as a dietary supplement. Among the phycobiliproteins, phycocyanin is valued as a natural blue food colouring (İlter *et al.*, 2018). However, industrial extraction of phycocyanin is limited by challenges in extraction efficiency and stability. Conventional methods often result in low purity and are time consuming. Pulsed electric field (PEF) technology offers a promising alternative to increase the extraction and purity of phycocyanin (Pez Jaeschke *et al.*, 2021).

In order to create a sustainable, healthy and tasty novel product formulation, all these functional changes, the mechanisms and effects of the technologies should be considered holistically and the applications should also be evaluated taking into account the consumer's diet. In this way, food and nutritional alternatives can be created that have a positive effect on both the consumer and the environment.

2. Bibliography

- Boukid F (2021) Plant-based meat analogues: From niche to mainstream, *Eur. Food Res. Technol.* 247(2): 297–308
- Dong X, Zhao M, Yang B, Yang X, Shi J, Jiang Y (2011) Effect of High-Pressure Homogenization on the Functional Property of Peanut Protein'. *J. Food Process Eng.* 34 (6): 2191–2204. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2009.00546.x>.
- FAO. 2018. The future of food and agriculture – Alternative pathways to 2050. Rome
- İlter I, Akyl S, Demirel Z, Koç M, Conk-Dalay M, Kaymak-Ertekin F (2018) Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques, *J. Food Compos. Anal.* 70:78–88.
- Nikbakht Nasrabadi M, Sedaghat Doost A, Mezzenga R. (2021) Modification approaches of plant based proteins to improve their techno-functionality and use in food products, *Food Hydrocolloids* 118: 106789, ISSN 0268-005X, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106789>.
- Nowacka M, Trusinska M, Chraniuk P, Drudi F, Lukasiewicz J, Nguyen NP, Przybyszewska A, Pobiega K, Tappi S, Tylewicz U, et al. (2023) Developments in Plant Proteins Production for Meat and Fish Analogues, *Molecules*, 28(7):2966. <https://doi.org/10.3390/molecules28072966>
- Ostermeier R, Giersemehl P, Siemer C, Töpfl S, Jäger H (2018) Influence of pulsed electric field (PEF) pre-treatment on the convective drying kinetics of onions, *J. Food Eng.* 237: 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.05.010>
- Pez Jaeschke D, Rocha Teixeira I, Damasceno Ferreira Marczak L, Domeneghini Mercali G (2021) Phycocyanin from *Spirulina*: A review of extraction methods and stability, *Food Res. Int.* 143: 110314.
- Rahman MM, Lamsal BP (2021) Ultrasound-assisted extraction and modification of plant-based proteins: Impact on physicochemical, functional, and nutritional properties. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 20: 1457–1480. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12709>
- Simin Zhang, Liangzi Sun, Huapeng Ju, Zhijie Bao, Xin-an Zeng, Songyi Lin (2021) Research advances and application of pulsed electric field on proteins and peptides in food, *Food Res. Int.* 139: 109914, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109914>.
- Tylewicz U, Mannozi C, Castagnini JM, Genovese J, Romani S, Rocculi P, Dalla Rosa M (2022) Application of PEF- and OD-assisted drying for kiwifruit waste valorisation. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 77:102952. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.102952>
- Wiktor A, Nowacka M, Dadan M, Rybak K, Lojkowski W, Chudoba T, Witrowa-Rajchert D (2016) The effect of pulsed electric field on drying kinetics, color, and microstructure of carrot. *Drying Technology*, 34(11): 1286–1296. <https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1105813>

3. Objectives

The title of this PhD research project is ‘Emerging processing technologies for sustainable production of innovative foods’. This project aims to increase efficiency by pre-processing food with new technologies. The foods concerned are also food waste. A second aim is to increase their use in food formulations by modifying the functional and structural properties of the food or its components, such as proteins. This PhD project can therefore recycle waste products and/or improve the functionality of non-waste foods and promote innovative and sustainable production.

The doctoral thesis project can be divided into the following activities, summarized in the Gantt chart shown in Table1:

A1) Bibliographic research on analysis techniques on protein extraction and optimization techniques to be subjected to analysis.

A2) Application of protein extraction and characterization and finding the most repeatable and suitable technique for this research.

A3) Treatment with emerging technologies on plants and by-products to increase the protein extraction yield modification of functional, rheological, and structural properties.

A4) The extracted and/or isolated protein will be evaluated in terms of its functional, rheological and structural properties to identify its possible usages in new food formulations

A5) According to the obtained protein’s functional, rheological, and structural behavior try to improve a final product with the aim of partial replacement of meat and dairy products.

A6) Writing and publication of the doctoral thesis, posters, scientific articles, and oral presentation

Table 1. Gantt chart of the doctoral research activity

Time (months)	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
A1 Bibliographic research	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
A2 Plant-based proteins extraction and characterization				X	X	X	X	X	X	X	X	X						
A3 Set up of non-thermal processing for protein modification							X	X	X	X	X	X	X	X	X			
A4 Optimization of the formulation							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
A5 Application of non-thermal processing for food formulation stabilization										X	X	X	X	X	X	X	X	X
A6 Dissemination of results, preparation of article and thesis			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

4. Research progress and main results

The first experiment was conducted to improve the efficiency of protein extraction and modification of proteins from rapeseed cake by pretreatment with pulsed electric fields (PEF). Subsequently, the required analytical methods were investigated to determine the changes in the functional and structural properties of the isolated protein. As part of the investigation, water-oil holding capacity, emulsification activity and stability, solubility of the protein, differential scanning calorimetry analyzes and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were performed in the laboratory. Statistical information was obtained to determine the significance of the analyzes performed. To evaluate the results of the FTIR analysis, information on the necessary applications was obtained and principal component analysis (PCA) was used to understand the relationships between all these results. To better understand the extraction method and the results obtained, the rapeseed cake was pretreated with different parameters and analyzed using the Osborne fractionation method to determine whether the composition of the protein components had changed. Another technology used was ultrasonic pretreatment for rapeseed extraction. The ultrasound pretreatment applications on rapeseed cake were carried out at different time and frequencies and the results were analyzed and compared in the same way as those after PEF pretreatment. Although no significant change was observed in the extraction efficiency, it was concluded that ultrasound pretreatment had an effect on the physicochemical properties of rapeseed protein.

Following these studies, the drying kinetics of PEF-pretreated fresh peas was selected as a second research topic given the sustainability benefits of PEF technology. PEF parameters (allowing reversible electroporation) and drying temperatures were selected and the results were analyzed using different drying models such as Newton, Page, Handerson and Pabis, Logarithmic, Midilli. Colorimetric analyzes were used to investigate whether the different PEF parameters caused color changes in the peas, shrinkage was determined by CVS analyzes and water activity after drying was also analyzed. The activation energy and thermodynamic calculations performed to better understanding the effect of PEF pretreatment and the effect of different drying temperatures. This study was completed with a life cycle analysis (LCA) using the openLCA software and the Ecoinvent database and applying the ReCiPe 2016 Midpoint (H) method.

The current study is conducted with *Spirulina platensis*. The aim of this study is to investigate PEF effect whether changes in pulse width, voltage, and specific energy make a difference in phycocyanin and chlorophyll extraction. A Box Behnken experimental design was created for this purpose. During the experiments, in addition to the studies on the PEF parameters, some ideas emerged on the stress conditions for *Spirulina* associated with the PEF treatment that resulted in higher phycocyanin extraction. The results showed that increasing the pulse width significantly improved phycocyanin extraction, even when the same or higher specific energy was applied. However, increase in temperature was observed in some samples treated with higher pulse widths, which could potentially affect the efficiency of extraction. This temperature rise was not the same for all samples, suggesting that further investigation is required to fully understand its impact on the extraction process. Furthermore, the PEF treatment was found to be more effective for phycocyanin extraction when applied to less fresh samples.

5. List of publications produced as part of the doctoral activity

- Oktar B, Drudi F, Tylewicz U, Tappi S, Romani S, Gottardi D, Patrignani F, Rocculi P (2024). Effect of high pressure homogenization (HPH) on rheological and functional properties of chickpea flour and its two main components: starch and protein. In *FOODOMICS 2024 – 7th International Conference on Foodomics 2009–2024* (pp. 150–151).
- Oktar B, Pinheiro ACDAS, Tappi S, Barbieri G, Dalla Rosa M, Rocculi P (2024, May 16–17) *Pretreatment of pulsed electric field on rapeseed cake: Functional and structural characterization of rapeseed protein isolate*. XIth International Session of Young Scientific Staff, University of Bologna, Italy.
- Oktar B, Pinheiro ACDAS, Barbieri G, Virgili R, Dalla Rosa M, Rocculi P (2024, September 8–12) *Effect of pulsed electric field on functional and structural properties of rapeseed protein isolate by pretreated rapeseed cake*. IUFoST 2024 – 22nd World Congress of Food Science and Technology, Rimini, Italy.
- Oktar B, Khalangre AB, Pinheiro ACDAS, Tylewicz U, Rocculi P (2025, April 7–10). Optimizing green pea drying: Effects of pulsed electric field on drying kinetics and sustainability. *INOPTeP 2025 – IX International Conference on Sustainable Postharvest and Food Technologies*, Zlatibor, Serbia.

Application of high-resolution nuclear magnetic resonance (HR-NMR) to evaluate the antioxidant properties of natural compounds used to extend the shelf life of food products rich in unsaturated lipid components

Lorenzo Oliverio (email: lorenzo.oliverio2@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: XXXIX; Anno di frequenza: II

Tutor: Francesco Capozzi ; Co-tutor: Elena Babini, Carlo Mengucci

1. State of the art

The preservation of food products rich in unsaturated lipids remains a significant challenge in the agro-food industry due to the susceptibility of these lipids to oxidative degradation, which compromises food quality and safety. Oxidation processes lead to rancidity, off-flavors, and reduced nutritional value, thus limiting shelf life. Traditionally, synthetic antioxidants such as butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA) have been widely used to delay lipid oxidation. However, growing consumer demand for natural and clean-label ingredients has driven research toward identifying and characterizing natural antioxidant compounds derived from plant sources, including polyphenols, flavonoids, and vitamins.

High-resolution nuclear magnetic resonance (HR-NMR) spectroscopy has emerged as a powerful analytical technique in food science for the qualitative and quantitative assessment of complex matrices. Unlike other spectroscopic or chromatographic methods, HR-NMR offers several advantages, including minimal sample preparation, high reproducibility, and the ability to provide detailed molecular-level information on both the antioxidant compounds and the lipid substrates. This enables simultaneous monitoring of antioxidant activity and lipid oxidation products in food matrices.

Compared to traditional analytical techniques such as gas chromatography (GC) and high-performance liquid chromatography (HPLC), HR-NMR provides a more comprehensive profile of the sample without the need for extensive sample preparation or derivatization. While GC and HPLC often require separation steps and the use of solvents or reagents that can introduce variability or artifacts, HR-NMR analyzes the intact sample, preserving its native state. Additionally, HR-NMR allows for non-destructive analysis, which is advantageous for longitudinal studies and quality control.

Spectrophotometric assays, commonly used for antioxidant capacity evaluation (e.g., DPPH, ABTS), provide limited molecular information and often suffer from interference by other sample components. In contrast, HR-NMR can directly identify and quantify specific antioxidant molecules and their interaction with lipid substrates, offering mechanistic insights into antioxidant function.

An important advancement in HR-NMR applications is the coupling with multivariate statistical analyses, such as Principal Component Analysis (PCA). This combination enhances data interpretation by reducing dimensionality and highlighting patterns or clusters within complex spectral datasets, thus improving the discrimination between samples based on their antioxidant profiles and oxidation states. The use of such chemometric techniques facilitates the extraction of meaningful information from large NMR datasets, increasing the robustness and reliability of the conclusions drawn.

Recent studies have demonstrated the capability of HR-NMR to evaluate antioxidant efficacy by tracking the formation and consumption of oxidation markers such as hydroperoxides and aldehydes in oils and emulsions. For example, research by Smith *et al.* (2021) highlighted the use of HR-NMR coupled with PCA to quantify changes in linoleic acid oxidation in the presence of rosemary extract. Similarly, Chen and colleagues (2020) applied HR-NMR and multivariate analysis to characterize the interaction between natural polyphenols and unsaturated lipids in model food systems.

Despite these advances, challenges remain in standardizing HR-NMR protocols for routine antioxidant evaluation and correlating NMR-based findings with sensory and shelf-life data. Moreover, the complexity of natural antioxidant mixtures and the influence of food matrix components require further methodological developments.

This doctoral research aims to contribute to this growing body of knowledge by applying HR-NMR spectroscopy, combined with advanced normalization methods and multivariate analysis, to assess the antioxidant properties of natural compounds specifically designed to extend the shelf life of food products rich in unsaturated lipid components. The focus is on optimizing analytical workflows to improve data interpretability and reliability.

2. Bibliography

- Chen L, et al. (2020). Interaction of Natural Polyphenols with Unsaturated Lipids: Insights from High-Resolution NMR Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 68(14): 4050–4060.
Frankel EN (2012). *Lipid Oxidation*. The Oily Press.

Shahidi F, Zhong Y (2010). Lipid Oxidation and Improving the Oxidative Stability, Chem. Soc. Rev. 39(11): 4067–4079.

Smith JA, et al. (2021) Application of HR-NMR in Monitoring Lipid Oxidation and Antioxidant Efficacy in Edible Oils, Food Chem. 345: 128702.

3. Objectives and expected results

The research aims at a double result: the analytical methodological one and the one of support to the development of food products. The first consists in the generation of analysis procedures aimed at the kinetic study of the oxidation phenomena of foods rich in unsaturated fats. The deliverable, in this case, consists of an analysis protocol for at least three food products, of which at least one is of animal origin.

The second result is the creation of a kinetic data analysis system to optimize the formulation of a food product with a precisely characterized shelf life. In this case, the deliverable consists of a data analysis system, possibly based on machine learning algorithms, to make decisions supported by kinetic data on the optimal formulation for food products with the longest shelf life possible.

This PhD thesis project can be subdivided into the following activities according to the Gantt diagram reported in Table 1.

A1) Bibliographic research and study of the literature.

A2) Different sample-preparation methods evaluation to identify the method that provides the best repeatability on a large scale.

A3) NMR Analysis involving the acquisition of mono- and bi-dimensional spectra, by different experiments for the purpose of qualitative and quantitative analysis.

A4) Application of statistical multivariate analysis to establish an holistic approach to the research.

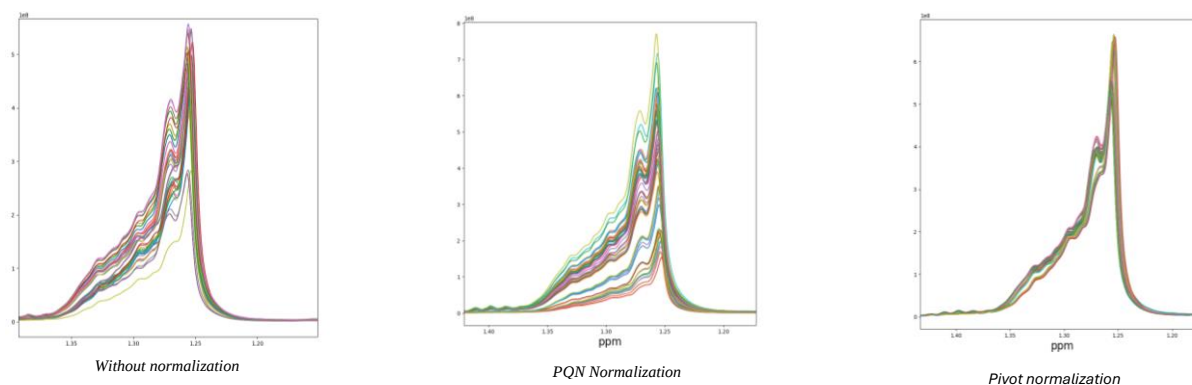
A5) Writing and publishing doctoral thesis, posters, scientific papers and oral presentation

Table 1. Gantt chart related to the planned PhD activities

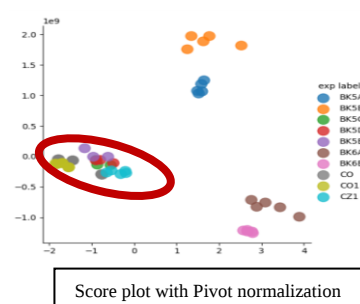
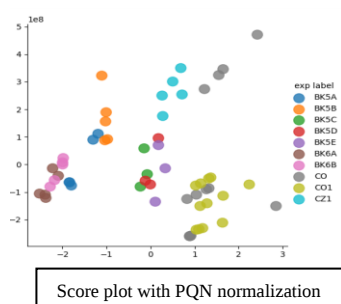
Attività	Mese	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
A1) Bibliographic research		■	■	■	■														
1) NMR analysis of lipid-rich compound from food matrices		■	■	■	■														
2) Biological pathways of lipid oxidation		■	■	■	■														
A2) Different sample-preparation methods evaluation						■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A3) NMR Analysis																			
1) Analysis of lipidic compounds																			
2) Analysis of the lipidic oxidation																			
A4) Application of statistical multivariate analysis																			
1) PCA analysis																			
A5) Writing and publishing doctoral thesis, posters, scientific papers and oral presentation																			

4. Research progress and main results

The research has advanced significantly, leading to several key findings. First, the application of Pivot normalization to the NMR data has proven to be more effective than the commonly used Probabilistic Quotient Normalization (PQN) in highlighting qualitative differences between the various collected samples.



In particular, Pivot normalization significantly improved the outcomes of Principal Component Analysis (PCA), resulting in a much clearer and more distinct clustering of the samples. This enhanced normalization approach has contributed to better interpretability and discrimination within the dataset.



Second, a comparison is currently underway between NMR and gas chromatography results, with the aim of evaluating the potential of the NMR-based method as an alternative for quantitative analysis.

During a three-month research stay at **Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ)** in Ankara, Türkiye, additional work focused on the relaxometric analysis of plant-based protein hydrogels. I personally prepared the hydrogels, which were formulated with two different protein compositions: one containing 20% pea protein, and another combining 15% pea protein with 5% hemp protein. Gels were prepared at six different pH values (5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, and 8) to investigate the influence of pH and protein composition on relaxation behavior and gel structure. In addition to relaxometry, water-holding capacity (WHC) and oil-holding capacity (OHC) were also measured. The same set of analyses was extended to emulsified gels, which I also prepared, incorporating seed oil through ultrasound-assisted emulsification. This allowed for a comprehensive evaluation of their structural and functional properties.

5. List of publications produced as part of the doctoral activities

- Babini E, Vasini EM, Mengucci C, Oliverio L, Guðjónsdóttir M, Bordoni A, Capozzi F (2024) A Foodomics approach for quality assessment of omega-3 supplements from sustainable sources, GIDRM Day, Rome.
- Babini E, Vasini EM, Mengucci C, Oliverio L, Guðjónsdóttir M, Bordoni A, Capozzi F (2024) A Foodomics approach for quality assessment of omega-3 supplements from sustainable source, Foodomics 2024, Cesena.

Approcci innovativi per la messa a punto e la valutazione delle performance di nuove miscele di frittura attraverso analisi chimico-fisiche e sensoriali

Claudia Troisi (e-mail: claudia.troisi3@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: XXXIX; Anno di frequenza: II

Tutor: Prof.ssa Maria Teresa Rodriguez Estrada; Co-tutor: Prof.ssa Tullia Gallina Toschi, Dott. Dario Mercatante, Dott.ssa Matilde Tura, Dott.ssa Daniela Natale

1. Stato dell'arte

La crescente attenzione dei consumatori verso un'alimentazione più salutare e consapevole ha orientato progressivamente la ricerca scientifica e l'industria alimentare verso l'ottimizzazione delle tecniche di cottura, con particolare attenzione all'impatto sulla qualità nutrizionale e sensoriale dei prodotti. Tra i metodi di cottura più diffusi, la frittura continua ad essere una delle tecniche maggiormente impiegate a livello industriale e domestico, grazie alla sua capacità di conferire agli alimenti caratteristiche uniche come la croccantezza ed il flavour (Nikzad *et al.*, 2021). Le elevate temperature impiegate durante la frittura innescano una serie di complesse reazioni chimico-fisiche che interessano sia l'olio utilizzato, sia l'alimento sottoposto al trattamento termico. Nell'olio, le principali trasformazioni sono l'ossidazione e l'idrolisi dei lipidi, che possono portare alla formazione di composti tossici come acroleina ed alcune aldeidi insature. Nel prodotto alimentare, invece, il calore induce processi come la gelatinizzazione dell'amido, la denaturazione delle proteine e la reazione di Maillard, responsabile della formazione di sostanze potenzialmente nocive come acrilammide e ammine eterocicliche aromatiche (Gertz, 2014). Per rispondere a queste criticità, negli ultimi anni si è assistito ad un crescente interesse verso l'impiego di oli da frittura più stabili, anche grazie al miglioramento genetico delle colture oleaginose, che ha portato allo sviluppo di oli vegetali con un'elevata concentrazione di acidi grassi monoinsaturi. Quest'ultimi si distinguono per una maggiore resistenza all'ossidazione e per effetti positivi sulla salute cardiovascolare (Anushree *et al.*, 2017). Parallelamente, si è intensificata la ricerca sull'impiego di composti bioattivi di origine vegetale, come antiossidanti naturali, per migliorare la stabilità ossidativa degli oli durante la frittura. La presenza di tali estratti può, infatti, contribuire a ridurre la formazione di composti nocivi ed a preservare le qualità sensoriali del prodotto fritto. Tuttavia, l'efficacia di questi antiossidanti naturali è fortemente condizionata da molteplici fattori: la loro composizione e concentrazione, le caratteristiche chimiche dell'olio utilizzato, i parametri di processo (tempo e temperatura) e la tipologia di alimento sottoposto a frittura (Li *et al.*, 2023). Pertanto, risulta indispensabile l'impiego di tecniche analitiche che permettano di monitorare i cambiamenti subiti dall'olio durante la frittura e di identificare le soluzioni più efficaci sia dal punto di vista tecnologico che in termini di conformità alle normative di sicurezza alimentare. In tal senso, un approccio multidisciplinare che integri analisi chimico-fisiche e valutazioni sensoriali si rivela fondamentale per una caratterizzazione completa dell'olio e del prodotto finale.

2. Bibliografia

- Anushree S, André M, Guillaume D, Frédéric F (2017) Stearic sunflower oil as a sustainable and healthy alternative to palm oil. A review, *Agron. Sustain. Dev.* 37: 1-10.
- Gertz C (2014) Fundamentals of the frying process, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116(6): 669-674.
- Li C, Chen L, McClements DJ, Liu W, Long J, Qiu C, Wang Y, Yang Z, Xu Z, Meng M, Jin Z (2023) Utilization of plant extracts to control the safety and quality of fried foods - A review. *Compr. Rev. Food. Sci. Food. Saf.* 22(3): 2310-2345.
- Ministero della Sanità (1991) Circolare 11 gennaio 1991 n. 1. (Prot. n. 704/49.00/326).
- Nikzad N, Ghavami M, Seyedain-Ardabili M, Akbari-Adergani B, Azizinezhad R (2021) Effect of deep frying process using sesame oil, canola and frying oil on the level of bioactive compounds in onion and potato and assessment of their antioxidant activity, *Food Sci. Technol.* 41: 545-555.

3. Obiettivi

Per il raggiungimento degli obiettivi del progetto della tesi di dottorato, il lavoro è stato suddiviso nelle seguenti attività secondo il diagramma di Gantt riportato in **Tabella 1**:

A1) Ricerca bibliografica

A2) Messa a punto del disegno sperimentale

A3) Campionamento degli oli

A4) Analisi chimico-fisiche delle miscele da frittura e degli alimenti fritti

A5) Analisi sensoriale delle miscele da frittura e degli alimenti fritti

A6) Elaborazione e correlazione dei dati

A7) Stesura della tesi di dottorato, di report, articoli scientifici e presentazioni a convegni

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)	Ricerca bibliografica																		
A2)	Messa a punto del disegno sperimentale																		
	1) Selezione delle miscele e dei prodotti da valutare in frittura																		
	2) Definizione delle condizioni di frittura																		
A3)	Campionamento degli oli																		
A4)	Analisi chimico-fisiche delle miscele da frittura e degli alimenti fritti																		
A5)	Analisi sensoriale delle miscele da frittura e degli alimenti fritti																		
	1) Test descrittivi																		
	2) Test sul consumatore																		
A6)	Elaborazione e correlazione dei dati																		
A7)	Stesura della tesi di dottorato di report, articoli scientifici, presentazioni a convegni																		

4. Stato di avanzamento della ricerca e principali risultati

Il presente progetto di ricerca si propone di valutare le performance in frittura di oli di semi e miscele di oli attraverso un approccio integrato fondato sulla correlazione di dati ottenuti da analisi chimico-fisiche e sensoriali. È stato messo a punto un piano sperimentale che ha previsto l'impiego di 11 oli e miscele di oli: girasole (G), girasole alto oleico (AO), miscela A (A), miscela B (B), miscela C (C), oliva, olio extra vergine di oliva (EVO), palma, arachide, soia e canola (CAN). Questi oli sono stati sottoposti a frittura semi-continua per cinque giorni, utilizzando patatine stick. Ogni giornata sperimentale ha previsto un preriscaldamento di un'ora, tre sessioni di frittura da 4 min ciascuna intervallate da 15 min di pausa, ed un'ultima ora di riscaldamento al termine del quale sono stati prelevati i campioni di olio da sottoporre ad analisi. Il piano sperimentale prevede l'analisi completa di tre cicli di frittura per ciascun olio. Le analisi chimico-fisiche effettuate sui campioni di olio includono: determinazione dell'acidità libera, determinazione del numero di perossido (PV), determinazione dei composti volatili (VOCs), determinazione del tempo di induzione (OSI), determinazione dei composti polari totali (TPC).

Attualmente è stato completato il primo ciclo di frittura per tutti gli oli e i dati raccolti sono in fase di elaborazione. Le analisi preliminari hanno evidenziato tendenze significative nell'evoluzione dei VOCs e nei parametri di degradazione ossidativa, consentendo la costruzione di prime ipotesi sulle relazioni tra composizione iniziale dell'olio, stabilità ossidativa e caratteristiche sensoriali del prodotto fritto. I risultati sono sintetizzati in una tabella semaforica che rappresenta l'andamento dei diversi oli lungo il ciclo di frittura, sulla base dei diversi parametri analitici tenuti in considerazione; i colori indicano lo stato di ciascun parametro: verde (ottimale), giallo (intermedio), rosso (critico), con colori a metà nei casi *borderline* (**Tabella 2**). In generale, si osserva un incremento dell'acidità in tutti gli oli con il progredire dei giorni di frittura, ma rimangono comunque al di sotto dei corrispondenti limiti previsti per le tipologie di olio. Per quanto riguarda il PV, gli oli AO e G mostrano un incremento fino al T3, seguito da un decremento al T5, attribuibile alla conversione dei perossidi in composti secondari. Al contrario, gli oli OLIVA, EVO, ARA, e PALMA evidenziano un aumento progressivo del PV fino al T5, coerente con la fase di propagazione dell'ossidazione lipidica. Gli oli A, C e CAN presentano un andamento sinusoidale, tipico dell'ossidazione primaria, caratterizzato da fasi di aumento/accumulo di perossidi e fasi di decremento/degradazione. Infine, l'olio B si caratterizza per valori di PV significativamente inferiori rispetto agli altri oli. L'analisi dei VOCs mostra un accumulo progressivo di aldeidi che risulta predominante durante il processo di frittura, in tutti gli oli. Tra queste, i composti più abbondanti sono rappresentati dall'esanale e dalla nonanale, derivanti rispettivamente dall'ossidazione dell'acido oleico e dell'acido linoleico. L'olio B mostra concentrazioni significativamente inferiori dei suddetti marker ossidativi (esanale e nonanale) rispetto agli altri oli. Nell'olio G, al T5, si osserva un'elevata concentrazione di 2,4-decadienale, riconducibile all'alto contenuto di acido linoleico. La stabilità ossidativa, misurata tramite il tempo di induzione all'ossidazione (OSI time), risulta più elevata nell'olio A, seguita da EVO, ARA, PALMA, B, AO, C e OLIVA. Al contrario, gli oli SOIA, CAN e G mostrano i valori più bassi (<10 ore). Infine, per quanto riguarda i TPC, l'olio B presenta la percentuale più bassa al T5, indicando una minore degradazione complessiva. Gli oli C, SOIA e PALMA, invece, superano il limite del 25%, oltre il quale l'olio è da considerarsi esausto (Prot. n. 704/49.00/326, Ministero della Sanità, 1991. Complessivamente, le miscele A e B mostrano le migliori prestazioni, evidenziando un'elevata stabilità ossidativa durante l'intero ciclo di frittura.

Tabella 2. Andamento delle analisi chimiche degli oli durante la frittura

	FFA	PV	VOCs	OSI	TPM
G	●	●	●	●	●
AO	●	●	●	●	●
A	●	●	●	●	●
B	●	●	●	●	●
OLIVA	●	●	●	●	●
EVO	●	●	●	●	●
PALMA	●	●	●	●	●
ARA	●	●	●	●	●
C	●	●	●	●	●
SOIA	●	●	●	●	●
CAN	●	●	●	●	●

L'interpretazione integrata dei dati chimico-fisici e sensoriali rappresenta un elemento centrale di questo progetto, con l'obiettivo di comprendere come i cambiamenti nella composizione chimica degli oli durante la frittura si riflettano sulla percezione sensoriale dell'olio stesso e del prodotto fritto. In tal senso, l'analisi sensoriale ha avuto come obiettivo la definizione e valutazione del profilo sensoriale di oli da frittura e patatine stick fritte, adottando la metodologia dell'Analisi Descrittiva Quantitativa (QDA®). Il panel è stato composto da 10 assaggiatori/assaggiatrici selezionati/e in base a criteri di idoneità sensoriale. Nella fase preliminare è stata effettuata un'attività di definizione condivisa del vocabolario sensoriale, mediante sessioni di discussione guidata tra il capo panel e gli/le assaggiatori/assaggiatrici. Sono stati selezionati per la scheda sensoriale finale solo i descrittori con una frequenza di elicitazione superiore al 5%, al fine di garantire coerenza e rilevanza nella valutazione. Successivamente, attraverso sessioni dedicate, ai panelisti sono stati presentati specifici materiali di riferimento per il riconoscimento degli attributi, con lo scopo di allinearli in termini di capacità di identificazione degli attributi e valutazione delle relative intensità. Ogni giorno gli/le assaggiatori/assaggiatrici hanno valutato 4 campioni di olio da frittura e 4 patatine stick fritte negli stessi oli utilizzando le schede di profilo sviluppate *ad hoc*, una per la valutazione degli oli da frittura ed una per quella delle patatine stick fritte. I dati relativi all'intensità dei singoli attributi sono stati analizzati utilizzando il software Panel Check (Nofima Mat, former Matforsk and DTU - Informatics and Mathematical Modelling) al fine di verificare allineamento, capacità discriminante e ripetibilità del panel. Il panel ha dimostrato una significativa capacità discriminante ($p < 0,001$) tra i diversi campioni di olio per attributi quali colore, fritto fragrante, bruciato, pesce e rancido, mentre non è stata rilevata una capacità discriminante significativa per l'attributo limpidezza. Nel caso delle patatine stick, il panel ha discriminato con significatività elevata ($p < 0,001$) i campioni in funzione dell'olio utilizzato, per attributi quali colore, trasferimento di olio, fritto fragrante, pesce, rancido, croccantezza, untuosità, gommoso ($p < 0,01$) e dolce ($p < 0,05$). Non sono emerse differenze significative per gli attributi cottura al cuore, salato, amaro e acido/aspro. Inoltre, il panel si è dimostrato allineato per gli attributi valutati ($p > 0,05$) e ripetibile ($p > 0,5$), in grado di rilevare e quantificare variazioni sensoriali nei campioni analizzati in relazione alla composizione dell'olio ed al tempo di frittura.

Le analisi chimiche hanno permesso di monitorare con precisione i fenomeni di ossidazione primaria e secondaria identificando differenze significative tra le diverse matrici oleose impiegate. Parallelamente, l'analisi sensoriale ha confermato la presenza di variazioni sensoriali percepibili sia negli oli che nel prodotto fritto, in relazione alla composizione iniziale dell'olio ed alla sua evoluzione nel tempo. Le attività future del progetto includeranno il completamento delle analisi chimico-fisiche per tutti i cicli di frittura previsti, la valutazione delle preferenze di consumatori/consumatrici ed un'analisi statistica multivariata dei dati raccolti al fine di evidenziare eventuali correlazioni tra i dati chimico-fisici e sensoriali, nell'ottica di fornire strumenti applicabili nel contesto industriale per il monitoraggio e la selezione degli oli da frittura.

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

Poster

Mercatante D, Salvatori G, Troisi C, Del Zozzo M, Albano I, Rodriguez-Estrada MT (2024) Does accelerated storage and cooking impact on the hydrolytic and oxidative stability of an innovative pasta formulated with *Acheta domesticus* flour? Book of Abstracts del “22nd World Congress of Food Science and Technology”, Rimini, (Italia), 8-12 Settembre, 2024, 129.

Troisi C, Mercatante D, Scozzoli M, Montanelli N, Rodriguez-Estrada MT (2024) *Rosmarinus officinalis* essential oil as a natural antioxidant in feeding oil: effect on oxidative stability compared to synthetic antioxidants. Book of Abstracts del “5th International Symposium on Lipid Oxidation and Antioxidants”, Bologna (Italia), 8-10 Luglio 2024, 105.

Parro L, García-Salgado I, Troisi C, Vichi S, Barroeta AC, Guardiola F, Tres A (2024) Evaluating the impact of palm kernel fatty acid distillates in broiler feed formulation on meat composition and oxidation. Book of Abstracts del “AOCS Annual Meeting & Expo”, Montréal, Québec, (Canada), 28 Aprile – 1 Maggio, 2024, 112.

DOTTORANDI ISCRITTI AL III ANNO (XXXVIII CICLO)

Valorisation of alternative protein sources by tailored biotechnological processes and non-thermal technologies to obtain new ingredients to be used in the formulation of innovative foods

Solidea Amadei (email: solidea.amadei2@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: XXXVIII; Anno di frequenza: III

Tutor: Rosalba Lanciotti; Co-tutor: Francesca Patrignani, Davide Gottardi

1. Stato dell'arte

L'incremento della popolazione mondiale e la crescente necessità di garantire la sicurezza alimentare stanno determinando un'intensificazione degli sforzi nella ricerca di fonti proteiche alternative e sostenibili. Secondo le previsioni della FAO (2021), la produzione di proteine di origine animale tenderà a stabilizzarsi nei prossimi anni, mentre la domanda globale continuerà ad aumentare a causa dell'espansione demografica. In questo contesto, si assiste a un interesse crescente da parte della comunità scientifica e dell'industria alimentare verso l'impiego di fonti proteiche non convenzionali, quali legumi, cereali e sottoprodotti vegetali (Molfetta *et al.*, 2022). Queste matrici possono essere valorizzate mediante approcci biotecnologici e chimico-fisici innovativi, alternativi al trattamento termico. I processi biotecnologici si avvalgono dell'azione dei microrganismi considerati sicuri e per i quali l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha riconosciuto la qualificata presunzione di sicurezza (QPS), mentre i trattamenti non termici, come l'omogeneizzazione ad alta pressione (HPH) e i campi elettrici pulsati (PEF), permettono di modificare le proprietà funzionali e tecnologiche della matrice, migliorando la disponibilità dei nutrienti e l'applicabilità a livello industriale. Numerosi studi hanno evidenziato il potenziale dei microrganismi, ed in particolare dei batteri lattici nel fermentare un'ampia varietà di matrici (cereali, legumi, sottoprodotti vegetali), incrementando il contenuto in peptidi bioattivi e migliorando il valore nutrizionale complessivo del prodotto (Martí-Quijal *et al.*, 2021). Parallelamente, l'uso di lieviti non convenzionali, quali *Yarrowia lipolytica* e *Debaryomyces hansenii*, è stato esplorato per la valorizzazione di substrati eterogenei, inclusi scarti agroindustriali e farine proteiche di varia origine (Gottardi *et al.*, 2021; Patrignani *et al.*, 2020). Tali approcci biotecnologici consentono la produzione di ingredienti proteici con profili amminoacidici migliorati, maggiore digeribilità e funzionalità tecnologica avanzata. Alcuni prodotti ottenuti da fermentazioni controllate di matrici vegetali o sottoprodotti agroalimentari sono stati recentemente riconosciuti come *novel food* dall'EFSA, rendendoli idonei all'impiego in formulazioni alimentari innovative, contribuendo così agli obiettivi di sostenibilità ambientale ed economia circolare.

2. Bibliografia

FAO (2021) Meat. OECD-FAO Agricultural Outlook 2021–2030, pp. 163-177.

Gottardi D, Siroli L, Vannini L, Patrignani F, Lanciotti R (2021) Recovery and valorization of agri-food wastes and by-products using the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*, *Trend Food Sci.* 115: 74-86.

Martí-Quijal FJ, Khubber S, Remize F, Tomasevic I, Roselló-Soto E, Barba FJ (2021) Obtaining antioxidants and natural preservatives from food by-products through fermentation: A review, *Fermentation* 7(3): 106.

Molfetta M, Morais EG, Barreira L, Bruno GL, Porcelli F, Dugat-Bony E, Minervini F (2022) Protein sources alternative to meat: State of the art and involvement of fermentation, *Foods* 11(14): 2065.

Patrignani F, Parrotta L, Del Duca S, Vannini L, Camprini L, Dalla Rosa M, Lanciotti R (2020). Potential of *Yarrowia lipolytica* and *Debaryomyces hansenii* strains to produce high quality food ingredients based on cricket powder, *LWT* 119: 108866.

3. Sviluppo della ricerca

La ricerca è stata sviluppata secondo i seguenti punti principali:

- 1) Identificazione e caratterizzazione delle principali fonti proteiche alternative e diversi microrganismi sicuri di interesse alimentare.
- 2) Determinazione delle condizioni ottimali di crescita dei ceppi selezionati nella matrice di interesse e produzione di ingredienti innovativi.
- 3) Valutazione delle caratteristiche nutrizionali, funzionali, organolettiche, di stabilità e sicurezza degli ingredienti ottenuti.
- 4) Formulazione di un prodotto alimentare innovativo includendo gli ingredienti selezionati e caratterizzazione dell'alimento relativamente ad aspetti di sicurezza microbiologica, funzionalità, qualità e valore nutrizionale.

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) Ricerca bibliografica inerente all'argomento																			
1) Identificazione delle fonti proteiche alternative																			
2) Identificazione di microrganismi sicuri e con QPS																			
A2) Caratterizzazione dei ceppi ed ottimizzazione delle performance microbiche																			
1) Valutazione delle caratteristiche tecnologiche, funzionali e di sicurezza dei ceppi microbici individuati, selezione di ceppi microbici ed ottimizzazione delle performance fermentative e tecnologiche																			
A3) Caratterizzazione delle matrici di interesse																			
1) Valutazione delle caratteristiche microbiologiche, nutrizionali e di sicurezza delle principali fonti proteiche alternative selezionate																			
A4) Ottenimento e caratterizzazione degli ingredienti																			
1) Allestimento di processi biotecnologici ed ottimizzazione delle condizioni di processo (tempo, T, livello di inoculo)																			
2) Valutazione delle caratteristiche nutrizionali, di stabilità e sicurezza degli ingredienti ottenuti																			
3) Inquadramento normativo																			
A5) Sviluppo di prodotti tradizionali o innovativi																			
1) Formulazione di alimenti tradizionali/innovativi includenti gli ingredienti precedentemente selezionati																			
2) Caratterizzazione sugli aspetti di sicurezza, shelf-life microbiologica, qualità, valore nutrizionale e funzionalità																			
A6) Preparazione della tesi e di articoli																			

4. Principali risultati

Il presente progetto di ricerca è finalizzato allo sviluppo di ingredienti innovativi ottenuti da fonti proteiche alternative di origine vegetale come i legumi, tramite processi biotecnologici, basati sull'utilizzo di microrganismi sicuri e riconosciuti da EFSA come QPS. Tali ingredienti sono stati caratterizzati ed utilizzati in formulazione di alimenti innovativi per migliorare il valore nutrizionale e le proprietà funzionali del prodotto finale.

A seguito di ricerca bibliografica, è stata selezionata la farina di ceci come matrice proteica interessante, in quanto questa presenta molteplici caratteristiche positive sia da un punto di vista nutrizionale e tecnologico che per la sua ampia diffusione e sostenibilità. Per la valorizzazione di tale matrice sono stati selezionati alcuni ceppi microbici sicuri e con status di QPS, caratterizzati in precedenza per le loro proprietà funzionali e tecnologiche e scientificamente noti per le loro capacità proteolitiche e lipolitiche.

Dopo aver testato singolarmente la capacità di sviluppo di tali ceppi sulla matrice e aver caratterizzato gli ingredienti ottenuti, sono stati allestiti processi biotecnologici ottimizzati. In particolare, sono stati selezionati i ceppi più promettenti di batteri lattici, tra cui *Lactiplantibacillus plantarum* LP23, *Lactiplantibacillus paracasei* L e *Latilactobacillus sakei* M12A, e di lieviti, tra cui *Yarrowia lipolytica* Y3 e *Debaryomyces hansenii* Y15A. I ceppi selezionati sono stati inoculati sia singolarmente che in combinazione (batterio lattico e lievito) nella farina di ceci idratata, con l'obiettivo di ottenere ingredienti dotati di buone caratteristiche tecnologiche, nutrizionali e funzionali da utilizzare nella formulazione di prodotti alimentari innovativi, sicuri e di elevata qualità sensoriale. Sulla base dei risultati ottenuti dalle prove sperimentali precedenti, le condizioni del processo biotecnologico sono state ottimizzate in termini di tempo e temperatura di fermentazione, e carico iniziale dei ceppi selezionati.

I campioni ottenuti a seguito dell'incubazione sono stati caratterizzati per quanto riguarda gli aspetti compositivi (proteine, peptidi, amminoacidi, amido, zuccheri e composti anti-nutrizionali), funzionali (attività antiossidante e contenuto in fenoli totali), organolettici (profilo in composti volatili e accettabilità da parte del consumatore) e di stabilità e sicurezza (pH e presenza di patogeni).

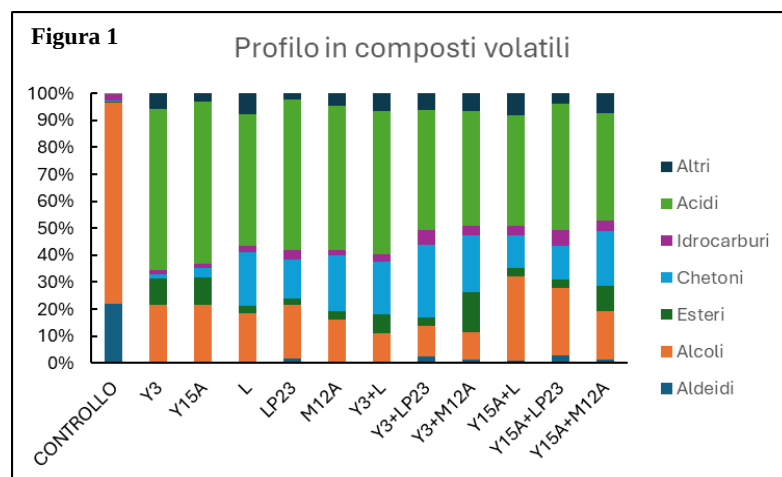
I principali risultati hanno evidenziato come la farina di ceci sia una matrice favorevole per lo sviluppo microbico; infatti, tutti i microrganismi, sia inoculati singolarmente che in combinazione, sono stati in grado di crescere nelle condizioni scelte, determinando un significativo abbassamento del pH, che ha inibito lo sviluppo di *Enterobacteriaceae*. Inoltre, in alcuni campioni fermentati è stato osservato un incremento significativo del contenuto in peptidi rispetto al controllo non fermentato. Ciò dimostra la capacità dei ceppi selezionati di degradare le proteine, e, conseguentemente, una maggior digeribilità e biodisponibilità, nonché una potenziale bioattività degli ingredienti ottenuti.

Come riportato in tabella, il profilo in amminoacidi liberi cambia a seguito del periodo di incubazione, determinando un aumento significativo del contenuto in alcuni amminoacidi essenziali quali leucina, isoleucina, valina, lisina, fenilalanina e metionina. Inoltre, a seguito dei processi biotecnologici adottati si assiste ad un incremento del contenuto di citrullina che ha un ben noto e potente effetto nella vasodilatazione e contribuisce al recupero della stanchezza post esercizio fisico, e di quello del GABA (acido gamma amino butirrico) che ha effetto rilassante sul sistema nervoso centrale.

	CONTROLLO	Y3	Y15A	L	LP23	M12A	Y3+L	Y3+LP23	Y3+M12A	Y15A+L	Y15A+LP23	Y15A+M12A
Asp	0.4 ± 0.0 ⁱ	2.2 ± 0.2 ^{g,h}	8.0 ± 0.2 ^a	3.7 ± 0.2 ^{d,e}	3.9 ± 0.2 ^d	6.5 ± 0.2 ^b	3.2 ± 0.1 ^{e,f}	2.1 ± 0.1 ^h	4.9 ± 0.2 ^c	3.4 ± 0.1 ^{d,e}	2.7 ± 0.1 ^{f,g}	6.9 ± 0.3 ^b
Thr	0.9 ± 0.0 ^h	4.4 ± 0.1 ^b	7.6 ± 0.1 ^a	3.2 ± 0.1 ^c	3.0 ± 0.0 ^{c,d}	1.7 ± 0.0 ^f	2.8 ± 0.0 ^d	2.2 ± 0.0 ^e	1.2 ± 0.0 ^g	2.4 ± 0.1 ^e	1.9 ± 0.1 ^f	1.4 ± 0.1 ^g
Ser	1.0 ± 0.0 ^c	1.3 ± 0.1 ^b	3.2 ± 0.0 ^a	1.3 ± 0.1 ^b	0.3 ± 0.1 ^f	0.8 ± 0.0 ^d	1.2 ± 0.0 ^b	0.4 ± 0.0 ^f	0.6 ± 0.0 ^e	0.8 ± 0.0 ^d	0.3 ± 0.1 ^f	0.7 ± 0.0 ^{d,e}
Asn	2.2 ± 0.1 ^h	2.3 ± 0.0 ^{g,h}	5.9 ± 0.1 ^a	3.8 ± 0.1 ^d	4.9 ± 0.1 ^b	2.6 ± 0.1 ^{f,g}	3.1 ± 0.2 ^e	4.4 ± 0.2 ^c	1.6 ± 0.1 ⁱ	2.8 ± 0.1 ^{e,f}	4.4 ± 0.1 ^c	2.4 ± 0.1 ^{g,h}
Glu	10.0 ± 0.4 ^b	1.4 ± 0.1 ^f	3.9 ± 0.1 ^d	2.4 ± 0.2 ^e	10.4 ± 0.5 ^b	2.4 ± 0.2 ^e	2.4 ± 0.1 ^e	4.1 ± 0.2 ^d	3.9 ± 0.2 ^d	5.6 ± 0.2 ^c	12.5 ± 0.7 ^a	5.4 ± 0.4 ^c
Gln	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^e	1.5 ± 0.1 ^a	0.4 ± 0.1 ^d	0.3 ± 0.0 ^d	0.7 ± 0.0 ^c	0.7 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^e	0.9 ± 0.1 ^b
Gly	1.5 ± 0.1 ^h	4.4 ± 0.2 ^b	5.8 ± 0.1 ^a	3.7 ± 0.2 ^{c,d}	3.1 ± 0.1 ^{e,f}	4.6 ± 0.2 ^b	2.7 ± 0.1 ^{e,f,g}	2.4 ± 0.1 ^g	3.2 ± 0.2 ^{d,e}	3.0 ± 0.1 ^{e,f}	2.6 ± 0.2 ^{f,g}	4.2 ± 0.3 ^{b,c}
Ala	0.3 ± 0.0 ^h	8.9 ± 0.3 ^a	7.1 ± 0.1 ^b	2.9 ± 0.1 ^e	1.3 ± 0.0 ^g	5.1 ± 0.2 ^c	2.6 ± 0.1 ^e	2.0 ± 0.1 ^f	3.6 ± 0.2 ^d	2.6 ± 0.1 ^e	1.4 ± 0.1 ^g	3.9 ± 0.3 ^d
Cit	0.1 ± 0.1 ⁱ	6.1 ± 0.2 ^a	4.3 ± 0.2 ^{d,e,f}	5.1 ± 0.3 ^b	4.4 ± 0.3 ^{c,d,e}	4.1 ± 0.2 ^{e,f}	3.7 ± 0.1 ^f	2.1 ± 0.1 ^g	4.9 ± 0.3 ^{b,c,d}	5.0 ± 0.2 ^{b,c}	1.0 ± 0.1 ^h	3.9 ± 0.3 ^{e,f}
Val	0.6 ± 0.1 ^h	5.1 ± 0.3 ^b	7.6 ± 0.1 ^a	2.4 ± 0.1 ^e	2.3 ± 0.1 ^{e,f}	4.9 ± 0.1 ^b	1.9 ± 0.0 ^{f,g}	1.7 ± 0.1 ^g	3.1 ± 0.1 ^{b,c,d}	1.6 ± 0.1 ^{b,c}	1.6 ± 0.1 ^h	4.3 ± 0.3 ^{e,f}
Met	0.4 ± 0.0 ^g	2.5 ± 0.1 ^c	3.4 ± 0.1 ^a	1.7 ± 0.1 ^e	1.7 ± 0.1 ^e	3.0 ± 0.2 ^b	1.3 ± 0.0 ^f	1.3 ± 0.0 ^f	2.1 ± 0.1 ^d	1.2 ± 0.1 ^f	1.3 ± 0.1 ^f	2.9 ± 0.3 ^b
Ile	0.6 ± 0.0 ^f	3.9 ± 0.2 ^b	5.6 ± 0.2 ^a	1.6 ± 0.2 ^e	2.1 ± 0.2 ^d	4.3 ± 0.2 ^b	1.7 ± 0.1 ^{d,e}	1.5 ± 0.1 ^e	2.9 ± 0.1 ^c	1.3 ± 0.1 ^e	1.5 ± 0.1 ^e	4.0 ± 0.3 ^b
Leu	1.3 ± 0.0 ^h	10.5 ± 0.4 ^c	13.9 ± 0.4 ^a	7.1 ± 0.5 ^{d,e}	8.1 ± 0.4 ^d	12.2 ± 0.1 ^b	5.3 ± 0.4 ^{f,g}	6.4 ± 0.3 ^{e,f}	8.2 ± 0.2 ^d	4.7 ± 0.2 ^g	7.0 ± 0.4 ^{d,e}	11.7 ± 0.9 ^{b,c}
Tyr	0.8 ± 0.1 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.6 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.6 ± 0.0 ^c	0.7 ± 0.1 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	1.3 ± 0.1 ^b	1.6 ± 0.2 ^a
Phe	1.0 ± 0.1 ^f	7.0 ± 0.3 ^a	7.8 ± 0.2 ^{a,b}	4.2 ± 0.2 ^{d,e}	4.4 ± 0.2 ^d	7.7 ± 0.4 ^{a,b}	3.4 ± 0.2 ^e	4.1 ± 0.2 ^{d,e}	5.7 ± 0.2 ^c	3.4 ± 0.2 ^e	4.4 ± 0.2 ^d	8.0 ± 0.7 ^a
Gaba	4.3 ± 0.3 ^f	29.1 ± 1.5 ^a	29.4 ± 1.4 ^a	22.5 ± 1.5 ^b	13.7 ± 0.8 ^{d,e}	26.5 ± 1.4 ^a	17.5 ± 1.0 ^c	16.9 ± 1.0 ^{c,d}	18.6 ± 0.8 ^c	18.7 ± 0.8 ^c	12.2 ± 0.7 ^e	23.0 ± 1.7 ^b
Orn	0.2 ± 0.0 ^g	6.0 ± 0.2 ^d	20.6 ± 0.6 ^a	17.9 ± 0.9 ^b	9.6 ± 0.4 ^c	21.2 ± 0.9 ^a	16.4 ± 1.0 ^b	3.2 ± 1.0 ^{e,f}	11.0 ± 0.4 ^c	6.8 ± 0.3 ^d	1.6 ± 0.1 ^{f,g}	3.8 ± 0.3 ^e
Lys	2.3 ± 0.2 ^f	2.6 ± 0.1 ^f	5.9 ± 0.2 ^a	0.3 ± 0.0 ^h	5.1 ± 0.2 ^b	3.3 ± 0.2 ^{d,e}	1.7 ± 0.0 ^g	1.8 ± 0.0 ^g	3.7 ± 0.2 ^{c,d}	0.6 ± 0.0 ^h	3.9 ± 0.2 ^c	3.1 ± 0.3 ^e
His	1.1 ± 0.0 ^e	0.4 ± 0.0 ^f	2.4 ± 0.1 ^b	1.9 ± 0.0 ^c	2.0 ± 0.1 ^c	1.1 ± 0.0 ^e	1.0 ± 0.0 ^e	1.6 ± 0.0 ^d	2.4 ± 0.1 ^b	2.4 ± 0.1 ^b	1.9 ± 0.1 ^c	2.7 ± 0.2 ^a
Arg	35.3 ± 1.4 ^a	0.4 ± 0.1 ^f	0.5 ± 0.1 ^f	2.5 ± 0.0 ^f	20.6 ± 1.0 ^c	7.7 ± 0.5 ^e	0.7 ± 0.0 ^f	21.7 ± 0.0 ^c	9.4 ± 0.5 ^e	16.1 ± 0.7 ^d	36.3 ± 1.9 ^a	30.0 ± 2.6 ^b
Pro	2.8 ± 0.1 ^e	3.0 ± 0.1 ^e	8.0 ± 0.2 ^a	5.6 ± 0.4 ^b	5.5 ± 0.1 ^b	5.7 ± 0.1 ^b	4.4 ± 0.3 ^{c,d}	4.3 ± 0.3 ^d	4.3 ± 0.1 ^d	5.3 ± 0.7 ^{b,c}	4.4 ± 0.3 ^{c,d}	6.2 ± 0.4 ^b

Per quanto concerne la frazione glucidica, nei campioni inoculati è stata osservata una lieve riduzione del contenuto di amido danneggiato rispetto al controllo. La frazione di amido prevalentemente presente è risultata quella a lenta digeribilità, la quale potrebbe contribuire a modulare positivamente la risposta glicemica post-prandiale. Inoltre, il processo biotecnologico ha determinato una significativa riduzione del contenuto in glucosio, saccarosio e oligosaccaridi della famiglia del raffinoso, generalmente non desiderati in quanto causa di gonfiore e flatulenza durante la digestione.

Da un punto di vista funzionale è stata valutata l'attività antiossidante sia tramite il saggio ABTS che tramite quello DPPH. I risultati hanno evidenziato l'incremento dell'attività antiossidante nei campioni inoculati con i ceppi selezionati rispetto al controllo, in linea con i risultati relativi al contenuto in fenoli totali testato mediante il saggio di Folin-Ciocalteu.



Il profilo in composti volatili è stato modificato in maniera differente in funzione dei ceppi microbici utilizzati (Figura 1). Rispetto al controllo, in tutti i campioni inoculati è stata osservata una diminuzione dell'abbondanza di aldeidi e alcoli e un aumento di acidi, chetoni ed esteri. In particolare, la quantità dell'esanale, aldeide associata all'aroma di fagiolo e grasso, si è ridotta, così come quella dell'1-esanolo, alcol che apporta un caratteristico sentore di legume. D'altra parte, alcuni composti volatili sono risultati più abbondanti nei campioni inoculati con i ceppi selezionati, per esempio gli esteri, tra cui l'etil-acetato che apporta un aroma di fruttato, gli acidi, prodotti principali del metabolismo dei

batteri lattici, che conferiscono sentori di lattico, e i chetoni, come l'acetoino, che danno note burrose.

La combinazione di diversi ceppi microbici ha permesso di ottenere profili aromatici molto vari e complessi, che ricordano in alcuni casi prodotti derivati dal latte e in altri prodotti da forno. In generale a seguito del processo biotecnologico adottato è stato osservato un sensibile miglioramento del profilo aromatico rispetto alla farina di ceci tal quale.

Sulla base dei parametri di sicurezza, ossia assenza di *Escherichia coli* STEC, e dei risultati ottenuti dalla caratterizzazione chimico-fisica, funzionale e organolettica, sono stati selezionati i migliori ingredienti e sono stati utilizzati per la formulazione di un prodotto innovativo. Nel dettaglio, è stata selezionata la farina di ceci inoculata singolarmente con *L. plantarum* LP23 e la farina di ceci inoculata con il consorzio costituito da *L. plantarum* LP23 e *D. hansenii* Y15A, e un controllo non fermentato è stato considerato come riferimento.

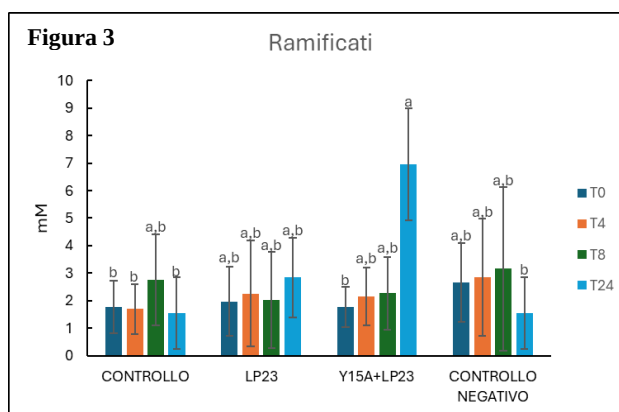
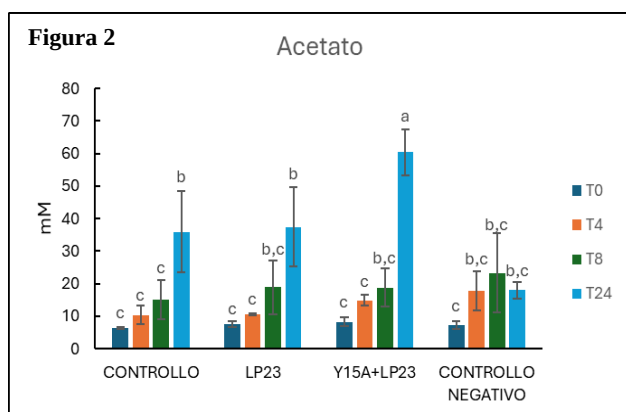
Con tali ingredienti è stata formulata pasta fresca costituita dall'ingrediente selezionato (30%), farina di grano tipo 0, acqua minerale, olio EVO e sale. L'impasto è stato omogeneizzato, lasciato riposare e tirato con una macchina per la pasta fino ad uno spessore di circa 0.6 mm. Dopodiché, la sfoglia è stata tagliata a strisce (tagliatelle), lasciata riposare per qualche minuto e sottoposta a cottura in acqua salata. La microflora presente nell'impasto è stata determinata tramite campionamento microbiologico, ed è stato analizzato il profilo in composti volatili sia nella pasta cruda che cotta. Dal punto di vista tecnologico sono state evidenziate differenze tra i tre impasti: in particolare, il colore della pasta cruda ottenuta con gli ingredienti fermentati risultava più chiaro e meno tendente al giallo rispetto a quello della pasta cruda ottenuta con la farina di ceci non fermentata. Inoltre, il valore di pH della pasta ottenuta con ingredienti fermentati era mediamente più basso (4.1) rispetto a quello della pasta ottenuta con ingrediente non fermentato (6.3);

mentre il valore di attività dell'acqua non è variato significativamente (circa 0.98), nonostante siano state notate differenti capacità di assorbire l'acqua durante l'impastamento dei campioni.

Parallelamente è stata effettuata la digestione in vitro degli ingredienti selezionati e del formulato cotto seguendo il protocollo Infogest, e analizzata la frazione disponibile, per determinare la biodisponibilità sia dell'amido che delle proteine. Per quanto concerne gli ingredienti, risultati preliminari hanno mostrato differenze tra i campioni: il controllo e il campione inoculato con *L. plantarum* LP23 risultano più velocemente digeribili, mentre il campione inoculato con il consorzio microbico risulta digeribile più lentamente. Oltre a ciò, sono state osservate differenze nella biodisponibilità delle proteine tra i diversi campioni a seguito della digestione in vitro.

Inoltre, gli ingredienti selezionati e digeriti e la pasta cotta digerita sono stati sottoposti alla fermentazione colonica in vitro al fine di valutare l'impatto sul microbiota intestinale e il loro ruolo nella salute e metabolismo di ospiti sani. Nel dettaglio, i campioni sono stati fermentati in un sistema di coltura batch a pH controllato, e aliquote sono state prelevate a diversi tempi (0, 4, 8 e 24 ore) per analizzare le variazioni nel microbiota intestinale e la presenza di metaboliti di interesse (acidi grassi a corta catena e amminoacidi).

Risultati preliminari relativi alla fermentazione colonica degli ingredienti selezionati, hanno mostrato un aumento della concentrazione dell'acetato nel tempo, principalmente nel campione inoculato con il consorzio microbico, suggerendo lo sviluppo di Bifidobatteri e Lactobacilli che favoriscono l'integrità della barriera intestinale (Figura 2). D'altro lato, l'incremento della concentrazione di butirato e propionato durante il periodo di fermentazione non è stato significativo. Un lieve incremento degli acidi grassi a catena ramificata è stato osservato, in particolare, nel campione inoculato con il consorzio microbico (Figura 3). Tale aumento può essere attribuito all'attività fermentativa del microbiota intestinale, che ha comportato la degradazione delle proteine e il conseguente rilascio di amminoacidi, successivamente utilizzati come substrati per la sintesi di tali acidi grassi. Questo comportamento metabolico può essere ricondotto alla limitata disponibilità di zuccheri nella matrice di partenza (farina di ceci), la quale si riduce ulteriormente a seguito della fermentazione ad opera dei microrganismi selezionati, che consumano glucosio, saccarosio e oligosaccaridi della famiglia del raffinoso.



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

Atti di convegno - poster:

Amadei S (2024) Valorisation of alternative protein sources by biotechnological processes and non-thermal technologies to obtain new ingredients to be used in the formulation of innovative foods, in: XXVIII Workshop on the developments in the Italian PhD research on food science technology and biotechnology, Catania, Italy.

Amadei S, Gottardi D, Rossi S, Braschi G, Siroli L, Lanciotti R, Patrignani (2024) Biotechnological valorization of chickpea flour for the production of value-added ingredients for innovative food formulations, in: FoodOmics 2024: fifteen years on from. Where are we now, what's next, Cesena, Italy.

Rossi S, Amadei S, Gottardi D, Braschi G, Lanciotti R, Patrignani (2023) Biotechnological valorisation of chickpea flour for the production of innovative added value ingredients for food formulation, in: 7th International Conference on Microbial Diversity 2023 - Agrifood microbiota as a tool for a sustainable future, Parma, Italy.

Amadei S (2023) Valorisation of alternative protein sources by biotechnological processes and non-thermal technologies to obtain new ingredients to be used in the formulation of innovative foods, in: XXVII Workshop on the developments in the Italian PhD research on food science technology and biotechnology, Portici, Napoli, Italy.

Presentazioni orali:

Amadei S (2024) Biotechnological valorization of chickpea flour to produce value-added ingredients for innovative food formulations, in: IuFost 2024 22nd World Congress of Food Science and Technology. The future of food is now: Development, Functionality & Sustainability, Rimini, Italy.

Use of non-thermal treatments to improve the quality, safety, and shelf-life of fresh sausages

Chiara Angelucci (email: chiara.angelucci3@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: XXXVIII; Anno di frequenza: III

Tutor: Prof. Massimiliano Petracci; Co-tutor: Giulia Tabanelli, Rudy Magnani, Francesca Soglia

1. State-of-the-Art

Fresh sausages are highly perishable due to their relatively high pH (not below 5.5) and water activity (a_w) of 0.97 or more. Since they do not undergo a fermentation process during production, the sanitary quality of the raw meat becomes the key factor in ensuring good product quality. Various factors can affect the quality and, therefore, the shelf-life of fresh sausages. Spoilage involves complex mechanisms that may not only cause financial losses but also pose health risks. This deterioration often leads to noticeable changes in the product's appearance, smell, flavor, and texture, making it unappealing and unacceptable to consumers (Zhou *et al.*, 2010).

In this context, my PhD research investigates non-thermal treatment methods to improve safety and extend the shelf-life of sausages. Among non-thermal technologies, High Hydrostatic Pressure (HHP) is one of the most promising. HHP is a non-thermal food processing technology that applies pressures between 200 and 700 MPa using a non-compressible fluid, typically water at temperatures below 100°C. This rapid method enhances food safety and shelf life by effectively inactivating a wide range of spoilage and pathogenic microorganisms, including bacteria like *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. Importantly, HHP has a minimal impact on the sensory and nutritional qualities of food.

2. References

- Aganovic K, Hertel C, Vogel RF, John R, Schlüter O, Schwarzenbolz U, Jäger H, Holzhauser T, Bergmair J, Roth A, Sevenich R, Bandick N, Kulling SE, Knorr D, Engel KH, Heinz V (2021) Aspects of high hydrostatic pressure food processing: Perspectives on technology and food safety, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 20: 3225-3266.
- Angelucci C, Barbieri F, Soglia F, Petracci M, Montanari C, Gardini G, Gardini F, Tabanelli G. (2024) Changes in the microbiota and colour of pork meat batter during refrigerated storage in relation to the application of High Hydrostatic Pressure, *Food Biosci.* 62: 105419.
- Bover-Cid S, Belletti N, Aymerich T, Garriga M (2015) Modeling the protective effect of a_w and fat content on the high-pressure resistance of *Listeria monocytogenes* in dry-cured ham, *Food. Res. Int.* 75: 194-199.
- Bozoglu F, Alpas H, Kaletunç G (2004) Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 40(3): 243-247.
- Chun JY, Min SG, Hong GP (2014) Effects of high-pressure treatments on the redox state of porcine myoglobin and color stability of pork during cold storage, *Food Bioproc. Tech.* 7: 588-597.
- Olsen K, Bolumar T, Rode TM, Orlén V (2023) Effects of high-pressure processing on enzyme activity in meat, fish, and egg. In de Castro Leite Júnior BR, Lima Tribst AA (Eds), *Effect of High-Pressure Technologies on Enzymes*, Academic Press: Elsevier, pp 241-267.
- Torres JA, Velazquez G (2005) Commercial opportunities and research challenges in the high-pressure processing of foods, *J. Food Eng.* 67(1-2): 95-112.
- Zhou GH, Xu XL, Liu Y (2010) Preservation technologies for fresh meat: A review, *Meat Sci.* 86(1): 119-128.

3. Objectives

The present research project aims to evaluate the impact of the application of non-thermal treatments on the safety, quality, and *shelf-life* of products of animal origin, in particular fresh sausages, and dairy products.

The PhD thesis project can be divided into the following activities, summarized in the Gantt chart shown in Table 1:

- A1) Bibliographic research of non-thermal treatments on characteristics of foods of animal origin
- A2) HHP application on fresh sausages to evaluate its impact on meat color, texture, and microbial growth.
- A3) Use of bioprotective cultures to increase the safety and quality of product of animal origin. Some bioprotective lactic acid bacteria strains will be tested for their antimicrobial activity *in vitro* and in animal food models. In addition, the cell free supernatants and/or purified antimicrobial peptides will be studied in the same matrices.
- A4) Use of bioprotective cultures in fresh sausages to evaluate their impact on color, lipid oxidation and microbial growth
- A5) Writing and publication of the doctoral thesis, posters, scientific papers, and oral presentations.

Table 1. Gantt diagram for this Ph.D. thesis project

Activity	Months	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
A1) State of the art																			
A2) HHP application on fresh sausages																			
1) Colour measurement by colorimeter																			
2) Texture Profile Analysis test																			
3) Microbiological analysis and evaluation of shelf-life																			
A3) Study of bioprotective coltures																			
1) Cultures antimicrobial activity in vitro																			
2) Cell free supernatants and/or purified antimicrobial peptides antimicrobial activity																			
3) Food model trials																			
A4) Use of bioprotective coltures on fresh sausages																			
1) Bibliographical research																			
2) Colour measurement by colorimeter																			
3) Evaluation of lipid oxidation (TBARS)																			
4) Microbiological analysis and evaluation of shelf-life																			
A5) Preparation of manuscripts, presentations, and thesis																			

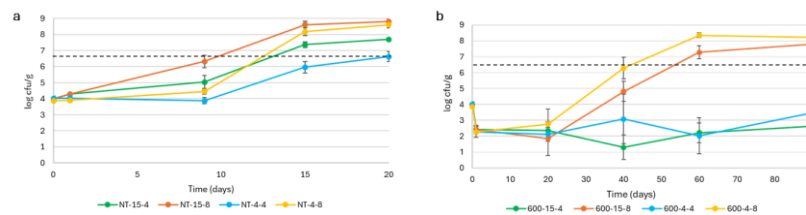
4. Research progress and main results

In the first year of the project, preliminary studies were carried out to evaluate the impact of HHP on the shelf-life and quality of fresh sausages, using two pressure levels (300 MPa and 600 MPa, A2). The findings, recently published by Angelucci *et al.* (2024), demonstrated that HHP is an effective method for extending the shelf-life of fresh sausages. Specifically, while untreated products lasted around 2 weeks, HHP extended shelf-life to approximately 40 days at 300 MPa and up to 80 days at 600 MPa. This improvement is attributed not only to a significant reduction in the initial microbial load but also to the selective effects of HHP on different components of the microbial community, as revealed by metagenomic degradation models. Additionally, pH and nitrite levels were considered as variables influencing these effects. Nitrites, in particular, play a dual role: inhibiting spore-forming anaerobic pathogens like *Clostridium* species, and enhancing the product's color appeal to consumers. Overall, these initial findings suggest that HHP holds promise as a stabilization method for fresh sausages.

Based on results obtained during preliminary studies, a more comprehensive study was carried out in order to evaluate the impact of HHP processing on the quality and safety of industrially produced fresh sausages. An initial investigation examined the efficacy of HHP treatment in enhancing the microbiological stability of these products. The safety parameters associated with the application of HHP processing to fresh sausages were further investigated. Specifically, the study evaluates the impact of thermal abuse conditions occurring either prior to HHP treatment or during the subsequent storage period on product safety. In a subsequent phase, a microbiological challenge test was performed to assess the inactivation potential and the possible post-treatment proliferation of three pathogenic microorganisms: *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria innocua* (used as a surrogate of *Listeria monocytogenes*). Sausages were subjected to HHP at 600 MPa for 5 minutes. Additionally, the study examined the influence of HHP processing on the physicochemical properties of the sausages, particularly colour and texture, throughout refrigerated storage at 4°C.

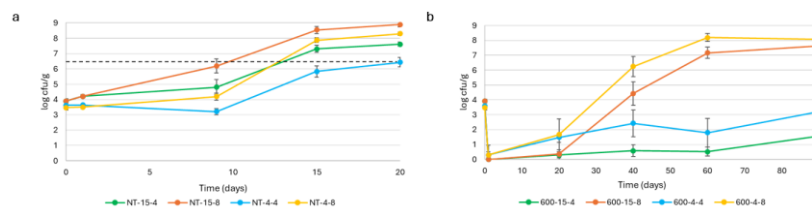
The presented study assessed microbial load and shelf-life of HHP treated (600) or non-treated (NT) sausages under two distinct thermal abuse scenarios. The first scenario involved exposure of the products immediately after production to 15°C for 24 hours, simulating the interval between sausage production and the application of HHP treatment. The second scenario represented improper storage conditions during distribution: a subset of the samples was maintained at 4°C (NT-15-4, NT-4-4, 600-15-4, 600-4-4), whereas another subset was stored at 8°C to simulate a second thermal abuse event during storage and distribution (NT-15-8, NT-4-8, 600-15-8, 600-4-8). Shelf-life duration was 20 days for untreated control samples and extended to 90 days for HHP-treated samples.

Figure 1: microbial counts of not-treated and treated products: Total Mesophilic Counts (a: not-treated; b: samples treated with HHP at 600 MPa for 5 min).



The results of microbial counts relative to total mesophilic bacteria are reported in Figure 1. In not-treated samples (Figure 1a), initial microbial counts were approximately 4 log CFU/g. A mild increase was observed following pre-treatment thermal abuse at 15°C for 24 hours. However, the most pronounced microbial growth was associated with the higher storage temperatures (8°C). The spoilage threshold was fixed at 6.5 log CFU/g, adopted based on literature as indicative of the end of shelf-life. Samples exposed to both types of thermal stress (NT-15-8) reached this threshold within 10 days, while NT-4-8 at 12.5 days. Final counts in both exceeded 8.5 log CFU/g after 20 days. Among samples stored at 4°C, NT-15-4 reached the spoilage limit by day 13, while NT-4-4 remained below the threshold until day 20. In contrast, HHP-treated sausages (Figure 1b) exhibited an immediate reduction in microbial counts, regardless of prior exposure to thermal abuse. Sausages stored at 4°C post-HHP showed stable microbial levels below initial contamination for the entire 90-day period, indicating microbial stability. However, those stored at 8°C demonstrated gradual microbial growth, reaching the 6.5 log CFU/g threshold at approximately 43 days (600-4-8) and 53 days (600-15-8), with final counts approaching 8 log CFU/g at the end of storage.

Figure 2: microbial counts of not-treated and treated products: Lactic Acid Bacteria (a: not-treated; b: samples treated with HHP at 600 MPa for 5 min).



LAB counts presented similar behaviour if compared with mesophilic bacteria. In the not treated sausages, the initial LAB concentration ranged between 3.6 and 3.8 log CFU/g (Figure 2a). The thermal abuse at 15°C for the first 24 h (samples NT-15-4 and NT-15-8) caused an increase of LAB of about 0.4 log CFU/g. The sample NT-15-8 was the first to reach the critical concentration of 6.5 log CFU/g after 10 d, followed by NT-4-8 and NT-15-4. The sausages NT-4-4 remained below this threshold even after 20 d. The treatment with HHP (Figure 2b) determined a relevant decrease in the LAB counts immediately after pressurization which were below the detection limit or slightly higher. After 20 d, the sausages stored at 8°C (600-15-8 and 600-4-8) showed an increase, even if the counts were lower than 2 log CFU/g. After 40 these sausages were characterized by a relevant increase of LAB counts which reached the threshold limit (6.5 log CFU/g) after approx. 45 d (600-4-8) and 55 d (600-15-8). The samples stored at 4°C presented a low increase in LAB counts which were below 3 log CFU/g even after 90 d.

Microbiological analysis of *Staphylococcus* spp. and Enterobacteriaceae in fresh sausages revealed minimal safety concerns under the tested conditions. In not treated sausages, the count of *Staphylococcus* spp. remained relatively stable over 20 days of storage, regardless of thermal abuse conditions. HHP treatment resulted in an approximate 3 log CFU/g reduction. Subsequent storage at 4°C led to a further decline in counts, while storage at 8°C caused a slight increase. Nevertheless, final concentrations remained below 2.5 log CFU/g after 90 days. Regarding Enterobacteriaceae, their low initial counts remained unchanged in untreated samples. In HHP-treated sausages, these bacteria were consistently below the detection limit, indicating effective inactivation by the pressure treatment. LABs contributed significantly to the initial microbial contamination of fresh sausages, likely due to cross-contamination in industrial facilities producing fermented sausages with LAB starter cultures. Thermal abuse at 15°C for 24 hours accelerated microbial growth, reducing shelf-life in not-treated sausages. However, storage at 8°C had a more drastic impact, not only accelerating bacterial growth but also allowing the recovery of inhibited species. HHP treatment reduced microbial populations, but its effectiveness alone was insufficient to determine shelf-life, as viable but non-culturable cells could still recover and multiply under favourable conditions (Aganovic *et al.*, 2021).

Subsequently, a challenge test was done to evaluate the survival and eventual growth of *Salmonella* Enteritidis, *L. innocua* and *Staph. aureus* under controlled storage thermal conditions (4°C). Pathogens were inoculated into sausages at 4.5-4.7 log CFU/g and the sample were subjected (or not) to HHP in the same process conditions. In untreated samples, *Salmonella* Enteritidis showed a slight decrease, *Staph. aureus* remained stable, and *L. innocua* increased. After HHP treatment (600 MPa for 5 min), *L. innocua* and *S. Enteritidis* counts were undetectable, although *L. innocua* was detected qualitatively after 90 days. *S. aureus* showed a reduction of about 3 log CFU/g, remaining

below 2 log CFU/g during storage. *Salmonella* is generally sensitive to HHP, while *S. aureus* shows higher resistance, especially in different matrices, probably due to its cell structure. Fat content in products can affect microbial survival, particularly in the case of *L. monocytogenes*, which may survive better in high-fat environments (Bover-Cid *et al.*, 2015). Temperature control is essential, as low temperatures prevent the recovery of damaged cells, while higher temperatures may enable recovery, especially for *L. monocytogenes* (Bozoglu *et al.*, 2004).

Textural analysis of both HHP-treated and non-treated sausages stored at 4°C revealed significant changes over time. In non-treated samples, hardness and gumminess increased by day 9, followed by a decline by day 15, accompanied by reduced cohesiveness. These variations are attributed to changes in protein-water interactions and oxidative modifications during storage. In contrast, HHP-treated sausages exhibited an immediate increase in textural parameters post-treatment, primarily due to protein denaturation and enhanced water-binding capacity (Torres & Velasquez, 2005). However, as storage progressed, hardness, gumminess, and chewiness declined, likely because of microbial activity and proteolysis. Despite the inactivation of proteolytic enzymes by HHP, redistribution of water during storage led to increased cohesiveness (Olsen *et al.*, 2023).

Colour measurements also indicated notable changes in both treatment groups. Non-treated sausages darkened by day 20, as shown by a decrease in L* values, with redness (a*) initially increasing before declining; these changes likely caused by surface dehydration and myoglobin oxidation. HHP treatment produced an immediate rise in L* values, along with reductions in a* and b*, due to protein and myoglobin denaturation. Over time, treated samples exhibited progressive decreases in all three colour parameters, mirroring trends in non-treated sausages. These alterations were associated with gel matrix instability, oxidation of proteins and lipids, and moisture loss, collectively contributing to gradual meat discoloration during storage (Chun *et al.*, 2014).

During the last part of PhD, experiments have been conducted to evaluate the impact of bioprotective cultures (an alternative non-thermal preservation method) on extending the shelf-life of fresh sausages, while ensuring their quality and microbiological safety (A3 and A4).

5. List of publications produced as part of the doctoral activity

- Referred journal articles

Barbieri F, Montanari C, **Angelucci C**, Gardini F, Tabanelli G (2024) Use of indigenous lactic acid bacteria for industrial fermented sausage production: microbiological, chemico-physical and sensory features and biogenic amine content, *Fermentation*, 10(10): 1-15.

Angelucci C, Barbieri F, Soglia F, Petracci M, Montanari C, Gardini G, Gardini F, Tabanelli G (2024) Changes in the microbiota and colour of pork meat batter during refrigerated storage in relation to the application of High Hydrostatic Pressure, *Food Bioscience*, 62: 105419.

Barbieri F, Tabanelli G, Comas-Basté O, Latorre-Moratalla M, **Angelucci C**, Gardini F, Montanari C, David García-López J, Baños A (2025) Improvement of the safety of artisanal Spanish fermented sausages: Spotlight on the role of bacteriocinogenic *Lactiplantibacillus paraplantarum* against a *Companilactobacillus alimentarius* histaminogenic strain, *Food Control*, 168: 110962.

- Symposium proceedings

Angelucci C, Barbieri F, Baños A, Garcia Madero JM, Montanari C, Tabanelli G, Gardini F (2023) Anti-listerial activity of autochthonous lactic acid bacteria in fresh pork sausages. Proc. of the International Congress of Meat Science and Technology, 69th edition, August 2023, Padova, Italy, pp. 292-293 (poster)

Angelucci C (2023) Use of Non-Thermal Treatments to Improve the Safety, Quality, and Shelf-life of Products of Animal Origin. Proc. of the Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology, 27th edition, September 2023, Portici, Italy (poster)

Angelucci C, Tabanelli G, Gardini F, Barbieri F, Soglia F, Magnani R, Gardini G, Petracci M (2024) Omics techniques for assessing the potential of high hydrostatic pressure to improve the shelf-life of fresh sausages. Proc. of the International Conference on Foodomics, 7th edition, February 2024, Cesena, Italy, pp. 66-67 (poster)

Montanari C, Barbieri F, **Angelucci C**, Mercurio I, Gatti M, Neviani E, Gardini F, Levante A, Tabanelli G (2024) *Lactobacillus helveticus*: A 50-Year Evolutionary Journey in the Natural Whey Starters of Parmigiano Reggiano. Proc. of the World Congress of Food Science and Technology, 22nd edition, September 2024, Rimini, Italy (poster)

Barbieri F, Čagalj M, Šimat V, Montanari C, **Angelucci C**, Morandi S, Bassi D, Gardini F, Tabanelli G (2024) Mediterranean and medicinal plants as source of bioactive essential oils for new natural functional ingredients. Proc. of the International Conference on Foodomics, 7th edition, February 2024, Cesena, Italy, pp. 73-74 (poster)

Tabanelli G, Barbieri F, Montanari C, **Angelucci C**, Gatti M, Neviani E, Gardini F, Levante A (2024) Spotlight on a 50-year evolutionary history of *Lactobacillus helveticus* from natural whey starters of Parmigiano Reggiano. Proc. of the International Conference on Foodomics, 7th edition, February 2024, Cesena, Italy, pp. 168 (poster)

Microbial biopolymers for innovative packaging to increase food shelf-life and safety

Marianna Ciccone (email: marianna.ciccone2@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: XXXVIII; Anno di frequenza: III

Tutor: Prof. Francesca Patrignani; Co-tutor: Dr. Lorenzo Siroli, Dr. Davide Gottardi

1. State of the art

In recent decades, research and industry have become increasingly interested in finding viable alternatives to synthetic petroleum-derived films for food packaging. Petrochemical polymers such as polyethylene, polypropylene, polystyrene, and polyamide are cost-effective materials with excellent mechanical properties and barrier properties against various compounds such as oxygen, carbon dioxide, water vapour and aromatic compounds. However, their non-biodegradability and dependence on non-renewable sources pose a major challenge to the environment. The development of biodegradable polymers for sustainable food packaging could be a solution to reduce the accumulation of plastic and the use on non-renewable polymers (González-López *et al.*, 2023). According to the literature, natural polymers such as polysaccharides, proteins and lipids are used in the development of biodegradable food contact materials. Although various materials are promising as biopolymers, they are still under-researched. One such material is yeast biomass, which is characterised by cell walls made of glucans, mannoproteins and chitin. For example, β -glucans, constituting 55-65% of yeast cell walls, have demonstrated efficacy in forming multicomponent films alongside cell wall proteins. Several non-thermal technologies such as high-pressure homogenisation (HPH) and pulsed electric fields (PEF) are currently available to destroy yeast cell walls and isolate components, offering sustainable alternatives to thermal methods. In particular, spent yeast from the brewing industry (BSY), traditionally considered a low-value by-product, has emerged as a promising raw material for the extraction of valuable biopolymers such as β -glucans and mannoproteins. Its abundant availability, rich biochemical composition, and compatibility with sustainable, non-thermal extraction methods make BSY a strategic resource in the development of functional and biodegradable materials for active food packaging applications. In addition to yeast cell walls, some biopolymers such as pullulan produced by *Aureobasidium pullulans* or bacterial cellulose produced by various acetic bacteria such as *Komagataeibacter xylinus* could also be viable alternatives for obtaining biopolymers of microbial nature for use in food packaging (Saharan *et al.*, 2024). Moreover, biopolymers are gaining importance in food packaging as they can act as carriers for other molecules with antioxidant and antimicrobial properties. Active packaging systems containing functional additives in polymer-based materials interact with food surfaces or the headspace within the packaging to prevent or inhibit the growth of pathogenic or spoilage microorganisms. When antimicrobial agents such as essential oils or bacteriocins are incorporated directly into the food, their efficacy may be reduced due to diffusion through the food matrix. Conversely, the incorporation of these agents into packaging materials is expected to provide a more efficient means of preserving food, with controlled diffusion maintaining residual activity during storage and distribution. Nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, is characterised by its inhibitory effect against pathogenic microorganisms and its ability to maintain activity after processing. Its integration into biopolymer matrices for antimicrobial packaging applications represents a promising avenue for further investigation (Bukvicki *et al.*, 2023). The production of biopolymers from waste and by-products of the agri-food industry and their use as culture substrates for microbial growth could be another component of sustainability. Indeed, whey from the dairy industry, molasses from the sugar industry and some by-products from the wine and beer industry could be good growth substrates for potentially useful microorganisms due to their high organic matter content. Microbial fermentation using agricultural and food waste is proving to be a viable solution for biopolymer production (Horue *et al.*, 2021). The valorisation of food by-products for biopolymer production represents a sustainable solution by addressing environmental challenges, reducing waste-related costs, and promoting a circular economy. However, while biopolymers made from renewable raw materials offer low-carbon alternatives, ensuring their safety for food contact applications is crucial. In this context, comprehensive risk and safety assessments throughout the production process are essential, addressing potential contaminants, non-intentionally added substances (NIAS), and microbial hazards (EFSA, 2023). The inherent complexity of these biopolymers requires continuous assessment to ensure the safety and quality of biopolymer materials for food packaging. To summarise, biopolymers from waste via microbial fermentation are a promising solution for sustainable packaging, requiring optimised production and thorough safety and sustainability assessments.

2. Bibliography

- Bukvicki D, D'Alessandro M, Rossi S, Siroli L, Gottardi D, Braschi G, Patrignani F, Lanciotti R (2023) Essential Oils and Their Combination with Lactic Acid Bacteria and Bacteriocins to Improve the Safety and Shelf Life of Foods: A Review, *Foods* 12(17): 3288.
- European Food Safety Authority (EFSA), Barthélémy E, Bolognesi C, Castle L, Crebelli R, Di Consiglio E, Riviére G (2023) Principles that could be applicable to the safety assessment of the use of mixtures of natural origin to manufacture food contact materials. Vol. 20, No. 11, p. 8409E.
- González-López ME, Calva-Estrada SDJ, Gradilla-Hernández MS, Barajas-Álvarez P (2023) Current trends in biopolymers for food packaging: a review, *Front. Sustain. Food Syst.* 7: 1225371.
- Horue M, Berti IR, Cacicedo ML, Castro GR (2021) Microbial production and recovery of hybrid biopolymers from wastes for industrial applications-a review, *Bioresour. Technol.* 340: 125671.
- Saharan, BS, Kamal N, Badoni P, Kumar R, Saini M, Kumar D, Mandal NK (2024) Biopolymer and polymer precursor production by microorganisms: applications and future prospects, *J. Chem. Technol. Biot.* 99(1): 17-30.

3. PhD thesis objectives and milestones

Within the overall objective mentioned above, this PhD thesis project can be subdivided into the following activities according to the Gantt diagram given in Table 1:

- A1) **Bibliographic research** to identify the most suitable microorganisms for the recovery of biopolymers.
- A2) **Screening of selected strains and optimisation of microbial performance** on agri-food industry by-products.
- A3) **Selection of the most suitable method and technologies** for recovering of the biopolymers of interest.
- A4) **Characterisation of biopolymers** in terms of their antioxidant and antimicrobial properties and film formulation.
- A5) **Evaluation of the shelf life and safety of food matrices** in relation to selected packaging conditions.
- A6) **Writing and Editing** of the PhD thesis, scientific papers, and oral and/or poster communications.

Table 1. Gantt diagram related to this PhD project.

Activity	Months	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
A1) Bibliographic research																			
1) Identification of suitable microorganisms																			
A2) Screening of the selected strains and optimization of microbial performance																			
1) Selection and technological characterisation of selected yeast strains																			
2) Optimisation of growth conditions for microorganisms on agri-food industry wastes and by-products																			
A3) Development of biotechnological processes for the recovery of biopolymers of interest																			
1) Application of microbial enzymes to obtain cellular compounds																			
2) Application of high-pressure homogenisation, pulsed electric fields																			
A4) Antimicrobial and technological characterisation of the obtained biopolymers and film formulation																			
1) Antimicrobial and antioxidant characterisation of biopolymers																			
2) Film formulation and characterisation																			
A5) Evaluation of the shelf life and safety of food matrices in relation to selected packaging conditions																			
A6) Thesis and Paper Preparation																			

4. Research progress and main results

The present research project aims to evaluate the safety, extraction efficiency, and sustainable production of microbial biopolymers for potential applications in food contact materials. The study integrates systematic literature review methodologies with experimental approaches to valorise agro-industrial by-products and microbial biomass. During a six-month research period as a Guest Scientist at the European Food Safety Authority (EFSA) (Parma, Italy), a systematic literature review (SLR) was conducted in accordance with EFSA guidelines to assess the safety of microbial biopolymers. The review addressed four key research questions related to carbon sources, microbial strains, fermentation processes, and biopolymer recovery methods. From over 9,000 initially screened articles, 46 were selected for in-depth analysis, including case studies on bacterial cellulose and nisin. The review emphasized the importance of evaluating contamination risks associated with natural substrates, verifying the Qualified Presumption of Safety (QPS) status of microorganisms, and assessing both metabolites and reaction products. These findings highlight the necessity of rigorous biopolymer characterization to ensure regulatory compliance in food contact applications. In parallel, experimental investigations focused on the extraction of β -glucans and mannoproteins from *Saccharomyces cerevisiae* biomass, using both bakery yeast (BY) and brewery spent yeast (BSY). High-pressure homogenization (HPH) and pulsed electric fields (PEF), applied alone and in combination, were used to disrupt yeast cell walls. HPH proved effective in achieving complete cell disruption, while PEF induced membrane permeabilisation. The combined treatment (HPH+PEF) yielded the highest extraction levels: carbohydrates (7.02 mg/mL in BY; 2.04 mg/mL in BSY), proteins (2.39 mg/mL in BY; 1.64 mg/mL in

BSY), β -glucans (3.90 g/100 g dry matter in BY; 10.44 g/100 g in BSY), and mannoproteins (3.26 g/100 g in BY; 3.54 g/100 g in BSY). This non-thermal extraction approach offers an eco-friendly alternative to conventional methods and aligns with circular economy principles. In addition, a comprehensive bio-refinery approach was adopted to characterise valuable biopolymer fractions in BSY. The biomasses of BSY were provided from provided by ENEA Research Center, Italian National Agency for New Technologies, Energy and Sustainable Economic Development.

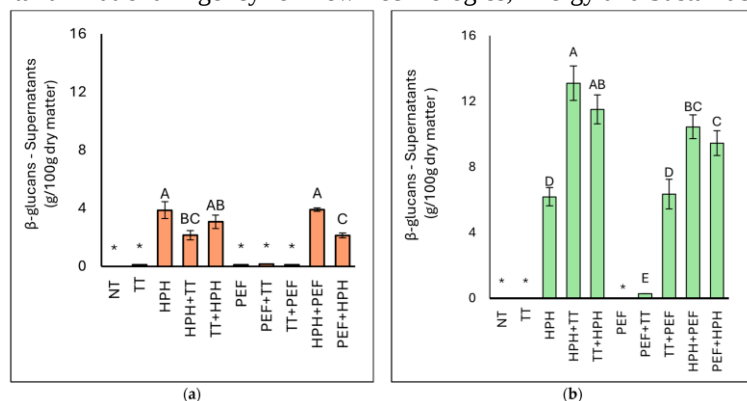


Figure 1: β -glucan content (g/100 g dry matter) of the supernatants of BY (a) and BSY (b). NT represents the control sample. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$). *: below the detection limit (1 g/100 g).

Further fractionation of ten BSY samples—including untreated controls and autolysates—into liquid supernatant (LIS), protein hydrolysate (PH), and yeast cell debris (YCD) revealed a significant increase in β -glucan and mannoprotein recovery after 24 and 72 hours of autolysis, particularly in the LIS fraction. Lipid analysis revealed palmitic acid (C16:0) and oleic acid (C18:1) as the predominant fatty acids, along with a significant presence of medium-chain fatty acids, including caprylic acid (C8:0) and lauric acid (C12:0). All fractions exhibited measurable antioxidant activity, while the YCD fraction (including its lyophilised form) showed selective antimicrobial effects against *Listeria monocytogenes* at concentrations of 5% and 10%. This activity is likely attributed to medium-chain fatty acids while other bioactive compounds such as glutathione can affect antioxidant activity. Lyophilized BSY biomass was subsequently incorporated into multilayer composite films based on Polybutylene Succinate (PBS), Polylactic Acid (PLA), and Polyethylene Terephthalate (PET), with BSY concentrations of 5% and 10%. In parallel, edible films for direct food contact were developed using sodium alginate and glycerol, enriched with 5% or 10% BSY. This work was carried out in collaboration with the Department of Civil, Chemical, Environmental and Materials Engineering (DICAM) of the University of Bologna. Finally, LC/MS-QTOF analysis conducted at Aarhus University (Denmark) confirmed the presence of key bioactive molecules in the BSY, supporting its potential for multifunctional applications in sustainable food packaging.

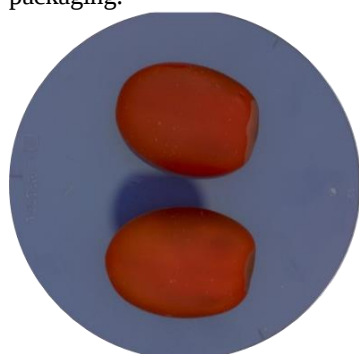


Figure 2: Alginate-based coating solution enriched with 5% BSY powder applied to cherry tomatoes.

In addition, coating trial was conducted on cherry tomatoes to evaluate the performance of BSY-enriched edible films. The fruits were treated with either a standard alginate-based coating or a BSY-enriched variant (SC8/9), with both solutions crosslinked using CaCl_2 . Over a 10-day storage period, samples were assessed for weight loss, color, texture, pH/acidity, and overall migration (Days 0 and 10). The applied coatings demonstrated strong adhesion, improved moisture retention, and effective surface protection. Visual and structural assessments were supported by Videometer imaging. To further investigate the potential of the coatings, microbiological challenge tests will be performed to evaluate their antimicrobial efficacy against spoilage-related microorganisms. These findings highlight BSY as a promising source of bioactive compounds for natural antimicrobials and antioxidants, as well as a sustainable raw material aligned with circular economy principles.

In parallel, pullulan production was explored using two *Aureobasidium pullulans* strains (DSM 2404 and DSM 3042) cultured on cheese whey, olive pomace, grape pomace, and beet molasses. Both strains exhibited robust growth across substrates, reaching maximum biomass within 48 hours. Pullulan production was substrate- and strain-dependent, with DSM 2404 consistently outperforming DSM 3042. The highest yields were observed with cheese whey and beet molasses, demonstrating the feasibility of using agro-industrial by-products as cost-effective fermentation media. However, further analysis of polymer purity and functional properties is required to confirm suitability for packaging use. Moreover, fully bio-based blends were developed by incorporating the natural antimicrobial peptide nisin (0.05 and 2.5 wt%) into poly(trimethylene furanoate) (PTF), a furan-based polyester. The blends maintained the thermal and mechanical stability of pristine PTF and preserved its excellent gas barrier properties. The formulation containing 2.5% nisin showed antibacterial activity against *Lactiplantibacillus plantarum* and *Listeria monocytogenes*, confirmed

through disc diffusion assays. When tested in ACE juice (pH 4.5) inoculated with *L. monocytogenes*, the nisin-enriched PTF reduced bacterial counts below detection limits, unlike the untreated control. This research highlights the feasibility and sustainability of using microbial biopolymers derived from agro-industrial waste for food contact materials. The study supports the valorisation of microbial biomass (particularly BSY) as a renewable resource for applications such as active packaging and edible coatings, aligned with circular economy goals. Further research is needed to evaluate long-term stability, regulatory compliance, and industrial scalability.

5. List of publications produced during the PhD activities

- Ciccone M**, Khan MR, Hernandez JBM, Njieukam JA, Siroli L, Gottardi D, Lanciotti R, Rocculi P, Patrignani F. (2024) Release of Biopolymers from *Saccharomyces cerevisiae* Biomass Through Thermal and Non-Thermal Technologies. *Microorganisms*, 12(12):2596.
- Ciccone M**, Tsochatzis E, Patrignani F, Siroli L, Rainieri S, Barthélémy E. (2025) Investigation of potential risks in biobased food contact materials (FCM) obtained by microbial fermentation of agricultural wastes: The case studies of bacterial cellulose and nisin. *Food Packag. Shelf Life* [submitted].
- Njieukam, JA, **Ciccone M**, Gottardi D, Ricci A, Parpinello GP, Siroli L, Lanciotti R, Patrignani F (2024). Microbiological, functional, and chemico-physical characterization of artisanal kombucha: an interesting reservoir of microbial diversity. *Foods* 13(12): 1947.
- Ciccone M**, Siroli L, Gottardi D, Patrignani F. Microbial biopolymers for innovative packaging to increase food shelf life and safety. 28th Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science, Technology and Biotechnology. Catania, (Italy), 18-20 September, 2024.
- Ciccone M**, Njieukam JA, Leone G, Siroli L, Gottardi D, Lanciotti R, Pizzichini D, Patrignani F. (2024). Characterization and utilization of brewer's spent yeast for sustainable packaging innovations. 22nd World Congress of Food Science and Technology. The future of food is now: Development, Functionality & Sustainability. Rimini (Italy), 8-12 September, 2024.
- Oral presentation - Ciccone M**, Njieukam JA, Hernandez JBM, Brashi G, Siroli L, Gottardi D, Lanciotti R, Rocculi P, Patrignani F. High pressure homogenization and pulsed electric fields for favouring the release of β -glucans and mannoproteins from yeast cell walls. 22nd World Congress of Food Science and Technology. The future of food is now: Development, Functionality & Sustainability. Rimini (Italy), 8-12 September, 2024.
- Njieukam JA, Siroli L, **Ciccone M**, Braschi G, Gottardi D, Lanciotti R, Patrignani F. Bacterial cellulose production by *Komagataeibacter* spp. in agri-food by-products. 22nd World Congress of Food Science and Technology. The future of food is now: Development, Functionality & Sustainability. Rimini (Italy), 8-12 September, 2024.
- Pizzichini D, **Ciccone M**, Zamboni E, Leone GP, La Rosa I, Siroli L, Patrignani F, Celli A. Recovery of valuable compounds from Brewery Spent Yeast through a biorefinery approach for eco-friendly packaging applications. Annual meeting, L'innovazione a servizio dell'economia circolare: lo Spoke 8 di Agritech. Milan (Italy), 6 September, 2024.
- Guidotti G, **Ciccone M**, Bianchi E, Siroli L, Gottardi D, Siracusa V, Patrignani F, Lotti N. Furan-based polyesters loaded with nisin for sustainable antimicrobial packaging. Annual meeting, L'innovazione a servizio dell'economia circolare: lo Spoke 8 di Agritech. Milan (Italy), 6 September, 2024.
- Njieukam JA, Siroli L, **Ciccone M**, Braschi G, Gottardi D, Patrignani F, Lanciotti R. Optimization of the production of bacterial cellulose by *Komagataeibacter* spp. on brewer's spent grains. 28th International ICFMH Conference FOOD MICRO 2024. Burgos (Spain), 8-11 July, 2024.
- Ciccone M**, Barthélémy E, Tsochatzis E, Rainieri S, Njieukam JA, Siroli L, Gottardi D, Lanciotti R, Patrignani F. Approach to perform the Safety Assessment of Cellulose and Nisin Biopolymers obtained from Bacterial Fermentation as Innovative Food Contact Materials Aimed to Extend Food Shelf Life. 11th Shelf-Life International Meeting - SLIM2024. Reggio Emilia (Italy), 20-23 May, 2024.
- Ciccone M**, Njieukam JA, Siroli L, Gottardi D, Lanciotti R, Patrignani F. Utilization of agri-food industry by-products as sustainable substrates for pullulan production by *Aureobasidium* spp. strains: implications for food packaging sustainability. 7th THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON FOODOMICS. Cesena, 14-13 February, 2024.
- Njieukam, JA, Siroli L, **Ciccone M**, Braschi G, Gottardi D, Lanciotti R, Patrignani F. Bacterial cellulose production by selected acetic acid bacteria on different Agri-food by-products. 7th THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON FOODOMICS. Cesena (Italy), 14-13 February, 2024.
- Ciccone M**, Siroli L, Gottardi D, Njieukam JA, Braschi G, Lanciotti R, Patrignani F. Application of non-thermal technologies for the recovery of β -glucans from yeast biomass. 7th INTERNATIONAL CONFERENCE ON MICROBIAL DIVERSITY "Agrifood microbiota as a tool for a sustainable future" future". Parma (Italy), 26-29 September, 2023.
- Njieukam JA, Siroli L, **Ciccone M**, Gottardi D, Patrignani F, Lanciotti R. Selection of bacterial cellulose producing acetic acid bacteria from kombucha tea and evaluation of the influence of culture conditions on bacterial cellulose production. 7th INTERNATIONAL CONFERENCE ON MICROBIAL DIVERSITY "Agrifood microbiota as a tool for a sustainable future" future". Parma (Italy), 26-29 September, 2023.
- Ciccone M**, Siroli L, Gottardi D, Lanciotti R, Patrignani F. Microbial Biopolymers for Innovative Packaging to Increase Food Shelf-life and Safety. 27th Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science, Technology and Biotechnology. Portici (Italy), 13-15 September 2023.

Application of innovative technologies for the functionalisation of alternative proteins and the associated functional and rheological characterisation

Federico Drudi (email: federico.drudi3@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: XXXVIII; Anno di frequenza: III

Tutor: Urszula Tylewicz; Co-tutor: Silvia Tappi

1. State of the art

Following recent trends in the food sector, an increasing market share of plant-based products can be observed, ranging from dairy substitutes to alternative meats (GFI Europe, 2023), trend that is expected to increase further, also thanks to a shift in consumer preferences towards more environmentally friendly and cruelty-free products. Finally, especially in the richest countries, the development of protein foods from vegetable matrices has experienced tremendous growth (Fasolin *et al.*, 2019; Aschemann-Witzel *et al.*, 2021). As a result, more and more companies are launching such products on the market, creating a need for specific ingredients. As it is well known, many plant-based products are characterised by a long list of ingredients used to overcome technological problems and meet specific requirements in terms of sensory properties and stability, to mimic the animal counterpart (Akharume *et al.*, 2021). Unfortunately, proteins derived from plant sources differ not only in terms of their nutritional value but also in terms of their technological properties. Solubility and gelling properties are generally lower than those of animal origin (especially at pH close to neutrality), making their use in formulations more complex (Akharume *et al.*, 2021).

One response to these needs can be the modification of plant proteins to obtain products with specific properties. Protein functionalisation has been used in the food sector for several years (Panyam *et al.*, 1996; Messens *et al.*, 1997). Recently, however, the interest of scientific research has shifted from the classical chemical-enzymatic modifications (e.g. glycosylation, acetylation, hydrolysis and cross-linking) to physical modifications obtained by applying non-thermal technologies such as cold plasma (CP), pulsed electric field (PEF), ultrasound (US) and high pressure processing (HPP), making the whole functionalisation process more sustainable and efficient (Mirmoghtadaie *et al.*, 2016; Sun-Waterhouse *et al.*, 2017; O'sullivan *et al.*, 2022).

Although the four technologies mentioned above are all considered non-thermal, they are based on different functional mechanisms. Cold plasma is able to favour the rearrangement of the protein structure thanks to the main action of the RONS formed (Basak *et al.*, 2022), while in high pressure processing, the denaturing effect on the proteins is achieved by the compression that causes the collapse of the structures with empty spaces (such as the β -sheets) (Wang *et al.*, 2022). One of the most studied technologies is ultrasound, where the short and localised pressure and temperature shocks (thanks to the cavitation phenomenon) can act both at the macroscopic level on the size of the particles and at the microscopic level, denaturing the proteins and exposing the most lipophilic areas (O'sullivan *et al.*, 2022). Finally, the least used technology for this purpose is pulsed electric field, as its efficacy and mechanism of action on proteins is still controversial (Han *et al.*, 2018).

2. Bibliography

- Akharume FU, Aluko RE, Adedeji AA (2021) Modification of plant proteins for improved functionality: A review, *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 20(1): 198-224.
- Aschemann-Witzel J, Gantriis RF, Fraga P, Perez-Cueto FJ (2021) Plant-based food and protein trend from a business perspective: markets, consumers, and the challenges and opportunities in the future, *Crit. Rev. Food Sci.* 61(18): 3119-3128.
- Basak S, Annapure US (2022) Recent trends in the application of cold plasma for the modification of plant proteins-A review, *Fut. Foods* 5: 100119.
- Fasolin LH, Pereira RN, Pinheiro AC, Martins JT, Andrade CCP, Ramos OL, Vicente AA (2019). Emergent food proteins—Towards sustainability, health and innovation, *Food Res. Int.* 125: 108586.
- GFI Europe (2023) Europe plant-based food retail market insights, report.
- Han Z, Cai MJ, Cheng JH, Sun DW (2018) Effects of electric fields and electromagnetic wave on food protein structure and functionality: A review, *Trends Food Sci. Technol.* 75: 1-9.
- Messens W, Van Camp J, Huyghebaert A (1997) The use of high pressure to modify the functionality of food proteins, *Trends Food Sci. Technol.* 8(4): 107-112.
- Mirmoghtadaie L, Aliabadi SS, Hosseini SM (2016) Recent approaches in physical modification of protein functionality, *Food Chem.* 199: 619-627.
- O'sullivan JJ, Park M, Beevers J, Greenwood RW, Norton IT (2017) Applications of ultrasound for the functional

(below 5%). Protein denaturation, on the other hand, could be possibly one of the reasons behind the changes, since an increment of solubility and the changes in disulphide bridges/free sulfuryls were observed, especially at a treatment pressure of 30-60 MPa. Nevertheless, other possible causes for the observed changes could be linked also to interaction between these components and fibers or fats, since flour are to be considered complex matrices comprising different macromolecules. The results of this research are the subject of a manuscript currently submitted to a scientific indexed journal.

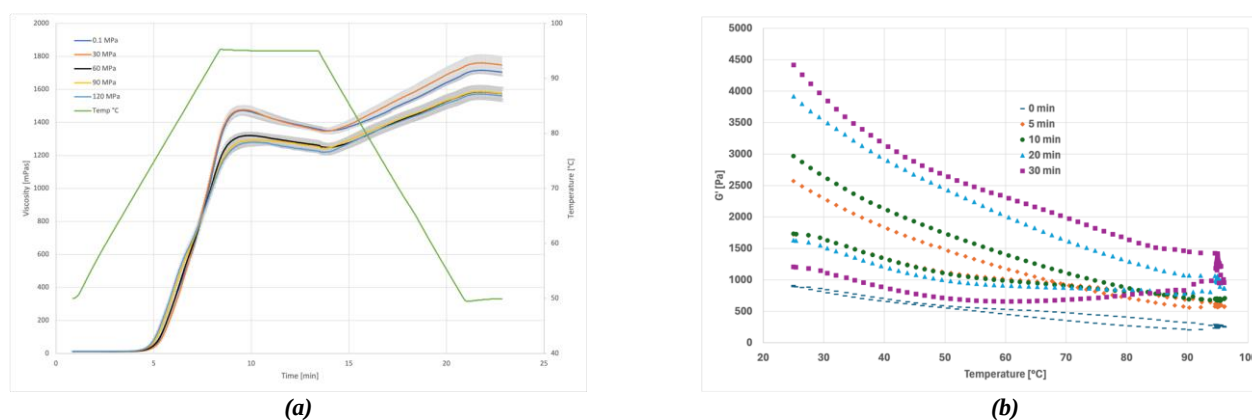


Figure 1. Pasting profile of chickpea flour treated with HPH (a). Temperature sweeps of pea protein isolate after cold plasma treatment (b).

Table 2. Selected functional properties evaluated for the HPH treated chickpea flour.

Sample	Control	30 MPa	60 MPa	90 MPa	120 MPa
WHC [g/g db]	1.11 ± 0.02 ^{bc}	1.06 ± 0.04 ^c	1.11 ± 0.01 ^{bc}	1.18 ± 0.04 ^a	1.35 ± 0.02 ^a
OHC [g/g db]	0.89 ± 0.02 ^c	1.09 ± 0.06 ^a	1.06 ± 0.06 ^{ab}	0.98 ± 0.02 ^{bc}	0.99 ± 0.01 ^{ab}
WAI [g/g db]	5.47 ± 0.07 ^d	5.59 ± 0.18 ^{cd}	5.83 ± 0.14 ^{bc}	6.14 ± 0.11 ^{ab}	6.46 ± 0.06 ^a
WSI [g/100g db]	39.95 ± 1.07 ^b	43.50 ± 0.38 ^a	42.70 ± 0.50 ^a	40.07 ± 0.07 ^b	39.44 ± 0.15 ^b
Foam capacity [%]	19.33 ± 1.15 ^d	26.00 ± 0.00 ^c	29.33 ± 2.13 ^{ab}	28.00 ± 2.00 ^{bc}	32.00 ± 0.00 ^{ab}
Foam stability after 30 min [%]	86.30 ± 5.48 ^a	69.23 ± 7.69 ^b	63.69 ± 7.22 ^b	66.89 ± 6.06 ^b	68.75 ± 0.00 ^b

Different letters in each rows indicate statistically significant ($p < 0.05$) differences between samples.

Following this initial test, a more in-depth study was carried out. Specifically, aiming at isolating the components likely linked to the observed changes. For this purpose, the protein and starch fractions were extracted from the chickpea flour and then treated separately with HPH using the same parameters as in the previous trial. The control and treated samples were analyzed for the following properties: WHC, OHC, WAI, WSI and foam stability, pasting and rheological characterization. Unfortunately, it seems that the changes occurring on the protein isolation step limit the ability to detect a change after the HPH treatment, probably as a result of the denaturation induced by isoelectric precipitation. The effects on the starch fraction, on the other hand, are clearly visible in the pasting profiles. In fact, although maintaining its characteristic shape, all viscosity values are lowering proportionally to the pressure applied. This contrasts with what is possible to see for the whole flour that experience an increase upon 30-60 MPa treatment. Thus, is likely that the improvement of viscosity (especially peak viscosity) is due to the effect of other component present in the flour, possibly proteins or the fibrous fraction that are also affected by the high-pressure treatment. Nevertheless, is not possible to exclude possible interaction between components resulting in synergistic/antagonistic effects.

Following the objective 3A of the Gantt chart, the second “emerging technology” tested was a new cold plasma source developed in our labs by prof. Luigi Ragni. It was specifically designed to uniformly treat powders materials and preliminary trials have been carried out on pea protein isolate (PPI). Specifically, the effect of treatment time was assessed, screening from 0 to 30 minutes of exposure.

The main observed effects (Fig. 1b) consist in an improvement of the gelling ability, detected by an increase in the G' values upon a heating-cooling ramp. This can be seen from the fact that 15% PPI control suspension shows no improvement in gelation on heating, whereas a 4-fold increase in G' is observed after 30 minutes of CP exposure. FTIR analysis of the treated PPI shows a minimal secondary structure modification after the treatment and the absence of a clear band shift on SDS-PAGE analysis suggest no effect on the primary structure of the protein. Nevertheless, FTIR can clearly discriminate between samples and indicates a marked differentiation in the 1200-1400 cm^{-1} range, corresponding to the stretching vibrations of $-\text{CH}_3$. Currently solubility and oxidation test are being carried out to assess the possible explanation behind the improved gelling ability of the product. So far, it seems possible to suggest that plasma reactive species affect the tertiary structure of the protein that is subsequently more prone in forming a network through weak bonding during the heating-cooling ramp.

Finally, during my period abroad at the University of Otago (New Zealand), the feasibility of using pulsed electric field (PEF) as a technology to improve functional properties of chickpea flour was investigated. Upon few trials it seemed clear that due to the high conductivity of the mixture the PEF treatment inevitably induced sufficient heating in the mixture to induce starch gelatinization and possibly protein denaturation. Thus, being unfeasible to obtain a powdered product after treatment the interest shifted on producing soft gels with varying consistencies that could be suitable for dysphagia treatment, thus obtaining a final product to meet objective 5A.

Obtained results (Fig. 2) highlight that chickpea flour slurry (10% w/w) formed gels upon treatment with 1-2 kV/cm and specific energies above 410 kJ/kg. As specific energy increased so did hardness (0.35 ± 0.01 to 2.94 ± 0.19 kPa) and rheological properties such as storage modulus (195 ± 42 to 2350 ± 466 Pa) and yield stress (5.7 ± 5.6 to 423.4 ± 135.2 Pa) of the gels, obtaining products with textures spanning a range of International Dysphagia Diet Standardization Initiative levels (IDDSI), a commonly use standard to evaluate product applicability for dysphagia diet treatment. To better understand the gel structure and formation, Fourier transform infrared spectra (FTIR), light microscopy and differential scanning calorimetry (DSC) were used. Results showed that gel formation was mainly attributed to starch gelatinization (FTIR 1047/1021 ratio decreasing from 0.759 ± 0.007 to 0.699 ± 0.002) plausibly caused by a temperature increase due to the Joule effect during PEF, as suggested also by the absence of statistically significant differences between the 2 electric field tested. Protein denaturation and aggregation became more important in PEF-treated chickpea slurries above 450 kJ/kg, as those sample presented improved gelling strength although the DSC thermogram already showed a fully gelatinized starch.

Interestingly, although some literature works suggest that even at low electric fields (below 5 kV/cm) PEF treatment are able to induce some degree of structural changes in protein and starch molecules, mainly as a result of molecule polarization and/or electrochemical reactions, results from the present work offer unclear answers. On one side, no significant differences in textural or rheological parameters were observed between the two field strengths (only specific energy was responsible for the modification observed, thus suggesting that the effect was mainly driven by Joule heating), while on the other, gels formed following treatment at 2 kV/cm led to an increase in readily digestible starch (from 16.28 ± 0.15 to 89.06 ± 1.78 %) and a faster intestinal protein digestion rate (from $1.16 \pm 0.20 \times 10^{-2}$ to $1.65 \pm 0.04 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) during simulated gastrointestinal digestion, with a clear effect of the electric field in contrast with what was observed for rheological and textural properties. This different effect of the electric field could be explained by the fact that the gel structure and hardness, although arising from the formation of a 3D network (comprising starch and protein molecules) is not affected by the possibly minor structural modification induced by the electric field, while digestibility properties might be more susceptible to such changes.

Overall, this study shows that PEF treatment could be used as a rapid method (44.4-227.4 ms) to produce gels with varying textural and rheological consistency using a single ingredient, e.g. chickpea flour, that could find an application in the development of dysphagia friendly products. Nevertheless, it is important to state the current needs of further studies especially regarding the applicability in the dysphagia sector as the IDDSI method used for the classification lacks objective parameters and needs to be coupled with more advanced techniques such as videofluoroscopic swallowing studies (VFSS). The result of this study is currently undergoing the review process for publication in an indexed journal.

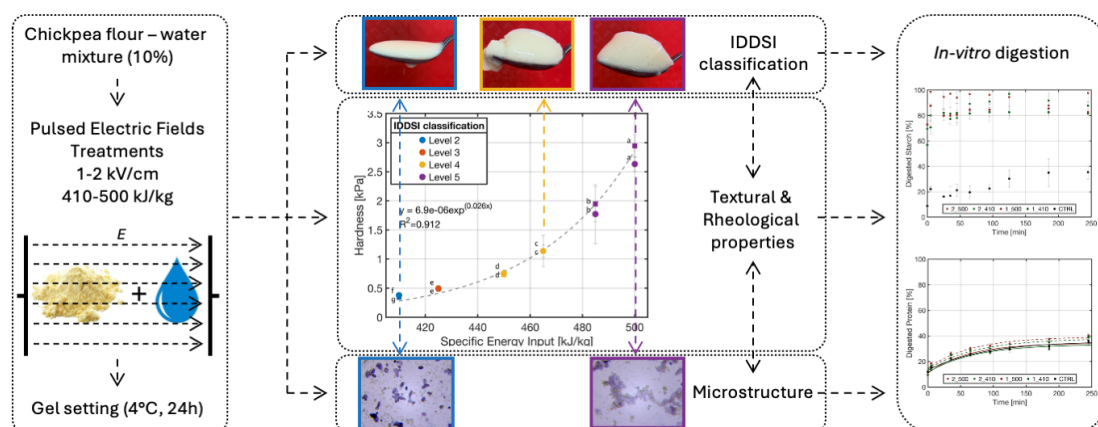


Figure 2. Graphical abstract of the trial carried out using PEF. From left it can be seen the condition tested, the main structural properties of the obtained gels and finally the resulting effects on the in-vitro digestibility.

5. List of publications produced as part of the doctoral activity

- Nowacka M, Trusinska M, Chraniuk P, Drudi F, Lukasiewicz J, Nguyen NP, Przybyszewska A, Pobiega K, Tappi S, Tylewicz U, Rybak K and Wiktor A (2023) Developments in plant proteins production for meat and fish analogues, *Molecules* 28(7): 2966. (DOI: 10.3390/molecules28072966)
- Drudi F, Oey I, Leong SY, King J, Sutton K, Tylewicz U New opportunity of using Pulsed Electric Field (PEF) technology to produce texture-modified chickpea flour-based gels for people with dysphagia, Currently under review in *Food Hydrocolloids*.

Combining instrumental and sensory methods to assess food products of animal origin

Mara Antonia Gagliano (email: maraantonia.gagliano@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: XXXVIII; Anno di frequenza: III

Tutor: Enrico Valli; co-tutor: Francesca Soglia, Francesca Patrignani

1. State-of-the-Art

Human sensory perception can be complemented by "artificial senses," which rely on the use of instrumental technologies applied in various domains such as quality control, shelf-life assessment, and authentication of food products. These tools offer several advantages being rapid, efficient, non-destructive, and environmental sustainable (Mahanti *et al.*, 2024). Among the artificial sensing technologies, electronic noses (e-noses) and electronic tongues (e-tongues) based on electronic or hybrid sensors are of particular interest. The e-nose system consists of an array of sensors designed to interact with compounds in food, mimicking the way the human olfactory system perceives different odors. (Wang & Chen, 2024). This technology has been utilized, for example, to evaluate the quality of beef fillet (Sun *et al.*, 2024), monitor chicken meat freshness (Chotimah *et al.*, 2024), authenticate Parmigiano-Reggiano cheese (Becchi *et al.*, 2024), and determine the adulteration of honey (Gonçalves *et al.*, 2023). Another fast, non-destructive method is the computer vision system (CVS), also known as electronic eye. Comprising an illumination unit, a high-resolution camera, and a computer, CVS enables the classification of food products by grade, detection of visual defects, and estimation of characteristics such as color, shape, size, and surface anomalies. Applications include the estimation of color, marbling level, quality prediction of beef meat (Munekata *et al.*, 2023), chicken meat (Ismail *et al.*, 2024) and characterization and discrimination of honey from different botanical and geographical origins (Wójcik *et al.*, 2023). Integrating instrumental and microbiological methods with sensory analysis allows to investigate how farming systems could influence the quality of food products of animal origin (Kasapidou *et al.*, 2023). In this regard, the present PhD research aims to explore the effect of farming systems and origin on the quality of foods of animal origin, adopting a multidisciplinary approach relying on using sensory, microbiological, and instrumental data for providing a comprehensive quality assessment.

2. References

- Becchi PP, Rocchetti G, García-Pérez P, Michelini S, Pizzamiglio V, Lucini L (2024) Untargeted metabolomics and machine learning unveil quality and authenticity interactions in grated Parmigiano Reggiano PDO cheese, *Food Chem.* 447: 138938.
- Chotimah Saifullah K, Laily FN, Puspita M, Kombo, KO, Hidayat SN, Sulistyani ET, Wahyono Triyana K (2024) Electronic nose-based monitoring of vacuum-packaged chicken meat freshness in room and refrigerated storage, *J. Food Meas. Charact.* 18: 8825–8842.
- Gonçalves WB, Teixeira WSR, Cervantes EP, Mioni MDSR, Sampaio ANDCE, Martins OA, Gruber J, Pereira JG (2023) Application of an electronic nose as a new technology for rapid detection of adulteration in honey, *Appl. Sci.* 13: 4881.
- Ismail I, Huda N (2024) Current techniques and technologies of meat quality evaluation. In *Hand Book of Processed functional meat products*; Rather, S.A., Masoodi, F.A., Eds.; Springer Nature Switzerland: Cham, pp. 437–512.
- Kasapidou E, Stergioudi RA, Papadopoulos, V, Mitlianga P, Papatzimos G, Karatzia MA, Amanatidis M, Tortoka V, Tsiftsi E, Aggou A, Basdagianni Z (2023) Effect of farming system and season on proximate composition, fatty acid profile, antioxidant activity, and physicochemical properties of retail cow milk, *Animals* 13: 3637.
- Mahanti NK, Shivashankar S, Chhetri KB, Kumar A, Rao BB, Aravind J, Swami DV (2024) Enhancing food authentication through E-Nose and E-Tongue technologies: current trends and future directions, *Trends Food Sci. Technol.* 150: 104574.
- Munekata PES, Finardi S, De Souza, CK, Meinert C, Pateiro M, Hoffmann TG, Domíngue R, Bertoli SL, Kumar, M, Lorenzo JM (2023) Applications of electronic nose, electronic eye and electronic tongue in quality, safety and shelf life of meat and meat products: a review, *Sensors* 23: 672.
- Sun X, Wang S, Jia W (2024) Research progress of electronic nose and near-infrared spectroscopy in meat adulteration detection, *Chemosensors* 12(3): 35.
- Wang M, Chen Y (2024) Electronic Nose and Its Application in the Food Industry: A Review, *Eur. Food Res. Technol.* 250: 21–67.
- Wójcik S, Ciepiela, F, Jakubowska M (2023) Computer vision analysis of sample colors versus quadruple-disk iridium-platinum voltammetric e-tongue for recognition of natural honey adulteration, *Measurement* 209: 112514.

4. Research progress and main results

This PhD project aims to characterize various food products of animal origin, including poultry and beef meat, dairy products, and honey, through a multi-analytical instrumental and sensory approach. The primary aim is to investigate the influence of the farming system on food quality, particularly in beef and dairy products, as well as the effect of botanical and geographical origin in the case of honey. Microbiological analyses have also been carried out to explore potential relationships between dairy cows' diets and cheese microbiomes, as well as to assess products safety.

During the second year, part of the activities were carried out at the Department of Animal Production and Food Sciences at the University of Extremadura (Spain), under the supervision of Professor Sonia Ventanas. The main objective of this collaboration was to characterize the sensory, physicochemical, and metabolomic profiles of "Torta del Casar" PDO, a traditional cheese from the Extremadura region. Advanced and rapid sensory methods were employed, such as Napping combined with Ultra Flash Profiling. In this method, participants were provided with a two-dimensional space (tablecloth/sheet) and asked to position cheeses (both PDO and non-PDO) according to perceived similarities and differences. They were also instructed to write at least five descriptors to justify their positioning. This technique generates an overall sensory map, highlighting differences and similarities between samples. To assess the emotional responses elicited during consumption, the Circumplex Model Emotions Questionnaire was also administered. This multiple-choice tool features a circular arrangement of 12 pairs of adjectives (emotions). After tasting each cheese, participants selected the emotion pairs that best described their experience. Subsequently, physicochemical analyses were conducted, including texture analysis, lipid oxidation (TBARS), protein content (Kjeldahl method), and fat content (Van Gulik method). Advanced volatile and metabolomic profiling was also performed to identify differences between PDO and non-PDO cheeses. These results are currently being processed.

Sensory analyses were conducted on UHT whole milk samples (N=30, provided by a French company) obtained from different farming systems (i.e., pasture-based, semi-mountain, and intensive) and collected during different seasons (winter and spring). In Italy, sensory profiling was performed using a rapid descriptive test known as Flash Profiling. Experienced assessors evaluated six samples per session, developed individual lexicons, selected 3 to 5 key attributes, and ranked samples based on these descriptors using an ordinal scale. Each session lasted approximately one hour.

Data were analyzed using Generalized Procrustes Analysis (GPA), which revealed that attributes such as "cooked milk," "cream/butter," and "barn/hay" were the most distinctive. Preliminary findings indicated a clear differentiation between samples collected in winter and spring. Further statistical analyses will investigate the influence of the farming systems in greater depth. A hedonic assessment with Italian consumers was also conducted. Participants evaluated six randomly selected milk samples for attributes such as appearance, smell, taste, texture, and overall liking. They also completed a Check-All-That-Apply (CATA) test, using descriptors based on the Flash Profiling results and literature review. A brief questionnaire collected sociodemographic data, UHT milk consumption frequency, and purchasing habits. The test, still ongoing, aims to reach 150 participants as outlined in the protocol shared with the INTAQT EU research project partners. These sensory evaluations provide crucial insights into consumer preferences and help assess the impact of farming systems. The results of consumer test are currently being elaborated.

Another objective of this PhD project is to evaluate the impact of farming system intensification on the intrinsic quality of meat products. In particular, the research assesses consumer preferences and sensory perceptions of beef reared according to different farming systems, ranging from intensive to extensive. Unprocessed beef samples from the farming systems available in Europe were collected and analyzed, ensuring compliance with hygiene and safety regulations. In Italy, 72 beef samples were evaluated by 120 untrained consumers across six sensory sessions. Participants assessed grilled tenderloin samples in controlled conditions. Each participant evaluated seven samples, using standardized utensils and coded presentations to ensure randomization and reduce bias. A detailed questionnaire captured demographic data, beef consumption habits, meat preferences, and sensory assessments for each sample (e.g., tenderness, juiciness, flavor, and overall liking). Participants also rated product quality on a four-point scale ranging from "unsatisfactory" to "premium quality."

Preliminary analysis revealed significant differences in consumer preferences based on geographical origin and farming system. Samples from the UK received the highest ratings for juiciness and flavor, Spanish samples were preferred for tenderness, and Swiss beef was rated highest overall. Italian samples received lower scores, potentially due to sample preparation inconsistencies that may have affected perception.

In terms of farming systems, extensive and semi-extensive samples were generally preferred over intensive ones. These findings confirm that both geographic origin and farming system can significantly affect consumer-perceived beef quality.

At last, a part of the activities were aimed to characterize the aromatic profile of monofloral honeys having varying botanical and geographical origin using an untargeted instrumental approach to support the verification of authenticity and compliance with quality standards. A total of 109 samples were analyzed: 55 from Italy, 12 from the Baltic States, 2 from Spain, and 40 from Iran. Analyses were conducted using HS-Flash-GC FID.

Results revealed considerable variability in volatile compound profiles, which may represent a useful feature to distinguish honeys of different origins. This variability is likely influenced by environmental factors such as climate, soil type, and beekeeping practices. Additionally, botanical origin strongly influenced the volatile profiles of the forthcoming honey, as it has been demonstrated that it mirrors the distinctive compounds of the flowers from which the nectar was collected. These differences may help to identify potential volatile markers of authenticity for individual floral species. Finally, in the coming months, the data will be integrated and sensory analyses will be carried out to

characterize new samples of monofloral honeys, supported by rapid instrumental techniques such as Flash GC-FID and electronic eye.

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

Conference proceedings

- Gagliano MA, Baldi G, Soglia F, Mancinelli AC, Petracci M (2023) Qualitative characterization of chicken meat according to the main Italian commercial categories, Proc. of the 25th ASPA Congress, pp. 214-215.
- Gagliano MA, Soglia F, Zampiga M, Sirri F, Petracci M (2023) Comparison of meat quality traits among chickens' genotypes with different growth-rates, Proc. of the 25th ASPA Congress, p. 214.
- Gagliano MA, Soglia F, Tura M, Zampiga M, Valli E, Gallina Toschi T, Sirri F, Petracci M (2023) Quality traits of thigh meat from the more promising medium-growing genotypes to be used for European broiler production, Proc. of the 69th International Congress of Meat Science and Technology from Tradition to Green Innovation, pp 422-423.
- Soglia F, Gagliano MA, Cartoni Mancinelli A, Petracci M (2023) Quality characteristics of chicken meat belonging to the different market categories available in Italy, Proc. of the XXVth European Symposium on the Quality of Poultry Meat, p. 121.
- Soglia F, Gagliano MA, Zampiga M, Sirri F, Petracci M (2023) Quality of chicken meat from medium-growing genotypes approved by the European Chicken Commitment, Proc. of the XXVth European Symposium on the Quality of Poultry Meat, p. 69.
- Gagliano MA, Tura M, Soglia F, Cevoli C, Barbieri S, Braschi G, Patrignani F, Bendini A, Gallina Toschi T, Petracci M, Valli E (2024) Multi-analytical characterization of Parmigiano Reggiano PDO cheeses produced with milk from different dairy cows feeding, Book of abstract "Foodomics 2024 - 7th International Conference On Foodomics 2009-2024, fifteen years on from. Where are we now, what's next", pp. 113-115.
- Antenucci EL, Gagliano MA, Soglia F, Cartoni Mancinelli A, Petracci M (2024) Comparison of meat quality traits among the main chicken categories marketed in Italy: 2. lipid and protein oxidative stability, Proc. of the XVIth European Poultry Congress, p. 450
- Gagliano MA, Antenucci EL, Soglia F, Cartoni Mancinelli A, Petracci M (2024) Comparison of meat quality traits among the main chicken categories marketed in Italy: 1. Technological properties, Proc. of the XVIth European Poultry Congress, p. 449

Scientific articles

- Baldi G, Gagliano MA, Soglia F, D'Elia F, Laghi L, Rocculi P, Petracci M (2023) High-Intensity Ultrasonication as an Innovative Approach for the Softening of Wooden Breast Meat in Broiler, Meat Muscle Biol.7(1): 1-10.
- Tura M, Gagliano MA, Soglia F, Bendini A, Patrignani F, Petracci M, Gallina Toschi T, Valli E (2024) Consumer Perception and Liking of Parmigiano Reggiano Protected Designation of Origin (PDO) Cheese Produced with Milk from Cows Fed Fresh Forage vs. Dry Hay, Foods, 13:1-17.
- Tura M, Gagliano MA, Valli E, Petracci M, Gallina Toschi T (2024) A methodological review in sensory analyses of chicken meat, Poult. Sci. 103: 1-17.
- Gagliano MA, Tura M, Soglia F, Cevoli C, Barbieri S, Braschi G, Bendini A, Gallina Toschi T, Petracci M, Valli E (2025) Sensory and Instrumental Characterization of Parmigiano Reggiano Protected Designation of Origin Cheese Obtained from Milk of Cows Fed Fresh Herbage vs. Dry Hay, Foods 14: 1781.

Study on dealcoholized wine and valorisation of byproducts: a multidisciplinary perspective from processing and sensory science

Yogesh Kumar (email: yogesh.kumar3@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: XXXVIII; Anno di frequenza: III

Tutor: Andrea Versari; Co-tutor: Giuseppina Paola Parpinello, Arianna Ricci

1. State of the art

EU wine regulations define wine as "the product obtained exclusively from the total or partial alcoholic fermentation of fresh grapes, whether or not crushed, or of grape must with an actual alcoholic strength of not less than 8.5% volume" (EU Regulation No 1308, 2013, p. 809). In a previous study, authors (Pickering, 2010; Saliba *et al.*, 2013) proposed different wine categories based on the alcohol content as alcoholic (> 10.5% v/v), lower-alcohol (5.5% to 10.5% v/v), reduced-alcohol (1.2% to 5.5% or 6.5% v/v), low-alcohol (0.5% to 1.2% v/v), and alcohol-free (0.5% v/v) wine to consider potential social and health benefits for consumers. However, there were no official regulations at that time, and these categories were loosely based on labelling and legislative requirements. In 2021, a new EU regulation 2021/2117 introduced the category of "dealcoholized wine; if the actual alcoholic strength of the product is no more than 0.5 percent by volume" and "partially dealcoholized; if the actual alcoholic strength of the product is above 0.5% by volume and is below the minimum actual alcoholic strength of the wine category" (Regulation (EU) 2021/2117, 2021, p. 270). According to the most recent industry data, the non-alcoholic wine market is worth more than US\$ 1.6 billion in 2021. It is predicted to grow at a compound annual growth rate (CAGR) of 10.4% to reach a valuation of US\$ 4.5 billion by 2031, compared to a CAGR of 8.8% for 2016 to 2020 (Fact.MR, 2022).

Interestingly, reducing the alcohol content of red wines may reduce the risks associated with the consumption of alcoholic wines without compromising their cardio-protective effects (Chiva-Blanch *et al.* 2012). Moreover, polyphenolic compounds can have a positive biological effect on cardiovascular health due to their anti-inflammatory properties (Jiao *et al.*, 2019, Rojas Borquez *et al.*, 2016). As a result, alcohol-free wine could be an excellent source of antioxidants to protect people suffering from oxidative stress, such as cancer, diabetes, alzheimer, etc., who should not consume alcohol. Furthermore, techniques for reducing alcohol content during post-fermentation include membrane techniques such as reverse osmosis (RO), nanofiltration (NF), pervaporation (PV), vacuum distillation (VD), osmotic distillation (OD), spinning cone column (SCC), and multi-stage membrane systems (Mangindaan *et al.*, 2018; Sam *et al.*, 2021; Schmitt & Christmann, 2022). Ongoing limitations in sensory quality, promotional issues, and a low level of awareness of the improvements in quality based on innovations in production methods were suggested as potential barriers to the market success of dealcoholized, low- and reduced-alcohol wine. In this view, there is a need to increase consumer knowledge related to alcohol reduction processes and increase consumer awareness about high-quality, low-alcohol wines with appealing sensory properties.

Furthermore, the increasing production of low- and non-alcoholic wines results in ethanol-rich permeate as a major byproduct, often overlooked despite its valorization potential. Containing not only ethanol but also volatile and water-soluble compounds, this stream offers opportunities for sustainable reuse. Efficient utilization of such byproducts can enhance both the environmental and economic sustainability of the dealcoholization process.

2. References

- Fact.MR. (2022, December 21). Non-alcoholic wine market trends & industry forecast - 2033. <https://www.factmr.com/report/4532/non-alcoholic-wine-market>
- Mangindaan D, Khoiruddin K, Wenten IG (2018) Beverage dealcoholization processes: Past, present, and future, Trends Food Sci. Tech. 71: 36–45. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.10.018>
- Pickering GJ (2010) Low- and reduced-alcohol wine: A review, J. Wine Res. 11(2): 129–144. <https://doi.org/10.1080/09571260020001575>
- Regulation (EU) 2021/2117, p. 270. (2021). Establishing a common organisation of the markets in agricultural products, (EU) No 1151/2012 on quality schemes for agricultural products and foodstuffs, (EU) No 251/2014 on the definition, description, presentation, labelling and the protection of geographical indications of aromatised wine products and (EU) No 228/2013 laying down specific measures for agriculture in the outermost regions of the Union. Official Journal of the European Union, 262–314. <http://data.europa.eu/eli/reg/2021/2117/oj>
- Regulation (EU) No 1308/2013 of the European Parliament and of the Council of 17 December 2013 establishing a common organisation of the markets in agricultural products and repealing Council Regulations (EEC) No 922/72, (EEC) No 234/79, (EC) No 1037/2001 and (EC) No 1234/2007. (n.d.). Retrieved January 23, 2023, from <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R1308&from=en/>
- Saliba AJ, Ovington LA, Moran CC (2013) Consumer demand for low-alcohol wine in an Australian sample, Int. J.

Wine Res. 5(1): 1–8. <https://doi.org/10.2147/IJWR.S41448>

Sam FE., Ma TZ, Salifu R, Wang J, Jiang YM, Zhang B, Han SY (2021) Techniques for dealcoholization of wines: Their impact on wine phenolic composition, volatile composition, and sensory characteristics, *Foods*, 10(10): 2498. <https://doi.org/10.3390/FOODS10102498>

3. Objectives

The overall objective of this PhD project is to investigate the effect of the dealcoholization process on the volatile and non-volatile profiles of wine and preserve product quality by combining processing, chemistry and sensory science and investigate innovative approaches for the valorization of its byproducts.

The doctoral thesis project can be divided into the following activities, summarized in the Gantt chart shown in [Table 1](#):

A1) Literature review on (i) Dealcoholized Wine: A Scoping Review of Volatile and Non-Volatile Profiles, Consumer Perception, and Health Benefits,

(ii) Mechanisms of the initial stage of non-enzymatic oxidation of wine: A mini review.

A2) Optimization and browning kinetics of model white wine as a function of ethanol, phenolics, metal (Iron and Copper) and SO₂ concentrations.

A3) Study the volatile and non-volatile profiles of commercial wines before and after the dealcoholization process using different techniques.

A4) Study the effects of packaging and storage temperature on the shelf-life of the dealcoholized wine.

A5) Understanding consumer acceptance and barriers to alcohol-free wine: Insights into quality perception and purchase motivations across demographics.

A6) Management strategies towards using by-products: Valorization of ethanol recovered from wine dealcoholization: quality assessment and its application in gin production.

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

Table 1. Gantt Chart for the research activities in the 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</i>																			
A2) <i>Pre-trials and optimization of experimental methods</i>																			
1) Optimization and browning kinetics of model white wine																			
2) Preparation of the publication																			
A3) <i>Dealcoholization of commercial wines</i>																			
1) Study the volatile and non-volatile profiles																			
2) Statistical analysis and preparation of the publication																			
A4) <i>Study the effects of packaging and storage temperature</i>																			
A5) <i>Understanding consumer acceptance and barriers to alcohol-free wine</i>																			
A6) <i>Management strategies towards using by-products</i>																			
A7) <i>Preparation of the publications and thesis</i>																			

4. Research advancement and main results

The research conducted in 2024–2025 has yielded interesting results, as presented in the following studies: (i) Exploring changes in browning kinetics, color, and antioxidants due to dealcoholization of wine (ii) Ethanol removal from commercial white, red and rosé wines using VD: Impact on quality (iii) Understanding consumer acceptance and barriers to alcohol-free wine (IV) Valorization of ethanol recovered from wine dealcoholization

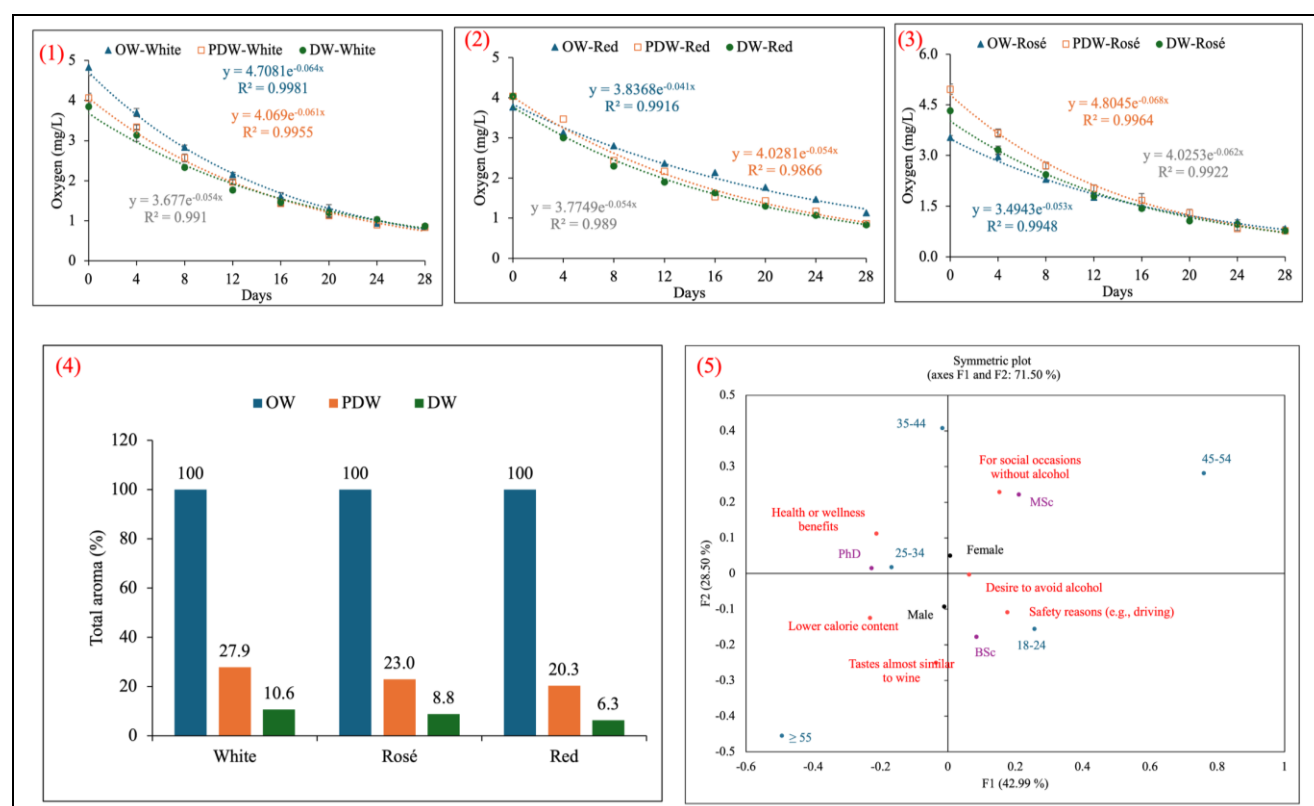
(i) This research investigates the kinetics of browning (A420 nm) and its correlation with ethanol reduction, alongside the effects on color stability, antioxidant capacity, phenolic profile, SO₂, and oxygen consumption during aging of three types of wines: white, red, and rosé wines. Results demonstrated that browning at 420 nm and color intensity follow zero-order kinetics. Dealcoholized (<0.5% v/v) white (18×10^{-4}) and rosé (31×10^{-4}) wines showing the highest browning rates, indicating a significant impact of alcohol removal. Similar trend was observed for color intensity. Red wine exhibited no significant changes in color parameters due to a short 28-day storage period. Phenolics content decreased linearly with storage time, fitting a zero-order model ($R^2 = 0.865$ to 0.986), and positively correlated with antioxidant capacity ($r = 0.709$ - 0.959 , $R^2 = 0.722$ - 0.999) in the three types of wine. Anthocyanin content decreased significantly in rosé and red wines, while white wines showed minimal changes due to initial very low anthocyanin content. Oxygen consumption followed first-order kinetics. Original red and rosé wines had lower oxygen consumption rates (OCRs) during aging compared to both partially and dealcoholized wines ([Fig 1-3](#)). For white wine, dealcoholized products exhibited the lowest OCRs ($0.054 \text{ mg O}_2/\text{L/day}$), while original white wines had the highest ($0.064 \text{ mg O}_2/\text{L/day}$). OCRs were positively correlated with free SO₂ ($r > 0.94$), total SO₂ ($r > 0.85$), total phenols ($r > 0.91$), antioxidant activity ($r > 0.80$), and pH ($r > 0.92$). Free and total SO₂ significantly decreased during storage, with reductions positively correlated with total phenols, antioxidant activity, oxygen, and pH.

(ii) The aim of this work is to produce partially dealcoholized wine (PDW) and dealcoholized (DW) white, rosé, and

red wines using vacuum distillation (VD), according with the alcohol limits set by regulatory standards. Specifically, this study investigates the influence of ethanol removal on basic physico-chemical parameters, color profiles, and volatile composition, along with an assessment of sensory attributes for each dealcoholized wine. Ethanol reduction significantly increased density, total extract, glycerin, total acidity, and volatile acidity, while decreasing pH. Color shifts ($\Delta E \geq 3$) were perceptible in DW wines, with red DW exhibiting the highest ΔE (24.33). Total aroma compounds declined progressively (72–80% loss in PDW; 89–94% in DW) (Fig 4). Sensory evaluation highlighted reductions in fresh floral (white/rosé), fresh fruity (red), sweetness (white/rosé), hotness, and body/fullness (rosé), while color intensity (red), cooked vegetable notes (white/rosé), and acidity (white/rosé) increased after ethanol removal. PDW and DW white/red wines retained original overall acceptability scores, whereas rosé acceptability decreased.

(iii) This study explores how well consumers can tell the difference between wines with different alcohol levels, how they rate their overall quality, and what factors influence their decision to choose alcohol-free wine based on age, gender, and education. A total of 59 people participated completing both taste tests and surveys. In the sensory tests, 88.14% of participants correctly identified the original wine (OW), while 76.27% could recognize the partially dealcoholized wine (PDW) and the alcohol-free wine (DW). As the alcohol content decreased, so did the perceived quality. The alcohol-free wine received the lowest average score (4.2/10), showing that alcohol plays an important role in flavor and overall enjoyment. The main reasons people chose alcohol-free wine were safety, health and wellness, and wanting to avoid alcohol (Fig 5). On the other hand, poor taste, higher price, and limited availability were the main reasons people avoided it. The results also showed that education level affected whether people chose alcohol-free wine for social situations, and age influenced whether health benefits were a motivation. However, there were no significant links between demographic factors and the reasons people avoided alcohol-free wine.

(IV) This study focuses on the valorization of ethanol recovered during the dealcoholization of wine by utilizing the ethanol-volatile rich permeate for gin production. The process not only supports circular economy principles by repurposing byproducts but also explores the potential of integrating membrane and distillation-based separation with spirit production. The recovered ethanol was subjected to distillation and infused with selected botanicals to produce gin, which was then evaluated for its physicochemical properties, volatile composition, and sensory characteristics. The quality assessment revealed that the produced gin demonstrated a distinct aromatic profile, indicating that ethanol from wine dealcoholization can serve as a sustainable and high-quality base for value-added alcoholic beverages.



Figures: (1-3) oxygen consumption rate (OCR) for white, red and rosé wines during storage at 35°C (4) Total aroma retained (%) in original wine (OW), partially dealcoholized wine (PDW), and dealcoholized wine (DW) for white, rosé, and red wines. (5) Correspondence analysis: Motivational factors influencing alcohol-free wine consumption across demographic groups.

5. List of publications produced as part of the doctoral activity

- Kumar Y, Cassano A, Conidi C, Gottardi D, Ricci A, Parpinello GP, Versari A. (2025a) Evaluation of physicochemical characteristics, color and volatile profile of low alcohol beverage based on concentrated white wine produced by NF and RO membranes, Sep. Purif. Technol. 132847. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2025.132847>
- Kumar Y, Cassano A, Conidi C, Gottardi D, Ricci A, Parpinello GP, Versari A (2025b) White wine dealcoholization by osmotic distillation: An experimental study and impact on key quality parameters, J. Food Eng. 391: 112456. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2024.112456>
- Kumar Y, Cassano A, Conidi C, Ricci A, Parpinello GP, Versari A (2024) Evaluating membrane behavior to ethanol-water mixtures and wine: A comparative investigation, LWT 201: 116228. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116228>
- Kumar Y, Italiano L, Schmitt M, Ricci A, Parpinello GP, Versari A (2024, November 18) Exploring changes in browning kinetics, color, and antioxidants due to dealcoholization of wine. OIV 2024. 45th World Congress of Vine and Wine. <https://doi.org/10.58233/40d2ppLX>
- Italiano L, Kumar Y, Matthias S, Christmann M (2024) Evaluation of dialysis membrane efficiency in wine dealcoholisation process. 45th World Congress of Vine and Wine. <https://doi.org/10.58233/XIFuepQT>
- Kumar Y, Ricci A, Parpinello GP, Versari A (2024) Dealcoholized Wine: A Scoping Review of Volatile and Non-Volatile Profiles, Consumer Perception, and Health Benefits, Food Bioprocess Technol. 17:3525–3545. <https://doi.org/10.1007/s11947-024-03336-w>
- Kumar Y, Ricci A, Wang G, Parpinello, GP, Versari A (2024) The Effect of Ethanol, SO₂, and Transition Metals on Browning Kinetics in Low- and No-Alcohol Model Wine, J. Food Biochem. 2024(1): 2318470. <https://doi.org/10.1155/2024/2318470>
- Wang G, Kumar Y (2024) Mechanisms of the initial stage of non-enzymatic oxidation of wine: A mini review, J. Food Sci. 89: 2530-2545. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.17038>
- Kumar Y, Ricci A, Parpinello GP, Versari A (2025) Understanding Consumer Acceptance and Barriers to Alcohol-Free Wine: Insights into Quality Perception and Purchase Motivations Across Demographics, Int. J. Gastron. Food Sci. (submitted).
- Kumar Y, Italiano L, Schmitt M, Ricci A, Parpinello GP, Versari A (2025) Dealcoholization of wine by vacuum distillation: Volatile and non-volatile profile, and sensory analysis, Food Chem. (submitted).

Messa a punto di un coating attivo bio-based per cartone ondulato ad azione antimicrobica

Joel Armando Njieukam (email: joelarmando.njieuk2@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: XXXVIII; Anno di frequenza: III

Tutor: Prof.ssa Rosalba Lanciotti; Co-tutor: Dott. Lorenzo Siroli e Claudio Dall'Agata

1. Stato dell'arte

Il cartone ondulato è ampiamente utilizzato nel packaging ortofrutticolo grazie alla sua versatilità, economicità e sostenibilità. Tuttavia, questo materiale presenta alcune limitazioni che possono compromettere la qualità e la shelf-life dei prodotti ortofrutticoli freschi, in particolare quando conservati ad un'elevata umidità relativa (López *et al.*, 2015). Una soluzione convenzionale prevede l'impiego di rivestimenti idrorepellenti a base di materiali plastici derivati da fonti fossili. Tuttavia, questi materiali sintetici presentano notevoli svantaggi in termini di impatto ambientale e sostenibilità economica. Inoltre, la loro origine non rinnovabile ne rende l'utilizzo insostenibile nel lungo termine. Per questo motivo, negli ultimi decenni, la ricerca si è orientata verso materiali rinnovabili, biodegradabili e funzionalizzabili, tra cui spiccano i biopolimeri. Tra i biomateriali, la cellulosa di origine microbica, prodotta principalmente da batteri acetici (ad es. *Komagataeibacter xylinus*), ha suscitato grande interesse grazie alle sue eccellenti e peculiari proprietà fisico-chimiche, all'abbondanza in natura e alla sostenibilità ambientale (Jozala *et al.*, 2015). Queste caratteristiche ne hanno favorito l'applicazione in diversi settori industriali, incluso quello del food packaging (Yanti *et al.*, 2021). Tuttavia, l'elevato costo di produzione, le rese in cellulosa non sempre elevate e l'assenza di proprietà funzionali quali attività antimicrobiche o antiossidanti ne ostacolano notevolmente l'espansione. Sebbene siano stati fatti tanti studi sullo sviluppo di nuove strategie per una produzione più efficiente e sostenibile di cellulosa, ulteriori ricerche sono necessarie al fine di ottimizzare le condizioni di produzione da parte di ceppi di batteri acetici appartenenti al genere *Komagataeibacter*. Per aumentare la sostenibilità della produzione di cellulosa batterica e favorirne l'impiego a livello industriale, sono necessari sforzi sostanziali che includono l'ottimizzazione dei protocolli di fermentazione, lo sviluppo di nuovi reattori, l'utilizzo di enzimi, la selezione di ceppi più performanti nonché l'utilizzo di substrati a basso costo (Jozala *et al.*, 2015). Inoltre, oltre alla sua naturale resistenza meccanica, la struttura altamente porosa della cellulosa batterica può essere sfruttata per integrare composti antimicrobici e/o antiossidanti, che vengono rilasciati gradualmente nel prodotto confezionato prolungandone la shelf-life e riducendo di conseguenza, gli sprechi alimentari (Almasi *et al.*, 2021). L'accoppiamento tra film di cellulosa batterica funzionalizzato e cartone ondulato potrebbe, quindi, rappresentare una soluzione innovativa per migliorare la conservazione di prodotti ortofrutticoli riducendo allo stesso tempo gli scarti alimentari.

In tale contesto, il presente progetto di ricerca si propone in primis di ottimizzare la produzione di cellulosa batterica da parte di ceppi appartenenti al genere *Komagataeibacter* spp. selezionati e cresciuti sia su substrati di crescita tradizionali che su substrati a basso costo quali sottoprodotti dell'industria alimentare e ottimizzarne i protocolli di produzione. Successivamente, il progetto intende sviluppare film a base di cellulosa batterica ottenuti a partire da sottoprodotti alimentari, arricchiti con agenti antimicrobici naturali e applicabili per la funzionalizzazione di cartone ondulato destinato al confezionamento di prodotti ortofrutticoli ad elevata deperibilità. L'obiettivo principale è pertanto proporre una soluzione sostenibile per l'imballaggio attivo, in linea con le crescenti esigenze del mercato, finalizzato all'estensione della shelf-life di prodotti ortofrutticoli durante il trasporto e lo stoccaggio. I risultati ottenuti potranno, quindi, aprire nuove prospettive per l'utilizzo di biopolimeri attivi nel settore dell'imballaggio di prodotti ortofrutticoli, contribuendo alla riduzione degli sprechi alimentari in accordo con gli obiettivi di sviluppo sostenibile dell'Agenda 2030 delle Nazioni Unite.

2. Bibliografia

- Almasi H, Oskouie MJ, Saleh A (2021) A review on techniques utilized for design of controlled release food active packaging, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 61(15): 2601-2621.
- Jozala AF, Pértile RAN, Dos Santos CA, Santos-Ebinuma V, Seckler MM, Gama FM, Pessoa AJ (2015) Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media, Appl. Microbiol. Biotechnol. 99:1181–1190.
- López GA, Ros CM, Buendía ML, Martínez HGB (2020) Active cardboard packaging with encapsulated essential oils for enhancing the shelf life of fruit and vegetables, Front. Nutr. 7: 559978.
- Yanti NA, Ahmad SW, Ramadhan LAN, Jamili, Muzuni, Walhidayah T, Mamangkey J (2021) Properties and application of edible modified bacterial cellulose film-based sago liquid waste as food packaging, Polymers 13(20):3570.

3. Sviluppo della ricerca

La ricerca è stata sviluppata secondo i seguenti punti principali, riepilogati anche nel diagramma riportato in Tabella 1:

- 1) Isolamento, da matrici alimentari (kombucha e aceto di vino), di ceppi di batteri acetici produttori di cellulosa, screening, caratterizzazione e selezione dei ceppi più performanti in termini di produzione di cellulosa batterica.
- 2) Produzione di film di cellulosa batterica su substrati sintetici e ottimizzazione delle rese in cellulosa variando diversi parametri culturali quali mezzo di coltura, fonte e concentrazione di carboidrati. Al fine di ridurre i costi totali di produzione, utilizzo di alcuni scarti e sottoprodotti dell'industria agroalimentare (melasso da barbabietola, siero di latte e trebbie di birra) come substrati alternativi naturali per la produzione di cellulosa. Definizione dei relativi protocolli di produzione.
- 3) Selezione di antimicrobici naturali tra cui oli essenziali ad elevata attività antimicrobica nei confronti di microrganismi degradativi e patogeni associati a prodotti ortofrutticoli.
- 4) Funzionalizzazione dei film di cellulosa: valutazione della modalità ottimale di integrazione di agenti antimicrobici selezionati nel film cellulosico prodotto, caratterizzazione del film funzionalizzato (proprietà chimico-fisiche, ottiche e meccaniche) e valutazione della cinetica di rilascio delle sostanze antimicrobiche.
- 5) Definizione del protocollo ottimale di accoppiamento del film di cellulosa con il cartone ondulato, caratterizzazione e valutazione dell'effetto del packaging attivo sulla shelf-life, sicurezza e proprietà organolettiche di un prodotto ortofrutticolo ad alto valore definito insieme al partner industriale "CONSORZIO BESTACK".

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 Ricerca bibliografica																			
A2 Produzione film di cellulosa batterica																			
1) Isolamento, screening e caratterizzazione batteri acetici produttori di cellulosa																			
2) Ottimizzazione performance e definizione protocolli di produzione																			
3) Produzione di cellulosa batterica su scarti e sottoprodotti alimentari																			
A3 Selezione di antimicrobici naturali per la funzionalizzazione di cellulosa batterica																			
1) Screening, caratterizzazione e selezione di antimicrobici naturali																			
A4 Funzionalizzazione e caratterizzazione della cellulosa batterica																			
1) Definizione di protocolli per l'integrazione di antimicrobici naturali																			
2) Caratterizzazione antimicrobica e tecnologica del film attivo																			
A5 Applicazione su cartone ondulato e valutazione dell'effetto su prodotto confezionato																			
1) Definizione del protocollo per il rivestimento di cartone ondulato con film bio-based																			
2) Valutazione dell'effetto del packaging attivo sulla shelf-life di prodotti confezionati																			
A6 Preparazione della tesi, di articoli, poster e presentazione orale																			

4. Principali risultati

La ricerca bibliografica (A1) è stata fondamentale durante tutto il percorso di dottorato, contribuendo in maniera determinante alla definizione accurata e razionale di ciascuna fase delle attività sperimentali previste.

Per quanto concerne le attività di ricerca relative all'obiettivo A2, a seguito di uno screening sulla produzione di cellulosa batterica da parte di 18 ceppi di batteri acetici isolati da kombucha, kefir e aceto, è stato possibile selezionare i cinque ceppi di batteri acetici più performanti, quali *Komagataeibacter xylinus* DSM 2004, *K. hansenii* 6DB, *K. rhaeticus* LM2, LM4, e SM1. Tali ceppi sono stati sottoposti a prove comparative in diverse condizioni di coltivazione al fine di individuare i parametri ottimali per la produzione di cellulosa. I ceppi selezionati sono stati, inizialmente, coltivati in cinque diversi terreni commerciali (HS, AA, GYC, GY e GET) e incubati per 10 giorni in condizioni statiche a 28 °C. Al termine dell'incubazione, le rese in cellulosa, il carico cellulare, il pH, l'accumulo di acido gluconico e il consumo di zuccheri sono stati determinati. I dati ottenuti hanno evidenziato che i terreni AA e GYC hanno garantito, per tutti i ceppi testati, le rese più elevate in cellulosa. Tale risultato è stato attribuito, per il terreno GYC, alla presenza di carbonato di calcio, in grado di tamponare l'acidificazione del mezzo e favorendo così una maggiore sintesi di cellulosa. Nel caso del terreno AA, la presenza di acido acetico ed etanolo ha fornito fonti di carbonio supplementari, stimolando la canalizzazione del glucosio verso la biosintesi della cellulosa. Anche nel terreno GY sono state registrate rese soddisfacenti, sebbene la rapida diminuzione del pH abbia limitato le performance dei ceppi considerati. In generale, è stata osservata una correlazione positiva tra l'accumulo di acido gluconico e la diminuzione del pH, mentre è emersa una correlazione negativa tra l'accumulo di acidi organici e la resa in cellulosa. Successivamente si è proceduto a testare l'effetto di diverse fonti di carbonio (glucosio, mannitolo, fruttosio, saccarosio, lattosio e glicerolo) e loro concentrazioni (1, 2, 3 e 5% p/v), utilizzando come base di crescita un terreno minimale, con l'obiettivo di massimizzare le rese in cellulosa in condizioni statiche da parte dei ceppi selezionati. Tutti i ceppi si sono dimostrati in grado di sviluppare e produrre cellulosa, utilizzando le diverse fonti di carbonio, seppur con rese differenziate. L'analisi dei dati ha confermato che la resa in cellulosa è influenzata in maniera significativa dal ceppo batterico utilizzato, nonché dalla natura e dalla concentrazione della fonte di carbonio impiegata. Tuttavia, le rese più elevate sono state osservate con concentrazioni zuccherine del 3% e 5%, utilizzando il

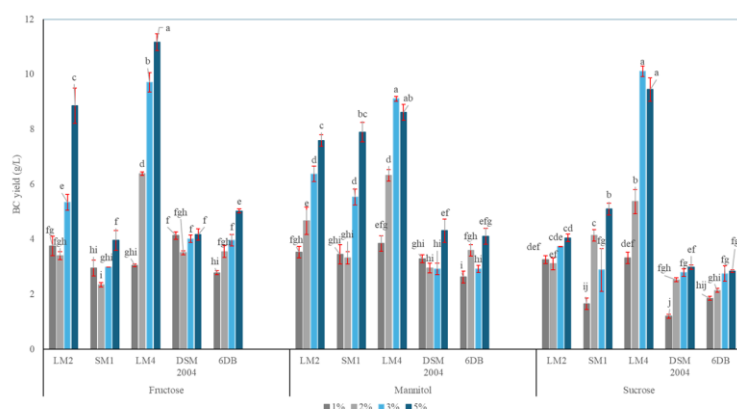
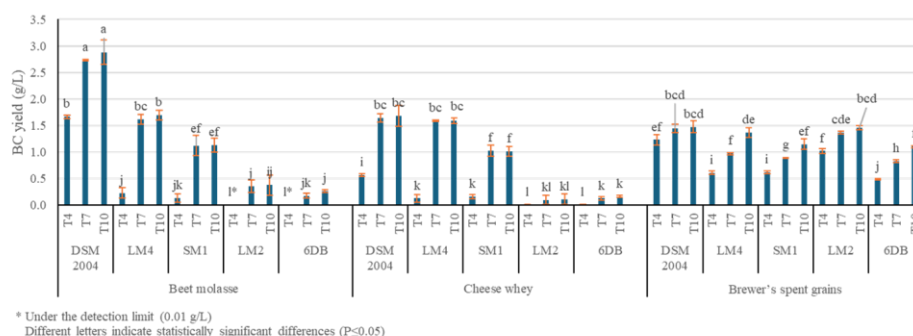


Figura 1: Resa in cellulosa batterica (g/L) ottenuta dai 5 ceppi di batteri acetici selezionati, su terreno sintetico con diversi tipi e concentrazioni di zucchero

cinque ceppi dei batteri acetici selezionati, di sviluppare e produrre cellulosa su differenti sottoprodotti dell'industria agroalimentare utilizzati come substrati alternativi e a basso costo (melasso, trebbie e siero) e senza addizione di ulteriori nutrienti. Tutti i ceppi si sono dimostrati in grado di sviluppare e produrre cellulosa anche su substrati naturali, con *K. xylinus* DSM 2004 e *K. rhaeticus* LM4 che hanno mostrato le performance migliori. In particolare, *K. xylinus* DSM 2004 ha raggiunto una resa massima di 3 g/L a seguito di crescita su terreno a base di melasso dopo 10 giorni di incubazione a 28 °C. I substrati siero e melasso si sono rivelati i più selettivi, in quanto solo i ceppi DSM 2004, LM4 e SM1 hanno mostrato una resa in cellulosa significativa su tali terreni di coltura (Figura 2). L'ottimizzazione del processo produttivo, ottenuta mediante l'impiego di una soluzione tampone a base di fosfato di sodio per il controllo del pH e l'integrazione del terreno con estratto di lievito (0,5% p/v), ha determinato un incremento significativo delle rese in cellulosa. In particolare, l'utilizzo del terreno di coltura ottimizzato (a base di melasso) ha consentito un aumento delle rese in cellulosa di almeno quattro volte rispetto alle condizioni non ottimizzate.

Le attività relative al punto A.3 hanno riguardato lo screening, la caratterizzazione e la selezione di agenti antimicrobici naturali organoletticamente con prodotti ortofrutticoli. I componenti di oli essenziali quali citrale, esanale ed E-2-esenale hanno dimostrato buone proprietà antimicrobiche nei confronti di alcuni microrganismi patogeni (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis*) e degradativi (*Pseudomonas spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*) associati a prodotti ortofrutticoli. L'ampio spettro d'azione antimicrobica di questi composti unitamente alla loro compatibilità con i prodotti ortofrutticoli, li rende candidati ideali per applicazioni nel campo della conservazione post-raccolta di frutta e verdura. In particolare, essendo costituenti naturali di oli essenziali e aromi già presenti nelle matrici vegetali, il loro impiego garantisce sicurezza d'uso e minimizza eventuali rischi di alterazioni organolettiche indesiderate. Pertanto, tali molecole sono state selezionate per la funzionalizzazione dei film di cellulosa. Prove preliminari per l'integrazione di tali composti bioattivi in film di cellulosa sono state effettuate valutando diverse modalità di attivazione quali immersione e dispersione superficiale della soluzione antimicrobica, nonché variando le concentrazioni dei principi attivi. I film attivati hanno mostrato, in test *in vitro*, un'efficace attività inibitoria nei confronti di patogeni alimentari quali *E. coli* e *L. monocytogenes*. Inoltre, la valutazione delle cinetiche di rilascio delle molecole attive a seguito di stoccaggio a 8°C ha permesso di rilevare la loro persistenza nel film sino a oltre 10 giorni di conservazione.

Le attività riguardanti il punto A.4, invece, sono in svolgimento nell'ambito del periodo di ricerca all'estero presso l'università di San Paolo (USP) in Brasile. In particolare, sono state già condotte analisi per studiare le proprietà chimico-fisiche, ottiche e meccaniche di biopolimeri prodotti dai due ceppi più performanti (DSM 2004 e LM4) su terreni di coltura naturali. L'analisi del colore ha evidenziato un'elevata luminosità (valori di $L^* > 80$) e una ridotta brillantezza nella maggior parte dei campioni. I valori di a^* erano negativi (colori verdi) mentre quelli di b^* erano compresi tra 2 e 10 (colore giallastro). Tuttavia, è stata osservata una differenza statisticamente significativa ($p > 0,05$) tra i diversi campioni, per quanto riguarda i valori di dE^* . La spettroscopia UV-Vis (200–800 nm) ha mostrato variazioni nell'opacità, con i film prodotti in terreno a base di melasso da DSM 2004 e su terreno a base di trebbie da LM4 meno trasparenti, mentre il film prodotto da LM4 su terreno a base di melasso ha presentato alta trasparenza. I valori di permeabilità al vapore acqueo (WVP) di tutti i film sono risultati bassi e compresi tra $1,25 \times 10^{-5}$ e $4,58 \times$



* Under the detection limit (0.01 g/L)
Different letters indicate statistically significant differences ($P \leq 0.05$)

Figure 2: Rese in cellulosa batterica (g/L) ottenute dai ceppi di batteri acetici DSM 2004 LM4, SM1, LM2, e 6DB su melasso, siero e trebbie.

10^{-5} g.mm / kPa.h.m². Tale proprietà barriera al vapor d'acqua è fondamentale per i film di cellulosa in quanto può prolungare la shelf-life del prodotto confezionato, essendo il deterioramento fisico-chimico e microbiologico, fortemente influenzato dai livelli di umidità all'interno della confezione. Parallelamente, i vari film hanno dimostrato un'eccellente capacità di assorbimento dell'acqua, trattenendo più del doppio del loro peso confermando la natura igroscopica della cellulosa batterica. Tale comportamento è riconducibile alla struttura fibrosa e all'elevata porosità di questi biopolimeri, proprietà che favoriscono l'intrappolamento fisico delle molecole d'acqua. Inoltre, la ricca presenza di gruppi funzionali idrossili favorisce l'interazione chimica con molecole d'acqua. A tale proposito, la misurazione dell'angolo di contatto ha rivelato un comportamento idrofilico nel campione di film di cellulosa prodotto dal ceppo LM4 su melasso, mentre, inaspettatamente, il film ottenuto dal ceppo DSM 2004 sullo stesso substrato, ha presentato proprietà idrofobiche. Tale differenza potrebbe essere attribuita a variazioni nel grado di cristallinità e nelle proprietà morfologiche superficiali (rugosità superficiale), possibilmente associati alla distribuzione della matrice polimerica in quanto potrebbe intrappolare sacche d'aria, creando un'interfaccia solido-aria.

L'analisi della struttura chimica tramite FTIR ha evidenziato una buona uniformità nei profili spettrali di tutti i campioni (simili picchi ma area diverse) e ha confermato la classica struttura della cellulosa batterica. In particolare, un picco intenso nella regione 3332-3344 cm⁻¹ corrispondente allo stretching OH (gruppo funzionale idrossile) e un altro a 2900-2910 cm⁻¹ dovuto allo stretching C-H. Inoltre, sono stati osservati diversi picchi tipici della cellulosa batterica nella regione 1745-1426 cm⁻¹, attribuibili alla deformazione H-O-H delle molecole d'acqua.

Il picco a 1646 cm⁻¹ indica la presenza del gruppo carbonilico (C=O) nella cellulosa batterica. Sono stati inoltre rilevati due picchi dovuti rispettivamente allo stretching asimmetrico C-O e C-O-C e allo stretching simmetrico, nelle regioni di 1161 cm⁻¹ e 1054-1028 cm⁻¹, caratteristici della cellulosa batterica. L'analisi diffrattometrica a raggi X è stata utilizzata per studiare le caratteristiche strutturali dei film di cellulosa e quindi, determinare il contenuto cristallino e amorfo dei vari campioni. Il profilo di diffrazione dei raggi X ha rivelato differenze nella cristallinità, con la più alta osservata nella cellulosa prodotta da DSM 2004 su melasso (**Figura 3**). I picchi di diffrazione a 14,1°-15,5° e 22,7° corrispondono rispettivamente ai piani cristallografici tipici della cellulosa batterica di tipo I. Le proprietà meccaniche, invece, dei film di cellulosa sono state investigate mediante test di trazione unilaterale. I risultati hanno mostrato una variabilità significativa nello spessore (10,0-39,2 µm), influenzato sia dalla fonte di carbonio che dal ceppo batterico. I test meccanici hanno indicato che la cellulosa prodotta da DSM 2004 su melasso ha registrato la più alta resistenza alla trazione (127,546 MPa), sebbene tutti i campioni abbiano mostrato una bassa elasticità e di conseguenza, una bassa elongazione alla rottura (0,69-6,20%).

I risultati ottenuti hanno evidenziato come la modifica delle proprietà superficiali dei film potrebbe migliorare le performance di questi biomateriali. Al fine di migliorare ulteriormente la funzionalità dei biomateriali ottenuti nell'ultima fase della mia ricerca verranno valutati diversi trattamenti quali, H₂O₂, O₃, liquidi ionici, solventi eutettici, plasma che dovrebbero migliorare l'assorbimento di oli essenziali o di suoi componenti.

Dopo funzionalizzazione dei film di cellulosa, questi ultimi verranno caratterizzati e la cinetica di rilascio delle sostanze attive verrà determinata. Sulla base dei risultati ottenuti, si procederà con l'accoppiamento del film funzionalizzato al cartone ondulato e alla valutazione della shelf-life di piccoli frutti su scala di laboratorio (A5).

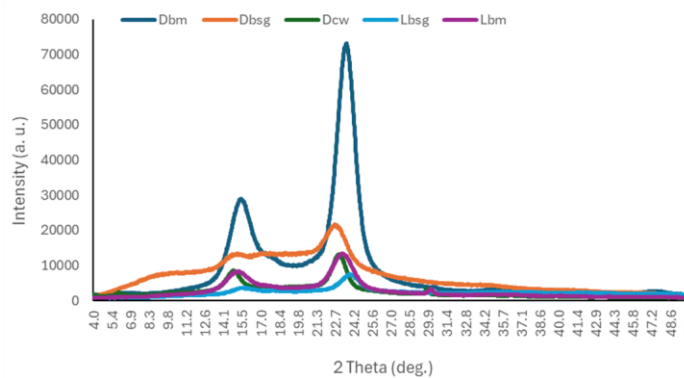


Figura 3: Diffrazione ai raggi X dei film di cellulosa prodotti dai ceppi batterici DSM e LM4 su melasso, trebbie e siero

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

- Ciccone M, Khan MR, Hernandez JBM, Njieukam JA, Siroli L, Gottardi D, Lanciotti R, Rocculi P, Patrignani F (2024) Release of Biopolymers from *Saccharomyces cerevisiae* Biomass Through Thermal and Non-Thermal Technologies, *Microorganisms* 12(12): 2596.
- Njieukam JA (2023) Development of an active bio-based coating for corrugated cardboard with waterproofing and antimicrobial properties. Proc. of the 27th Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science, Technology and Biotechnology, Portici (Italy), 13-15 September 2023, pp. 168-169.
- Njieukam JA, Ciccone M, Gottardi D, Ricci A, Parpinello GP, Siroli L, Lanciotti R, Patrignani F (2024) Microbiological, Functional, and Chemico-Physical Characterization of Artisanal Kombucha: An Interesting Reservoir of Microbial Diversity, *Foods* 13: 1947.
- Njieukam JA (2024) Development of an active bio-based coating for corrugated cardboard with waterproofing and antimicrobial properties. Proc. of the 28th Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science, Technology and Biotechnology, Catania (Italy), 18-20 September, pp. 325-327.

Impatto dei fattori di processo e dei sottoprodotti agro-alimentari sulla stabilità ossidativa e chimico-fisica di oleogel

Giulia Salvatori (email: giulia.salvatori5@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: XXXVIII; Anno di frequenza: III

Tutor: Prof.ssa Maria Teresa Rodriguez Estrada; Co-tutor: Dott. Dario Mercatante

1. Stato dell'arte

Negli ultimi anni, il crescente interesse per i lipidi strutturati come alternativa ai grassi *trans* e saturi ha orientato la ricerca verso lo studio di strutture lipidiche alternative, come gli oleogel (OG). Questi rappresentano una classe di gel in cui una fase organica liquida (come, ad esempio, un olio vegetale), viene immobilizzata e intrappolata all'interno di una rete tridimensionale termo-reversibile tramite l'impiego di organogelatori non-trigliceridici (Bascuas *et al.*, 2020). Ad oggi, gli OG, rappresentano una delle alternative più promettenti ai grassi solidi tradizionali, in quanto il loro processo di strutturazione non altera la composizione chimica né il valore nutrizionale dell'olio vegetale di partenza (Li *et al.*, 2022), contrariamente ad altri processi di strutturazione dei grassi (idrogenazione ed interesterificazione) ampiamente diffusi nell'industria alimentare. Gli oleogelatori, quando posti in determinate condizioni, subiscono trasformazioni fisico-chimiche che portano alla formazione di interazioni non covalenti come il legame a idrogeno, interazioni elettrostatiche e forze di Van der Waals che sono responsabili del meccanismo di formazione della rete tridimensionale, formando OG viscoelastici (comportamento *solid-like*) e pseudoplastici. Tra gli oleogelatori, le cere sono considerate molto promettenti in quanto possiedono un'elevata capacità strutturante anche a basse concentrazioni di impiego, portando alla formazione di reti cristalline; inoltre, risultano ampiamente diffuse, poco costose, edibili e possono essere impiegate facilmente con approcci di dispersione diretta in olio vegetale liquido per la produzione di OG (Silva *et al.*, 2021). Nella realizzazione di OG è altresì opportuno considerare che la forza del gel varia in funzione di diversi fattori ed è strettamente correlata al tipo ed alla concentrazione di oleogelatore/i impiegato/i per realizzarlo (Principato *et al.*, 2021). Tuttavia, alte concentrazioni di oleogelatore/i potrebbero influenzare negativamente le caratteristiche sensoriali degli OG e quindi del prodotto alimentare finale nel quale si intende impiegarli. Ne consegue che una delle sfide principali per la formulazione di tali strutture lipidiche consiste nel migliorare le proprietà meccaniche impiegando al contempo una concentrazione ridotta di agente strutturante. A tal proposito, le fibre alimentari sono ben note per essere eccezionali agenti addensanti in sistemi a base acquosa, nonché per la loro capacità di aumentare il profilo nutrizionale dei prodotti finali (Principato *et al.*, 2021). Ad oggi vi sono ancora pochi studi sull'impiego di fibre alimentari nella formulazione di OG, specialmente per dispersione diretta, come lo studio realizzato da Principato *et al.* (2021), che ha permesso di valutare l'impiego di fibra di bamboo nella realizzazione di OG. Dallo studio è emerso che l'inclusione di fibra di bamboo può migliorare la stabilità strutturale dei gel, anche in presenza di fluttuazioni di temperatura. Inoltre, mentre la maggior parte degli studi presenti in letteratura si concentra sulla velocità e sulle modalità di raffreddamento (statico o dinamico), l'influenza della temperatura, del tempo di mantenimento (*holding time*) e dell'ordine di aggiunta degli ingredienti sulla capacità di trattenere l'olio e sui parametri ossidativi degli oleogel non è ancora stata approfondita in modo dettagliato. Ne consegue che ad oggi vi sono ancora diverse sfide contrastanti la diffusione degli OG ed il loro utilizzo nell'industria alimentare (e.g. ridotte proprietà di *texture*, il rilascio di olio nel tempo, limitata stabilità ossidativa correlata alla composizione in acidi grassi dell'olio di partenza).

2. Bibliografia

- Bascuas S, Hernando I, Moraga G, Quiles A (2020) Structure and stability of edible oleogels prepared with different unsaturated oils and hydrocolloids, *Int. J. Food Sci. Technol.* 55(4): 1458-1467.
- Li L, Liu G, Bogojevic O, Pedersen JN, Guo Z (2022) Edible oleogels as solid fat alternatives: Composition and oleogelation mechanism implications, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 21(3): 2077-2104.
- Principato L, Carullo D, Bassani A, Gruppi A, Duserm Garrido G, Dordoni R, Spigno G (2021) Effect of dietary fiber and thermal conditions on rice bran wax-based structured edible oils, *Foods* 10(12): 3072.
- Silva TJ, Barrera-Arellano D, Ribeiro APB (2021) Oleogel-based emulsions: Concepts, structuring agents, and applications in food, *J. Food Sci.* 86(7): 2785-2801.

3. Sviluppo della ricerca

La ricerca è stata sviluppata secondo i seguenti punti principali:

- 1) Caratterizzazione dell'olio di girasole alto oleico (HOSO) in termini di profilo in acidi grassi e stato ossidativo iniziale tramite determinazione di composti volatili (VOCs), numero di perossidi (PV), dieni e trieni coniugati (K_{232} , K_{268} e K_{272}) e indice di stabilità ossidativa (OSI time, h).

- 2) Testati diversi rapporti tra cera di crusca di riso (RBW) (4,5%, 5,5% e 6,5%) e glicerolo monostearato (GMS) (1,5%, 2,5% e 3,5%) 2)
- 3) Valutazione della perdita di olio (*oil loss*, OL%), stabilità fisica e di parametri ossidativi quali composti volatili (VOCs), numero di perossidi (PV), dieni e trieni coniugati (K₂₃₂, K₂₆₈ e K₂₇₂) e indice di stabilità ossidativa (OSI time, h) di gel ottenuti applicando diversi rapporti tempo-temperatura e diversi ordini di aggiunta.
- 4) Caratterizzazione della capacità di trattenere olio (OHC) della fibra di bamboo (BF), di agrumi (CF) e trebbie di birra (BSG)
- 5) Formulazione di OG testando 3 BF, CF e BSG a diverse concentrazioni (1, 3 e 6%) e granulometrie (tal quale o TQ, 125, 90 e 63 µm) in presenza di RBW come oleogelatore.
- 6) Formulazione di OG impiegando le granulometrie migliori in presenza di RBW e glicerolo monostearato (GMS).

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)	Ricerca bibliografica																		
A2)	Caratterizzazione dell'olio di girasole alto oleico (HOSO)																		
A3)	Valutazione di diversi rapporti RBW-GMS																		
A4)	Applicazione di diversi rapporti tempo-temperatura nella produzione di oleogel																		
	1) Valutazione della OL% e stabilità fisica																		
	2) Valutazione dei VOCs, PV, K ₂₃₂ , K ₂₆₈ e K ₂₇₂ , OSI time degli OG ottenuti subito dopo la produzione																		
A5)	Formulazione di OG con fibre a diversa concentrazione e granulometria																		
	1) caratterizzazione OHC di BSG, BF e CF;																		
	2) Formulazione di OG impiegando 4 granulometrie (TQ, 125, 90 e 63 µm) di BF, CF e BSG a 3 concentrazioni (1, 3 e 6%)																		
	3) Valutazione della OL% e stabilità fisica dei gel ottenuti																		
	4) Formulazione di OG testando le migliori granulometrie (per ogni fibra) in presenza di GMS (1,5 e 2,5%)																		
A6)	Formulazione di OG a partire da oli arricchiti di carotenoidi																		
	1) Produzione di oli arricchiti tramite macerazione e applicazione di ultrasuoni a partire da bucce di pomodoro (sottoprodotto) liofilizzate																		
	2) Test di formulazione con RBW e GMS e RBW-GMS e BF, CF o BSG																		
A7)	Analisi reologiche, termiche e microscopiche degli OGs																		
A8)	Analisi dei principali fattori influenzanti le prestazioni delle cere vegetali e la capacità strutturante degli esteri della cera (Stage all'estero)																		
A9)	Scrittura e redazione della tesi di dottorato, di articoli scientifici e/o di poster e comunicazioni orali																		

4. Principali risultati

Il presente progetto di ricerca si propone di valutare l'impatto combinato dei parametri di processo e di formulazione sulla stabilità fisico-chimica e ossidativa degli OG, utilizzando sottoprodotti agro-alimentari (fibre vegetali pure o sottoprodotti tal quali) per ridurre la perdita di olio (OL%) e migliorare la stabilità fisica dei gel. Gli OG sono stati realizzati utilizzando HOSO, RBW e GMS. A livello di processo, sono state testate diverse condizioni di tempo-temperatura, quali bassa temperatura con lungo/breve *holding time* (LL e LS) ed alta temperatura con lungo/breve *holding time* (HS e HL), e diversi ordini di aggiunta (OA) identificati come A, B e C: in A, il GMS è stato aggiunto dopo la completa dissoluzione del RBW in olio; in B, RBW e GMS sono stati aggiunti insieme all'olio di partenza e portati al di sopra della loro temperatura di fusione; in C, RBW è stato aggiunto dopo la completa dissoluzione del GMS. Inoltre, sono stati valutati anche gli effetti dovuti all'aggiunta di fibre alimentari (BF o CF) o BSG sulla OL% e stabilità fisica dei gel, testando diverse concentrazioni (1%, 3%, 6%) e granulometrie (tal quale o TQ, 125, 90 e 63 µm). Le granulometrie più efficaci (BSG90, BF90, CF125 a 1% e BSG90, BF63, CF125 a 3%) sono state testate anche con diverse concentrazioni di GMS (1,5% e 2,5%) e diversi OA.

Valutazione diversi rapporti GMS-RBW

Allo scopo di valutare le possibili interazioni (positive o negative) tra due agenti strutturanti ed individuarne il rapporto migliore, sono state testate diverse concentrazioni di GMS (1,5, 2,5 e 3,5%) e RBW (4,5, 5,5 e 6,5%). 10 g di OG sono stati preparati per dispersione diretta di RBW e GMS, a 80°C in condizioni di continua agitazione, utilizzando una piastra scaldante munita di termoregolatore ed agitatore magnetico. Dopo la produzione, i campioni sono stati posti in vial da 20 mL, raffreddati a temperatura ambiente e successivamente posti a 4°C prima di ulteriori analisi. I dati sono

stati elaborati applicando ANOVA a due vie, al fine di valutare anche l'effetto del fattore di interazione tra le due variabili. Dai risultati riportati in **Tabella 2** è emerso che, la concentrazione di GMS sembra essere il fattore maggiormente incidente sulla OL% dei gel ottenuti, in quanto un effetto migliorativo significativo sulla OL% si otteneva aumentando di 1 punto la concentrazione di GMS piuttosto che di RBW.

Tabella 2. OL % di formulazioni con diverse % di RBW e GMS.

RBW (%)	GMS (%)	OL (%)
4,5	1,5	54,63±1,42 ^a
	2,5	39,66±1,64 ^c
	3,5	29,64±2,36 ^d
5,5	1,5	48,97±0,82 ^b
	2,5	39,32±1,33 ^c
	3,5	25,70±0,19 ^e
6,5	1,5	36,93±1,83 ^c
	2,5	30,74±0,19 ^d
	3,5	21,13±0,39 ^f

I risultati sono riportati come medie std dev. di 3 repliche indipendenti. a-f indicano differenze significative (test di Tukey; $p \leq 0,05$) tra i campioni.

Applicazione di diversi rapporti tempo-temperatura nella produzione di OG

Come descritto nel paragrafo precedente, gli OG sono stati preparati applicando 4 diverse condizioni tempo/temperatura: LS e LL: 80°C per 10 e 30 minuti di *holding time*; HS e HL: 90°C per 10 e 30 minuti di *holding time*. Per ogni rapporto sono stati testati 3 ordini di aggiunta tra RBW e GMS. Dei gel ottenuti è stata valutata la OL% ed i parametri ossidativi subito dopo la produzione. I risultati dei parametri ossidativi e OL% per ogni trattamento ed OA sono riportati in **Tabelle 3 e 4**.

Tabella 3. Valori medi relativi ai parametri di ossidazione in funzione del trattamento applicato (LL, LS, HL, HS)

	PV (mEq O ₂ /kg olio)	K ₂₃₂	K ₂₆₈	K ₂₇₂	OSI time (h)
LL A	6,25±0,01 ^{ABab}	2,47±0,21 ^{Db}	1,38±0,16 ^{CDab}	1,34±0,16 ^{BCDab}	8,88±0,18 ^{Bb}
LL B	6,09±0,14 ^{ABCab}	2,82±0,12 ^{CDab}	1,6±0,09 ^{BCDa}	1,54±0,08 ^{BCDa}	9,00±0,00 ^{ABb}
LL C	6,49±0,14 ^{Aa}	2,5±0,12 ^{Db}	1,31±0,09 ^{CDb}	1,25±0,10 ^{CDb}	9,63±0,04 ^{Ab}
Olio LL	5,78±0,22 ^b	3,06±0,18 ^a	0,76±0,02 ^c	0,71±0,02 ^c	13,2±0,42 ^a
LS A	4,56±0,04 ^{Fbc}	2,83±0,26 ^{Cda}	1,57±0,21 ^{BCDa}	1,51±0,20 ^{BCDa}	9,45±0,00 ^{ABb}
LS B	4,76±0,00 ^{Fa}	3,05±0,18 ^{BCDa}	1,83±0,14 ^{BCa}	1,8±0,16 ^{BCa}	9,15±0,21 ^{ABb}
LS C	4,75±0,00 ^{Fab}	2,95±0,18 ^{BCDa}	1,65±0,14 ^{BCDa}	1,6±0,17 ^{BCDa}	8,93±0,39 ^{Bb}
Olio LS	4,4±0,09 ^c	2,71±0,09 ^a	0,73±0,01 ^b	0,69±0,01 ^b	12,45±0,07 ^a
HL A	5,99±0,04 ^{BCa}	4,62±0,64 ^{Aa}	2,53±0,56 ^{Aa}	2,47±0,58 ^{Aa}	9,08±0,04 ^{ABb}
HL B	5,89±0,13 ^{BCDa}	3,59±0,07 ^{Bb}	2,02±0,09 ^{Aba}	1,96±0,08 ^{Aba}	9,4±0,07 ^{ABb}
HL C	5,73±0,09 ^{CDEa}	3,19±0,19 ^{BCbc}	1,79±0,19 ^{BCa}	1,73±0,20 ^{BCa}	9,28±0,11 ^{ABb}
Olio HL/HS	5,37±0,24 ^b	2,44±0,25 ^c	0,69±0,01 ^c	0,64±0,01 ^b	13,7±0,14 ^a
HS A	4,42±0,04 ^{Dea}	2,38±0,01 ^{Dc}	1,13±0,02 ^{Db}	1,04±0,03 ^{Db}	9,05±0,35 ^{AB}
HS B	5,54±0,03 ^{Ea}	2,66±0,09 ^{Cdc}	1,47±0,07 ^{BCDa}	1,37±0,08 ^{BCDa}	9,4±0,21 ^{AB}
HS C	5,35±0,00 ^{Ea}	2,46±0,17 ^{CDc}	1,32±0,18 ^{CDab}	1,26±0,17 ^{CDab}	9,43±0,11 ^{AB}
Olio HL/HS	5,37±0,24 ^b	2,44±0,25 ^c	0,69±0,01 ^c	0,64±0,01 ^c	13,7±0,14 ^a

I valori sono espressi come media ± deviazione standard. a-c indicano differenze significative tra ciascun trattamento e il rispettivo olio di partenza (ANOVA a una via, test di Tukey, $p < 0,05$). A-F indicano differenze significative tra gruppi (ANOVA a due vie, $p < 0,05$).

Tabella 4. Valori medi di OL (%) in funzione di trattamento e ordine di aggiunta

	OL (%)			
	LL	LS	HL	HS
A	48,72±0,41 ^b	51,29±1,77 ^{ab}	55,01±1,55 ^a	51,73±2,13 ^{ab}
B	50,03±0,60 ^b	51,03±0,36 ^b	51,09±2,61 ^b	51,02±0,77 ^b
C	50,17±0,56 ^b	50,65±0,14 ^b	52,36±0,86 ^{ab}	50,51±0,98 ^b

Le condizioni di trattamento sono state i fattori che hanno influenzato maggiormente l'OL%, con HL che ha mostrato il valore più alto (51,09-55,01%) e LL il più basso (48,72-50,17%). Tuttavia, l'interazione tra l'ordine di aggiunta e il trattamento ha influenzato l'ossidazione dei lipidi, evidenziando il ruolo dei parametri di formulazione e di oleogelazione sulla OL. LL-C ha mostrato il più alto indice di stabilità ossidativa (9,63 h), mentre LL-A, HL-A e HS-A hanno mostrato il più alto valore di perossidi (6,25, 5,99 e 5,54 mEq O₂/kg, rispettivamente).

I valori sono espressi come media ± deviazione standard. a-b indicano differenze significative tra ciascun trattamento e ordine di aggiunta (ANOVA a due vie, $p < 0,05$).

HL-A presentava anche i valori più elevati di K₂₃₂, K₂₆₈ e K₂₇₂. Dall'analisi dei VOCs, gli acidi carbossilici sono risultati la classe più abbondante negli OG (51,10-62,43%), seguiti da aldeidi (11,34-19,26%), alcoli (3,39-8,61%), chetoni (2,94-5,44%) e idrocarburi (0,38-2,84%).

Formulazione di OG con fibre a diversa concentrazione e granulometria

L'aggiunta di fibre ha influenzato l'OL% a seconda della concentrazione e della dimensione delle particelle. In particolare, BSG e BF sono stati i più efficaci all'1%, mentre BF e CF hanno ottenuto risultati migliori a concentrazioni più elevate (3-6%). In generale, la concentrazione del 6% ha comportato miglioramenti della OL% più elevati in CF rispetto a BF, mentre ha comportato un peggioramento notevole in BSG. In **Tabella 5** è riportata la OHC identificata per ogni fibra e granulometria; in **Tabelle 6 e 7** sono riportati i valori di OL% identificati per le granulometrie più performanti, ovvero BSG90, BF90, CF125 (a 1%) e BSG90, BF63, CF125 (a 3), sia in assenza che in presenza di GMS.

Tabella 5. OHC (%) per ogni fibra e granulometria

Granulometria (µm)	BSG	BF	CF
TQ	1,95±0,10 ^d	4,47±0,08 ^a	1,66±0,11 ^{ef}
125	1,95±0,04 ^d	3,39±0,06 ^b	1,58±0,09 ^f
90	1,81±0,09 ^{de}	4,36±0,08 ^a	1,62±0,05 ^{ef}
63	1,66±0,01 ^{ef}	3,35±0,02 ^c	1,64±0,09 ^{ef}

Tabella 6. OL (%) fibra e granulometria più performanti

1%		
BSG90	BF90	CF125
57,05±1,11 ^B	55,51±0,97 ^D	57,78±0,42 ^A
3%		
BSG90	BF63	CF125
56,63±0,22 ^C	53,17±0,31 ^F	53,9±0,64 ^E

I valori in Tabelle 5 e 6 sono espressi come media ± deviazione standard. a-f e A-F indicano differenze significative (ANOVA a due vie, $p < 0,05$) per ogni fibra (BSG, BF, CF) e granulometria, e tra le granulometrie più performanti impiegate diverse concentrazioni di impiego, rispettivamente.

Tabella 7. OL (%) fibra e granulometria più performanti a diverse concentrazioni di GMS e AO

		A	B	C
FIB 1 GMS 1.5%	BSG 90	62,66±1,54 ^{efg}	64,44±0,61 ^{cdef}	63,34±0,77 ^{defg}
	BF 90	61,76±0,43 ^{fghi}	61,93±0,91 ^{efgh}	61,73±0,40 ^{fghi}
	CF 125	64,43±0,68 ^{cdef}	64,65±0,59 ^{cde}	66,16±1,45 ^{bc}
FIB 3 GMS 1.5%	BSG 90	61,08±1,44 ^{ghijk}	64,29±2,42 ^{cdef}	62,35±1,25 ^{efg}
	BF 63	62,83±0,58 ^{efg}	57,29±0,99 ^{lm}	58,09±0,74 ^{lm}
	CF 125	66,13±0,38 ^{bc}	65,63±0,67 ^{cd}	65,80±0,91 ^{cd}
FIB 1 GMS 2.5%	BSG 90	61,17±0,78 ^{ghijk}	58,63±0,75 ^{klm}	59,08±0,82 ^{ijkl}
	BF 90	56,00±0,94 ^{mno}	56,96±0,22 ^{lmn}	57,81±0,62 ^{lm}
	CF 125	59,32±1,97 ^{hijkl}	58,90±0,74 ^{ijkl}	61,77±0,69 ^{fghi}
FIB 3 GMS 2.5%	BSG 90	61,40±0,45 ^{ghij}	69,29±0,39 ^a	68,68±0,21 ^{ab}
	BF 63	62,75±0,90 ^{efg}	62,00±1,26 ^{efgh}	61,35±1,36 ^{ghijk}
	CF 125	63,32±1,29 ^{defg}	62,80±0,50 ^{efg}	62,65±0,73 ^{efg}

I valori sono espressi come media ± deviazione standard. a-o indicano differenze significative (ANOVA a tre vie, $p < 0,05$) per ogni formulazione fibra-GMS, per le granulometrie più performanti testate (BSG90, BF90, BF63, CF125) e per ogni ordine di aggiunta (A, B, C).

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

Mercatante D, Santoni M, Nissen L, Spiros D, Salvatori G, D'Ambrosio GJ, Farneti A, Chiarello E, Casciano F, Picone G, Mouchtaropoulou E, Bordoni A, Danesi F, Argiriou A, Ayfantopoulou G, Gianotti A, Rodriguez-Estrada MT (2025) Nutritional, chemical and functional properties of wholegrain einkorn pasta through cooking and digestion: A comparative study with wholegrain durum wheat pasta, *Foods* 14(3): 370.

Poster

Salvatori G, Mercatante D, Rodriguez-Estrada MT "Optimization of oil binding capacity in oleogels: a preliminary study on the effects of production methods, cooling rate and GMS addition". Book of Abstracts del "2nd Berlin Symposium on Structured Lipid Phases, Berlino (Germania), 30 settembre-2 ottobre 2024, pp. 52.

Salvatori G, Mercatante D, Rodriguez-Estrada MT "Development of organogels containing bioactive compounds from agri-food by-products and their application for innovative and sustainable food formulation". Proc. of the 28th Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology, Catania (Italia), 18-20 settembre, pp. 356.

Salvatori G, Mercatante D, Sorrenti S, Albano I, Rodriguez-Estrada MT "Does defatting improve the oxidative stability of *Acheta domesticus* flour during accelerated shelf-life conditions?" Book of Abstracts del "5th International Symposium on Lipid Oxidation and Antioxidants", Bologna (Italia), 8-10 luglio 2024, pp.110.

Novel algorithms and software tools for LR-NMR applications in food science and technology

Giovanni Selva (email: giovanni.selva2@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: XXXVIII; Anno di frequenza: III

Tutor: Prof. F. Capozzi ; Co-tutor: Dr. S. Sykora

1. State of the art

Food technology impacts on all steps of food processing, starting from the production of foodstuffs, to their storage, various transformations, and even cooking. Each step must include proper concurrent quality assessment and safety controls.

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) is a very useful method to study and characterize several chemical and physical properties of the soft matter, including all kinds of materials and therefore also foodstuffs. The salient features of NMR include a large penetration depth, a totally non-invasive nature, the capability to discriminate even small variations in chemical composition as well as in molecular aggregation and mobility, an intrinsic quantitative response and good reproducibility. The drawbacks of NMR, in some contexts, are its relatively low sensitivity and the need to apply a relatively strong and very homogeneous magnetic field.

NMR comprises three distinct branches: relaxometry, spectroscopy, and imaging. Relaxometry studies the temporal evolution of nuclear magnetization and the ways it is affected by the molecular dynamics of the sample, spectroscopy is concerned mostly with highly resolved radio spectrum of a sample which reflects its chemical properties (molecular structure and composition), and imaging specializes in obtaining various kinds of visual images of the internal parts of a sample.

NMR have been widely used to solve many problems in the general area of food technology. In particular, high-resolution NMR spectroscopy (HR-NMR) became widely used to study the molecules found in food-related materials, usually focusing on the chemical assignments and quantification of various spectral peaks. This led to the development of a large number of useful spectroscopic HR-NMR applications. In general, however, such applications require very sophisticated equipment, in particular high-field, high-resolution superconducting magnets, and highly skilled operators. This makes them unsuitable for large scale deployment in industrial process applications.

In NMR relaxometry, the situation is significantly different. Low Resolution (LR) NMR equipment is more compact, lighter, and less expensive, features that make it suitable for small industrial and academic labs. While there exist hundreds of publications proposing various LR-NMR applications related to food quality and processing, relatively few of these potential applications were so far actually refined to the stage of practical assessment procedures.

Potential LR-NMR applications cover many recognizable categories, such as the distinction of sample components (muscle/fat, oil/water) or phases (solid/liquid) or inner states (ripe or damaged), melting/freezing processes (margarine melting curves), assessment of particle/droplet sizes in emulsions (milk, cream), ageing of materials (stocked food, cheese ripening), assessment of PDO products authenticity (eg. mozzarella di bufala).

Original Equipment Manufacturers (OEMs) produce LR-NMR instruments equipped with different hardware features from each other and with low software support to any particular application. In general, data formats and even the OEM data evaluation procedures do not follow any universal standard. In this situation application developers struggle and find difficult to guarantee reproducibility of the results. So, there is a great need for a uniform, vendor-agnostic software tool, one sufficiently sophisticated to allow an expert user, once he selects a potential application, to optimize it, to assess its precision and its reproducibility, to automate it, and to make it suitable for practical use in industrial environments.

2. References

- Mannina L, et al (2017) NMR Methodologies in Food Analysis. In *Analytical Chemistry: Developments, Applications and Challenges in Food Analysis*, Nova Science Publishers, pp. 103-156.
- Sobolev AP, et al (2017) NMR applications in Food Analysis. In *Analytical Chemistry: Developments, Applications and Challenges in Food Analysis*, Nova Science Publishers, pp. 157-254
- Kirtil E, Oztop MH (2016) 1H Nuclear Magnetic Resonance Relaxometry and Magnetic Resonance Imaging and Applications in Food Science and Processing. *Food Eng. Rev.* 8: 1–22.

3. Objectives

An application developer employs one or more LR-NMR instruments to acquire data and a software tool for the data analysis, in order to optimize and automate the whole process. The goal of this project is the development of high-level

software tools for the evaluation of LR-NMR data pertinent to possible applications in food technology and testing. This would provide either basic processing operations and support for specific applications evaluation tasks. The software will be mostly written in C++ and will be based on either innovative algorithms and on improvements of the existing ones, and it will be focused on obtaining quantitative information about the sample physical and chemical properties, structure, quality. Simulated data will be generated to test the algorithms correct operation; then, real data will be acquired to test the effective robustness and stability of the software routines. The quality of the results achieved during the PhD course will be verified through the feedback received from potential users, who will employ the alpha version of the application software to analyse food products selected for verification.

The doctoral project may be organised in the following activities, resumed in the Gantt chart shown in table 1:

A1) Preparation: bibliographic research about LR-NMR applications in food science and technology.

A2) Software development: research of the currently available software tools for NMR data evaluation, research of innovative algorithms and their implementation and testing.

A3) Experiments: data acquisition and sequence optimization.

A4) Application development: choice of one or two potential applications to optimise in terms of analysis workflow from the data acquisition to the final extrapolation of results.

A5) Writing and publishing: scientific papers, posters, final thesis and oral presentation.

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

Activities	Month	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
A1) Preparation																			
1) Bibliographic research																			
A2) Software development																			
1) Research of currently available software tools and algorithms																			
2) Software project and implementation																			
3) Testing algorithms																			
4) Applications development																			
A3) Experiments																			
1) Data acquisition																			
2) Data analysis																			
A5) Writing papers and thesis																			

4. Research progress and main results

During the starting period of this PhD, I did a bibliographical research on Low Resolution NMR applications in food science, which cover many categories, such as the distinction and quantification of different components or phases (solid/liquid, muscle/fat...), the monitoring of food ageing (stocked food) or ripening (cheese, ham...), and many more. The bibliographic research has the purpose to select some foodstuff on which to focus my studies. Cereals, meat, and even meat substitutes seems to be the most important food today and in the next future in the global industry market. In particular, NMR relaxometry seems to be a promising tool to contribute increasingly within the field of food processing, not only in the elucidation of dynamic changes during cooking, salting, storage, but also to evaluate the quality attributes.

In the while, the main activities focused on the development of a method to classify samples of Pecorino Sardo cheese through the evaluation of NMR relaxometry data. The classification is carried out in function of the ripening time. Also, we explored the possibility to discriminate between PDO (Protected Denomination of Origin) samples and those which are not prepared according to the procedural guidelines, which forbid the use of heat-treated milk. NMR relaxometry measurements are sensitive to those conditions, such as ripening or heat treatment, that affects the properties related to molecular dynamics. For this reason, it seems to be a perfect experimental technique for this purpose. The project has been proposed by the Italian Inspectorate for food frauds repression (ICQRF), which also provided us with some samples for the preliminary studies, consisting in 31 commercial cheeses and 3 reference samples, prepared in a laboratory under monitored conditions.

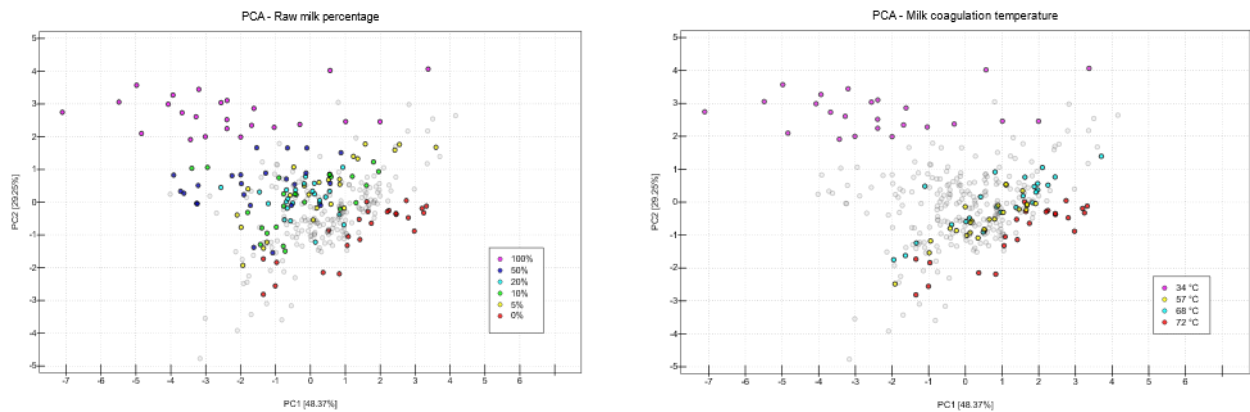
Samples have been cored and measured on a 20 MHz Bruker Minispec relaxometer, where the CPMG sequence has been executed in order to acquire the NMR transverse relaxation signal. Then, a software tool has been developed to evaluate the raw data, and to perform the Inverse Laplace Transform on the relaxation curves. The ILT is a fitting routine which carries out the distribution of the components relaxation times. We found that the discrete ILT, which consists in a multi-exponential fitting, returned results which are most sensitive to those properties respect whom we want to classify the samples. In fact, either the relaxation time and the intensity of the components obtained with the fitting describe the changing in the samples ripening time and milk coagulation temperature. Then, we followed a multivariate statistical approach to analyse the fitting parameters which led to successfully distinguish between fresh and ripened samples and to discriminate suspicious samples that may not be prepared according to the regulation.

Then, we moved to study in more detail the effect of different treatments in ewe milk cheese production, such as the milk coagulation temperature, the percentage of raw and pasteurized milk content, the crust searing, and the ripening

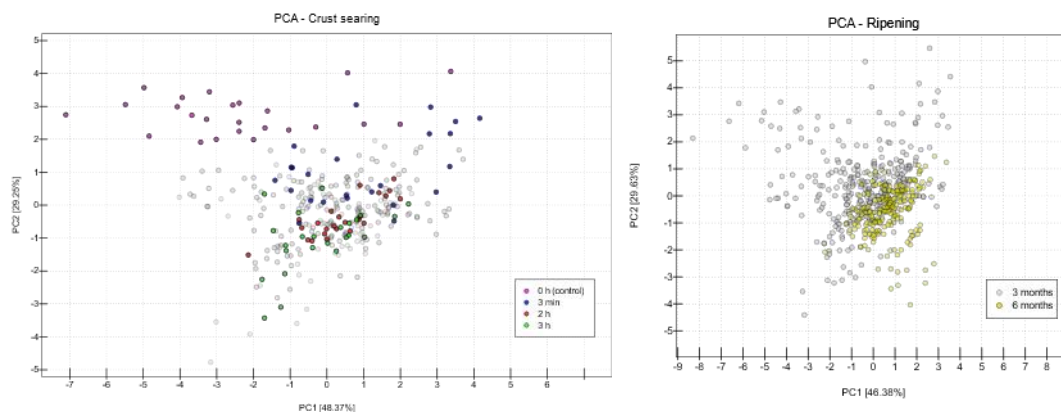
time. The ICQRF provided us again with more samples prepared under monitored conditions. The goal of this study was the exploration of the effect of these treatments on the relaxometric parameters and the formulation of a model able to classify the samples.

The experimental procedure followed the same steps as before, and we gathered the ILT parameters which revealed to be useful features for a multivariate statistical analysis. Principal Component Analysis results are shown in Figures 1-4. The projection of data in this latent space reveals a gradual movement of the samples in function of the treatment variation. The information relative to the treatment cannot be associated uniquely to one relaxometric parameter, but to a combination of all the parameters.

Figures 1-2 - Principal Component projection of the dataset. Raw milk percentage variation is highlighted in the left chart, from 0% (total pasteurized milk) to 100% (total raw milk). The right chart shows samples differentiating by the milk coagulation temperature.



Figures 3-4 - Principal Components projection of the data set. On the left, the crust searing time variation is highlighted. On the right, the different ripening time.

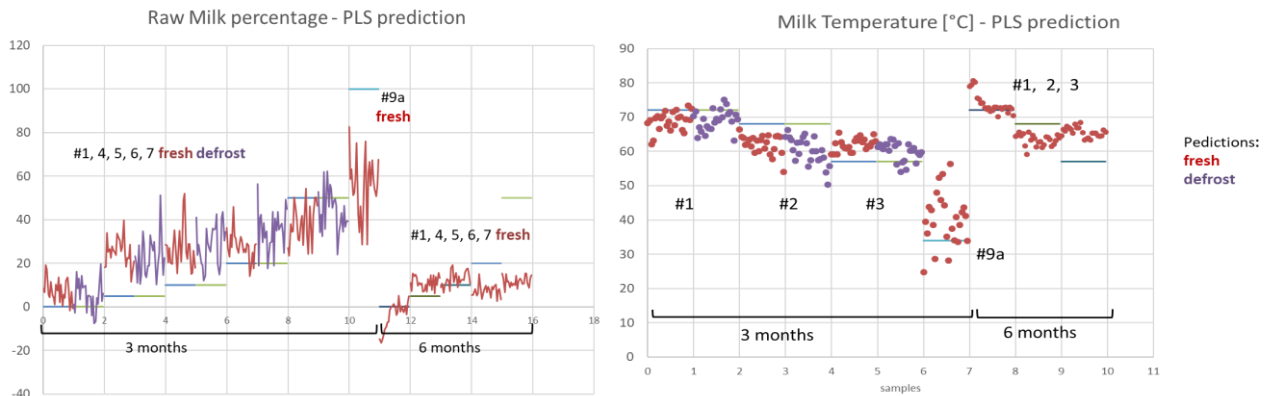


Then, we formulated a model applying the Partial Least Square (PLS) which provides the coefficients **B** for a linear relationship between the independent variable **X**, which in our case represents the relaxometric parameters, and the dependent variable **Y** (that is the treatment parameters): $Y = X * B + B_0$.

The formulation of a model is important, because once validated it could be used to classify the samples and adopted as an authenticity method. Our model revealed to be qualitatively good in the prediction of the milk coagulation temperature and the raw milk percentage, as one can see in Figures 5-6, though not very accurate, and not good in the prediction of the ripening time and the crust searing. The accuracy should be improved by formulating a non linear model. After all, we expect that the denaturation process, which is the physical cause affecting the relaxometric parameters, is not in linear relationship with the milk coagulation temperature, but is known to follow a sigmoid behaviour. Anyway, the linear model could be considered as the first approximation for this relationship.

Besides, I learned the programming language for writing new sequences to run in the instrument: this could be useful to explore the possibilities to optimize the experimental procedure. At last, I expect to publish an article on this study, whose writing is currently in progress.

Figures 5-6 - PLS prediction of raw milk percentage (on the left) and milk temperature (on the right) for some groups of samples. In both charts, the stepwise functions (horizontal lines) represents the experimental value, while the scattered points are the model prediction. The prediction is not accurate for all the samples, but is qualitatively correct since it preserves the same experimental trend.



At last, I developed a user-friendly software tool with graphical interface for the evaluation of sample data. It execute the whole evaluation, from the raw data pre-processing to the classification according to the PLS model, which predicts the sample treatment. This could be used in a laboratory for sample authentication purpose, once the method will be validated.

Improvement of quality and nutritional value of foods using natural compounds and mild biotechnologies

Fatemeh Shanbeh Zadeh (email: fatemeh.shanbehzade2@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: XXXVIII; Anno di frequenza: III

Tutor: Professor Lucia Vannini; Co-tutor: Professor Fausto Gardini

1. State of the art

Conventional methods of prolonging food shelf life often involve thermal processing, which can degrade essential nutrients, or synthetic chemical preservatives, e.g., sodium hypochlorite (NaOCl) which is widely used to decontaminate fresh produce. These preservatives are increasingly viewed negatively by consumers. Despite its widespread use as a conventional chemical sanitizer in the food industry, NaOCl often leaves residual free chlorine and generates disinfection by-products (DBPs), such as trihalomethanes and haloacetic acids. These DBPs have been linked to cytotoxic and carcinogenic effects in consumers (Zaman *et al.*, 2024; Slattery & Garvey, 2025). To address these concerns, researchers are exploring natural preservation strategies, including plant-based compounds such as essential oils and extracts, as well as environmentally friendly biotechnologies like biocontrol agents or natural antimicrobials accumulated through selective microbial fermentation. Non-thermal technologies also offer promising alternatives. Among these, Cold plasma (CP) represents a promising non-thermal approach for food, inactivating microorganisms while preserving the nutritional and sensory characteristics. Within cold atmospheric plasma technology, generation of plasma-activated water (PAW) has attracted attention for its possible application in the food industry, e.g. for the decontamination of fresh fruit and vegetables. PAW exhibits high oxidation-reduction potential and is rich in reactive oxygen and nitrogen species (RONS), enabling effective microbial inactivation without chemical additives. Research indicates that PAW can significantly extend the shelf life of fruits and vegetables by suppressing microbial proliferation and delaying oxidative processes. Additionally, it contributes to nutrient preservation, an outcome attributed to its reactive components' specific concentration and balance (Sojithamporn *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2025). Building on previous findings by Rotondo *et al.* (2025), who demonstrated that PAW becomes increasingly effective at microbial inactivation with more prolonged plasma exposure—due to elevated levels of reactive species, reduced pH, and increased oxidation-reduction potential—part of the present study explores the application of PAW for inactivation ready-to-eat shredded carrots which conducted in the previous studied done on the first year of PhD project. PAW's antimicrobial and physicochemical performance was evaluated across various treatment times and benchmarked against sodium hypochlorite (NaOCl).

The second objective centered on the project is the development of plant-based functional beverages. Recent literature underscores a sharp rise in demand for “clean-label” plant-based milk and dairy-free probiotic drinks. Fruit-juice/plant-milk hybrids have proven especially suitable carriers because juice supplies fermentable sugars and antioxidants, while cereal- or nut-based milk contributes buffering proteins and fiber that sustain probiotic counts above 10^7 CFU mL⁻¹ during chilled storage (D'Amico *et al.*, 2024; Di Stefano *et al.*, 2024). Among the best-documented strains for such matrices are *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, noted for high survival and immunomodulatory benefits in acidic fruit systems (Tan *et al.*, 2017), and *Lactiplantibacillus plantarum* DSM 25710, which thrives in soy- and oat-based beverages while delivering antioxidant and antipathogenic activities (Kingcha *et al.*, 2024). Parallel studies show that incorporating up-cycled pomegranate peels pulp elevates total polyphenols, enhances antioxidant capacity, and furnishes a prebiotic substrate that further boosts lactobacilli and bifidobacteria viability (O'Flaherty *et al.*, 2023). Building on these findings, the present study formulated a beverage consisting of 50% apple juice and 50% plant milk, to which pomegranate by-product was added, and which was inoculated with BB-12, DSM 25710, or a 1:1 co-culture. This functional drink simultaneously adds value to an agro-industrial waste stream while responding to consumer preferences for sustainable, gut-friendly, plant-based products. Thus, it aligns with the priorities of the circular economy and health promotion identified in recent reviews of next-generation functional beverages (Majumder & Panesar, 2024).

2. References

- D'Amico A, Buzzanca C, Pistorio E, Melilli MG, Di Stefano V (2024) Fruit juices as alternative to dairy products for probiotics' intake, *Beverages* 10:100.
- Di Stefano V, Melilli MG, D'Amico A, Pistorio E, Buzzanca C (2024) Plant-based fermented beverages: nutritional composition, health benefits and regulations, *Foods* 13:1126.
- Kingcha Y, Pumpuang L, Adunphatcharaphon S, Chantaraskha K, Santiyanont P (2024) Potential use of *Lactiplantibacillus plantarum* DSM 25710 as a functional starter culture in plant-based beverages, *Fermentation* 10:145.

- Majumder S, Panesar PS (2024) The golden era of fruit-juice-based probiotic beverages: challenges and opportunities, *Biochem. Eng. J.* 218:110935.
- O’Flaherty S, Cobian N, Barrangou R (2023) Impact of pomegranate by-product on probiotic viability and metabolism, *Microorganisms* 11:404.
- Rotondo S, Bianchi MM, Rossi G, Verdi A, Neri L (2025) Correlation between reactive species concentration and antimicrobial efficacy of plasma-activated water, *Food Microbiol.* 110:104012.
- Slattery RL, Garvey M (2025) Cytotoxicity and carcinogenic risk assessment of haloacetic acids in washed produce, *Food Chem. Toxicol.* 160:112345.
- Sojithamporn P, Leksakul N, Sawangrat W, Boonyawan M (2024) Impact of plasma-activated water on shelf life and nutrient retention of fresh produce. *LWT – Food Sci. Technol.* 165:114876.
- Tan M, Østergaard MV, Bahl MI, Michaelsen KF, Frøst MB, Moro G (2017) Administration of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in young children: a randomised controlled trial, *Front. Microbiol.* 8:1759.
- Zaman S, Khan A, Lee J, Smith P (2024) Formation of disinfection by-products during sodium hypochlorite washing of leafy vegetables, *J. Agric. Food Chem.* 72:1234–1242.
- Zhang Y, He Q, Xu Z, Shi L, Jiang P (2025) Reactive species dynamics in plasma-activated water and its application in food preservation, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 50:102345.

3. Objectives

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

- A1) **Review of the scientific literature** in the field of emerging non thermal technologies as alternatives to heat treatments, sanitizers and chemical preservatives in relation to different food products, and agri-food waste and by-products as a source of bioactive.
- A2) **Assessment of the potential of a selected non-thermal technology** in assuring quality and safety of target products.
- A3) **Functional characterization of the by-products:** selection of different by-products and testing for some bioactivities, e.g. antioxidant, prebiotic towards some commercial probiotic bacteria, antimicrobial/antifungal against foodborne pathogenic and spoilage microorganisms.
- A4) **By-products valorisation through microbial fermentation:** strains of yeasts and lactic acid bacteria will be used to ferment the by-products in order to enhance their bioactivities and use them as functional food ingredients.
- A5) **Definition of experimental design** to reformulate selected food products and recalibrate the processes by exploiting the most promising biotechnological solutions outlined by the previous activities. Also, the interactive effects with non-thermal treatments, e.g. cold plasma, high pressure, will be assessed to obtain foods with enhanced quality and safety features, prolonged shelf life, improved nutritional and functional features.
- A6) **Writing and Editing** of the PhD thesis, scientific papers and oral and/or poster communications.

Table 1. Gantt diagram for this Ph.D. thesis project

Attività	Mese	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
A1) <i>Literature review</i>																			
A2) <i>Non-thermal technology assessment</i>																			
1) Experimental Setup and Optimization																			
2) Microbiological Assessment and Quality Study																			
A3) <i>By-products characterisation</i>																			
A4) <i>By-products valorisation through microbial fermentation</i>																			
A5) <i>Food reformulation and process recalibration</i>																			
A6) <i>Research Dissemination and Documentation</i>																			

4. Research progress and main results

The aim of the first part of the PhD thesis is to develop biotechnological approaches to reformulate food products with new ingredients and recalibrate processes, especially heat treatments. The goal is to enhance the quality, safety, shelf life, nutritional value, organoleptic characteristics, and functional features of traditionally produced foods. Activities similar to those in the first year were conducted during the second year, focusing on PAW. The effectiveness of PAW as a sanitizing agent for ready-to-eat vegetables was investigated as an alternative to chemical sanitizers. In this set of experiments, shredded carrot samples inoculated with two strains of *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis, or *Listeria monocytogenes* were treated for 2, 5, 10, 20, or 30 minutes. Non-inoculated carrots were treated with PAW for 2, 10, or 20 minutes. To mirror industrial standards, a control group received a 2-minute wash in a 100 ppm sodium hypochlorite solution. The effects of the different treatments on the microbiological quality, carotenoids, and volatile compounds were detected immediately after the treatments and over a 13-day storage period at 4 °C.

The results demonstrated that a 2 Log CFU/g reduction was achieved for *E. coli* (both strains) and *Salmonella* (both strains), while *Listeria monocytogenes* was slightly more resistant, showing a 1 Log CFU/g reduction. Additional microbial profiling in non-inoculated samples, PAW treatment also decreased overall microbial populations

(Enterobacteriaceae, mesophilic and psychrotrophic bacteria, aerobic sporeformers, *Pseudomonas* spp., lactobacilli, yeasts, and Lactococcus) (fig. 1). Notably, even a 5-minute PAW treatment resulted in relevant microbial inactivation (approximately 1 Log CFU/g for mesophiles and over 2 Log CFU/g for psychrotrophic population), illustrating PAW's potential as a inactivation strategy for fresh produce.

For the physicochemical assessment using spectrophotometry to measure the total carotenoids, PAW significantly increased the carotenoids in shredded carrots, a particular effect observed after a 20-minute treatment. The PAW-washed carrots contained 19.2 mg of carotenoids per 100 g, an approximately 27% increase compared to the conventional wash (15.1 mg/100 g; $p < 0.05$) (fig. 2). These results suggest that 20 minutes is the optimal exposure time for PAW to maximize nutritional quality and ensure microbial safety in ready-to-eat carrots. Gas chromatography–mass spectrometry with solid-phase microextraction (GC-MS/SPME) was employed to profile the volatile terpene and phenolic fraction of shredded carrots following washes with NaOCl or PAW. NaOCl treatment led to a pronounced loss of key aroma-active terpenes and phenolic volatiles, likely through oxidative degradation. In contrast, PAW-washed carrots retained terpene and phenolic profiles essentially identical to the untreated control, demonstrating that PAW not only ensures microbial safety but also better preserves the natural flavour- and health-promoting compounds in shredded carrots.

The second part of study formulated twelve synbiotic beverages by combining equal volumes of apple-juice pulp and one of four milk bases—soy, oat, spelt, or whole dairy milk. Each beverage was inoculated with 1×10^7 CFU/mL of either *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, *Lactiplantibacillus plantarum* DSM 25710, or a 1:1 co-culture of both strains (totaling 1×10^7 CFU/mL). To enhance antioxidant capacity and supply prebiotic fiber, 0.7 g of finely milled pomegranate by-product was added per 100 mL. All formulations were aseptically bottled and stored at 4 °C for 54 days. At days 0, 1, 4, 7, 11, 14, 18, 25, 32, and 40. probiotic viability (via selective plate counts), physicochemical parameters (pH) and antioxidant activity (DPPH scavenging and total phenolic content) were assessed. This systematic evaluation enabled determination of how each milk matrix and probiotic regimen influenced microbial survival, functional stability, and overall quality in a pomegranate-enriched, plant-forward beverage. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 remained viable and stable for the first 18 days in all beverage formulations, both with and without pomegranate by-product. After day 18, BB-12 counts declined slightly in most samples; however, in the whole-milk + apple-juice + pomegranate formulation, cell numbers began to increase again after day 32, surpassing those of the identical formulation without pomegranate. *Lactiplantibacillus plantarum* DSM 25710 exhibited even greater stability, maintaining consistent viable counts through 40 days of refrigerated storage. In every milk matrix containing pomegranate by-product, DSM 25710 cell numbers showed a modest rebound after day 25, compared to their pomegranate-free counterparts. The 1:1 co-culture mirrored BB-12's behavior: stable viability through day 18, followed by a slight decline thereafter in both pomegranate-enriched and control beverages (fig. 3).

Total phenolic content markedly following the added of pomegranate by-product, reflecting its rich polyphenol profile. Over the course of refrigerated storage, most formulations exhibited a modest, gradual decline in phenolic levels—likely due to slow oxidation or interactions with other matrix components. Notably, the “soy-milk + apple-juice + pomegranate + BB-12” beverage maintained its elevated phenolic content with no significant decrease throughout the 40-day period, suggesting that this specific combination of plant matrix and probiotic strain helps stabilize and preserve these valuable antioxidants under cold storage conditions (fig. 4).

The DPPH assay revealed that all beverages enriched with pomegranate by-product exhibited substantially higher radical-scavenging activity compared to their pomegranate-free counterparts. During refrigerated storage, most formulations showed a gradual decline in antioxidant capacity; however, those containing BB-12 and pomegranate displayed a distinct trend. In these samples, DPPH scavenging activity continued to rise until approximately day 25—likely reflecting BB-12-mediated release or transformation of bound polyphenols—before slowly tapering off thereafter. This pattern suggests a synergistic interaction between the probiotic metabolism and pomegranate phenolics that transiently boosts antioxidant potential during mid-storage.

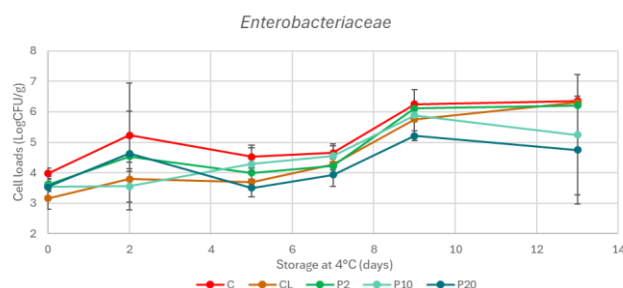


Figure 1: Changes over storage of *Enterobacteriaceae* surviving the different wash treatments of shredded carrots. (C) Dipping in tap water for 2 min. (CL) Washing with NaOCl for 2 min, (P) Washing with PAW for 2 min, (P10) Washing with PAW for 10 min, (P20) Washing with PAW for 20 min.

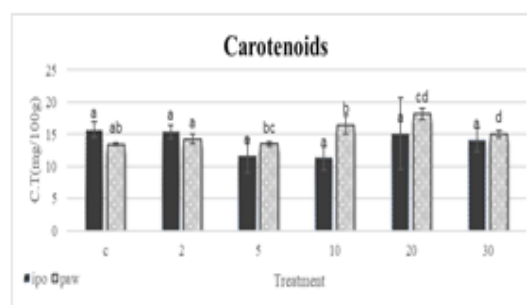


Figure 2: Total carotenoids in shredded carrots after washing with sodium hypochlorite for 2 minutes (IPO), or with plasma activated water (PAW). The letters “a,” “b,” “c,” “d” denote the results of post-hoc multiple comparisons (Tukey’s HSD) performed after a one-way ANOVA, ($p < 0.05$).

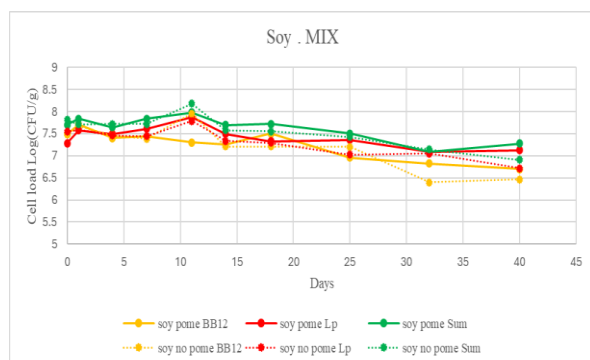


Figure 3: Cell counts of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (BB12) and *Lactiplantibacillus plantarum* DSM 25710 (Lp) (alone or as sum) in soy-based beverages. The base of all samples are 50% apple juice and 50% soy milk.

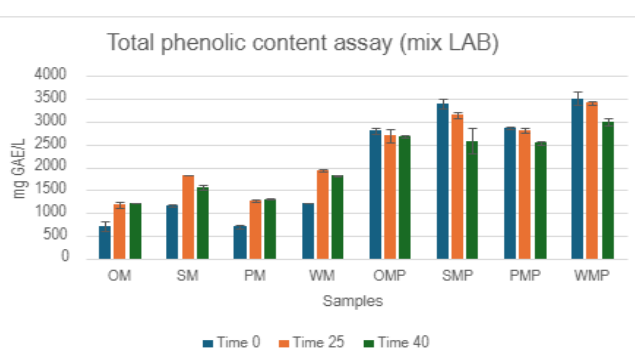


Figure 4: Total phenolic content of beverages with different formulations over refrigerated storage. (OM) oat milk+apple juice, (SM) soy milk+apple juice, (PM) spelt milk+apple juice, (WM) whole milk+apple juice, (OMP) oat milk+apple juice+pomegranate, (SMP) soy milk+apple juice+pomegranate, (PMP) spelt milk+apple juice+pomegranate, (WMP) whole milk+apple juice+pomegranate. All beverages were inoculated with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and *Lactiplantibacillus plantarum* (1:1 co-culture)

5. List of publications produced as part of the doctoral activities

Scientific Articles

- Tabanelli G, Montanari C, Gómez-Caravaca AM, Díaz-de-Cerio E, Verardo V, Zadeh FS, Vannini L, Gardini F, Barbieri F (2025) Microbiological safety and functional properties of a fermented nut-based product, *Foods* 13(19): 3095.
- Molina-Hernandez JB, Cellini B, Shanbeh Zadeh F, Vannini L, Rocculi P, Tappi S (2025) Inactivation of emerging opportunistic food borne pathogens *Cronobacter* spp. and *Arcobacter* spp. on fresh fruit and vegetable products: Effects of emerging chemical and physical methods in model and real food systems - A review. (*Under revision, Foods*)
- Abouelenein D, Gebremical GG, Tappi S, Cellini B, Zadeh FS, Mustafa AM, Caprioli G, Frolova N, Soboleva A, Frolov A, Vannini L, Rocculi P, Vittori S (2025) Impact of cold plasma treatment on shelf life and metabolite profiles of strawberries during storage (*Submitted, Innovative Food Science and Emerging Technologies*)

Conference proceedings

- Shanbeh Zadeh F, Cellini B, Gebremical GG, Molina Hernandez JB, Rocculi P, Tappi S, Gardini F, Romani S, Vannini L (2025) Innovative non-thermal technology to improve safety and quality in ready-to-eat vegetables, Book of Abstracts (Zbornik Apstrakata), 9th International Conference on Sustainable Postharvest and Food Technologies – INOPTeP 2025, Novi Sad: National Society of Processing and Energy in Agriculture, p. 36. (oral presentation).
- Cellini B, Tappi S, Shanbeh Zadeh F, Molina Hernandez JB, Dalla Rosa M, Rocculi P, Vannini L (2025) Cold plasma to treat ready-to-eat apples: an active solution against *Arcobacter* spp. and *Cronobacter* spp. contamination, Book of Abstracts (Zbornik Apstrakata), 9th International Conference on Sustainable Postharvest and Food Technologies – INOPTeP 2025, Novi Sad: National Society of Processing and Energy in Agriculture, p. 11. (poster)
- Shanbeh Zadeh F (2024) Improvement of quality and nutritional value of foods using natural compounds and mild biotechnologies. Proc. of the XXVII Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science, Technology and Biotechnology, Catania, Italy, pp. 363-5.
- Tappi S, Cellini B, Giordano E, Shanbeh Zadeh F, Molina Hernandez JB, Laurita R, Caprioli G, Vannini L, Tylewicz U, Rocculi P (2024) Cold plasma for the inactivation of emerging bacterial pathogens on fruit and vegetable products, Proc. of the 22nd World Congress of Food Science and Technology, Rimini, Italy, pp. 343-4. (poster)
- Cellini B, Giordano E, Shanbeh Zadeh F, Gardini F, Vannini L (2024) Formulation and characterisation of a functional beverage with pomegranate residues, Proc. of the 22nd World Congress of Food Science and Technology, Rimini, Italy, p. 459. (poster)
- Shanbeh Zadeh F, Drudi F, Giordano E, Laurita R, Capelli F, Gherardi M, Gardini F, Romani S, Vannini L (2024) Cold atmospheric plasma treatments for the decontamination of sliced carrots, Proc. of the 7th International Conference on FoodOmics, Cesena, Italy, pp. 179-81. (poster)
- Vannini L, Shanbeh Zadeh F, Cellini B, Gardini F (2023) Screening of microbial yeast and lactic acid bacterial cultures to improve quality and nutritional value of foods, Proc. of the 9th International Conference on Food Chemistry & Technology, Paris, France, pp. 89-90. (poster)
- Shanbeh Zadeh F (2023) Improvement of quality and nutritional value of foods using natural compounds and mild biotechnologies, Proc. of the XXVII Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science, Technology and Biotechnology, Portici, Naples, Italy. (poster)

Analysis of volatilome of virgin olive oils and flavoured oils: quality grade evaluation and study of modification during storage

Rosalba Tucci (rosalba.tucci2@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: XXXVIII; Anno di frequenza: III

Tutor: Prof.ssa Alessandra Bendini; Co-tutor: Dott.ssa Silvia Mingione, Dott. Enrico Casadei

1. State of the art

In the Mediterranean area, especially in Spain, Italy and Greece, olive oil represents one of the main food products with a world production of 2,511,000 tonnes expected for the 2022/23 olive oil campaign (DG AGRI, 2023). In the European Union (EU), virgin olive oils (VOOs) can be classified into three commercial categories, based on both physicochemical and sensory parameters, such as: extra virgin (EV), virgin (V) and lampante (L) (Reg. EU 2022/2104). Despite several modifications that occurred over the years, the official method for sensory evaluation still shows some weaknesses as it is time-consuming and, in case of a non-correct training of assessors, can be affected by not satisfactory reproducibility of results (Barbieri *et al.*, 2020). Therefore, the identification and quantification of volatile organic compounds (VOCs) in VOOs is of great importance to assess their quality. In fact, targeted and untargeted instrumental methods based on the analysis of these molecules can be considered an interesting tool to support the sensory analysis (Panel test) (Quintanilla-Casas *et al.*, 2020). Specifically, some VOCs have been proposed as markers to detect positive (e.g., fruity) and negative sensory attributes (defects) according to their concentrations (Valli *et al.*, 2020). For this purpose, targeted methods based on headspace solid phase microextraction (SPME) with the use of flame ionization detector (FID) or mass spectrometry (MS) are being recently validated (Casadei *et al.*, 2021; Aparicio-Ruiz *et al.*, 2022). Furthermore, rapid instrumental methods concerning techniques such as Headspace Gas Chromatography–Ion Mobility Spectrometry (HS-GC-IMS), Flash Gas Chromatography (FGC) and Proton Transfer Reaction–Mass Spectrometry (PTR-MS) can be also useful for this aim, permitting a fast pre-classification of samples and increasing the efficiency of quality control analyses (Barbieri *et al.*, 2020; Valli *et al.*, 2020; Taiti *et al.*, 2022). In recent years, the scientific community increased attention to the assessment of olive oil shelf life, given its importance for the olive oil bottling industry (Ferreiro *et al.*, 2025). According to current regulations, each bottle must indicate a “best before” date on the label, generally between 12 and 18 months from packaging, indicated by the producer or bottler under their own responsibility (Reg. EU 1169/2011). During this period, olive oils are required to maintain their chemical, physical, and organoleptic properties. Failure to comply with these quality standards is regulatory non-compliance, recognised as a food fraud (Martín-Torres *et al.*, 2023). The evaluation of olive oil shelf life is particularly challenging, as it depends on a wide range of variables that influence the kinetics of oxidative processes. Key factors include the maturity index of olives at the time of harvest, the extraction methods used, the degree of exposure to pro-oxidant agents (e.g., light and oxygen), and, most notably, the concentration of antioxidants. These compounds are known to play a crucial role in slow-down oxidative degradation (Mancebo-Campos *et al.*, 2022). The decomposition of hydroperoxides, primary intermediates formed during fatty acid oxidation, leads to the development of volatile compounds of neoformation, which are directly responsible for the onset of sensory defects (off-flavours) that result in a decline in oil quality and its potential commercial downgrading (Morales *et al.*, 2013). Consequently, different studies have employed headspace analysis associated by GC-IMS or FGC has provided new opportunities for rapid screening of olive oils (Damiani *et al.*, 2020). In parallel, SPME-GC-MS has been widely used to monitor changes in the volatile profile over time and to identify specific markers associated with oxidative degradation (Freitas *et al.*, 2024). Finally, in the global economic scenario of olive oil, flavoured oils are becoming increasingly popular. Consumers are attracted by their versatility of culinary use due to the possibility to convey a wide range of aromas to food preparations thanks to the use of different kinds of flavouring matrices such as herbs, spices, fruits, and vegetables (Baiano *et al.*, 2016). The addition of specific flavouring agents to olive oils, depending on the applied technology to produce the flavoured oil (co-extraction, contact and essential oils inclusion among others), affects the incorporation in the oil matrix of specific bioactive compounds with antioxidant and/or healthy and/or sensory properties. Consequently, analytical evaluation of flavoured oils, considering their compositional and sensory characteristics, is essential to verify the quality of the product and to study its performance during storage (Lamas *et al.*, 2022).

2. Bibliography

Agriculture and Rural Development (DG AGRI). DASHBOARD: OLIVE OIL, last update 17.03.2023: https://agriculture.ec.europa.eu/system/files/2023-04/olive-oil-dashboard_en.pdf
Aparicio-Ruiz R, Ortiz-Romero C, Casadei E, García-González DL, Servili M, Selvaggini R, Lacoste F, Escobessa J, Vichi S, Quintanilla-Casas B, Pierre-Alain G, Lucci P, Moret E, Valli E, Bendini A, Gallina Toschi T (2022) Collaborative peer validation of a harmonized SPME-GC-MS method for analysis of selected volatile compounds

in virgin olive oils, *Food Control* 135: 108756.

- Baiano A, Previtali M. A, Viggiani I, Varva G, Squeo G, Paradiso, V.M, Caponio F (2016) As oil blending affects physical, chemical, and sensory characteristics of flavoured olive oils, *Eur. Food Res. Technol.* 242: 1693-1708.
- Barbieri S, Brkić Bubola K, Bendini A, Bučar-Miklavčič M, Lacoste F, Tibet U, Winkelmann O, García-González DL, Gallina Toschi T (2020) Alignment and proficiency of virgin olive oil sensory panels: The OLEUM approach, *Foods* 9: 355.
- Barbieri S, Cevoli C, Bendini A, Quintanilla-Casas B, García-González DL, Gallina Toschi T (2020) Flash gas chromatography in tandem with chemometrics: A rapid screening tool for quality grades of virgin olive oils, *Foods* 9: 862.
- Casadei E, Valli E, Aparicio-Ruiz R, Ortiz-Romero C, García-González DL, Vichi S, Quintanilla-Casas B, Tres A, Bendini A, Gallina Toschi T (2021) Peer inter-laboratory validation study of a harmonized SPME-GC-FID method for the analysis of selected volatile compounds in virgin olive oils, *Food Control* 123: 107823.
- Damiani T, Cavanna D, Serani A, Dall'Asta C, Suman M. (2020) GC-IMS and FGC-Enose fingerprint as screening tools for revealing extra virgin olive oil blending with soft-refined olive oils: A feasibility study, *Microchem. J.* 159: 105374.
- European Union Commission. Commission Delegated Regulation (EU) 2022/2104 of 29 July 2022 supplementing Regulation (EU) No 1308/2013 of the European Parliament and of the Council as Regards Marketing Standards for Olive Oil, and Repealing Commission Regulation (EEC) No 2568/91 and Commission Implementing Regulation (EU) No 29/2012; European Union Commission: Brussels, Belgium, 2012.
- Ferreiro N, Veloso A.C, Pereira J.A, Rodrigues N, Peres AM (2025) Assessing the Shelf-Life of Olive Oil Under Different Storage Conditions: A Review of Predictive Models, *Food Eng. Rev.* 1: 19.
- Freitas F, Cabrita M.J, da Silva M.G. (2024) Early Identification of Olive Oil Defects throughout Shelf Life, *Separations* 11: 167.
- Lamas S, Rodrigues N, Peres A.M, Pereira J.A (2022) Flavoured and fortified olive oils - Pros and cons, *Trends Food Sci.* 124: 108-127.
- Morales M.T, Przybylski R (2013) Olive oil oxidation. In *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties*; Aparicio R., Harwood J (Eds), Springer: Boston, MA, USA, pp. 479-522.
- Martín-Torres S, Tello-Jiménez J.A, López-Blanco R, González-Casado A, Cuadros-Rodríguez L (2023) Multivariate stability monitoring and shelf-life models of deterioration of vegetable oils under real time ageing conditions– Extra virgin olive oil as a main case of study, *Food Packag. Shelf Life* 37: 101070.
- Quintanilla-Casas B, Marin M, Guardiola F, García-González D. L, Barbieri S, Bendini A, Gallina Toschi T, Vichi S, Tres A (2020) Supporting the sensory panel to grade virgin olive oils: An in-house-validated screening tool by volatile fingerprinting and chemometrics, *Foods* 9: 1509.
- Taiti C, Marone E, Fiorino P, Mancuso S (2022). The olive oil dilemma: To be or not to be EVOO? chemometric analysis to grade virgin olive oils using 792 fingerprints from PTR-ToF-MS, *Food Control* 135: 108817.
- Valli E, Panni F, Casadei E, Barbieri S, Cevoli C, Bendini A, García-González DL, Gallina Toschi T (2020) An HS-GC-IMS method for the quality classification of virgin olive oils as screening support for the panel test, *Foods* 9: 657.

3. Research Development

The following research activities, according to the Gantt chart shown in Table 1, are carried out:

- 1) Sampling: preparation, anonymisation, and shipment of oils to the involved laboratories.
- 2) Definition of instrumental and sensory protocols: setting up of analytical protocols for GC-IMS and sensory analysis to be applied in a shared modality by the five different laboratories.
- 3) Sensory and instrumental alignment tests: verification of the degree of analytical alignment of five GC-IMS instruments using specific prepared *ad-hoc* standards. The same analytical protocol has been applied by the five laboratories participating in the trial (A3.1); check of sensory alignment among the five panels participating in the trial by application of a specific decision tree scheme (A3.2).
- 4) Creation of sensory and instrumental datasets: the dataset will consist of at least 150 samples analysed by both sensory and instrumental analyses (GC-IMS).
- 5) Development of chemometric models: estimation models (EV vs V) will be built using the dataset (A4).
- 6) Shelf-life study: evaluation of the sensory characteristics and volatile profiles of selected samples (EV and V olive oils) monitored during the shelf-life (0, 6, 12 months) by SPME-GC-MS and sensory descriptive analysis.
- 7) Analysis of monovarietal extra virgin olive oils of *Nostrana di Brisighella* cultivar (obtained applying different agronomic and technological variables) during storage focusing on bioactive compounds.
- 8) Volatile and sensory analysis of flavoured oils: flavoured oils marketed by Olitalia company were selected; the monitoring of volatilome related to sensory characteristics by SPME-GC-MS and PTR-MS, is in progress.
- 9) Writing of research papers and final thesis.

Table 1. Gantt diagram related to this PhD project

Activity	Months	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
A1)	Sampling																		
A2)	Definition of instrumental and sensory protocols																		
A3)	Sensory and instrumental alignment tests																		
	1) Instrumental alignment																		
	2) Sensory alignment																		
A4)	Creation of sensory and instrumental datasets																		
A5)	Development of chemometric models																		
A6)	Shelf-life study																		
A7)	Analysis of bioactive compounds in monovarietal extra virgin olive oils of Nostrana di Brisighella cultivar																		
A8)	Volatile analysis of flavoured oils																		
A9)	Writing of research papers and final thesis																		

4. Research progress and main results

The main aim of this research project is to develop chemometric models to estimate olive oil commercial categories, in particular, discriminating V from EV olive oils. The 117 samples were evaluated by five different sensory panels and classified according to a decision tree, based on the agreement among the panels regarding the commercial category and the main perceived defect (Barbieri *et al.*, 2020). The sensory evaluation resulted in the following classifications: 24 samples as EV, 58 as V, 33 as borderline (BL) (classified between EV and V), and 2 as L. According to the decision tree application, samples classified by the panel as BL, either of the first type (disagreement on the commercial category) or the second type (disagreement on the most perceived defect) were subjected to a blind formative re-assessment. In addition to sensory analysis, the profile in volatile compounds of the same oils was analysed using Headspace Gas Chromatography-Ion Mobility Spectrometry (HS-GC-IMS) technique in five different laboratories equipped with the same type of instrument. Raw data from HS-GC-IMS analysis came from 3D chromatograms (heatmaps) characterized by GC retention time (seconds), IMS drift time (milliseconds), and ion current intensity (millivolt). From the analysis of 15 preselected standard volatile compounds, 3D spectral intensity regions were identified using Vocal software (Gesellschaft für Analytische Sensorsysteme mbh, G.A.S.; Dortmund, Germany). These volatile molecules are known to be markers of specific sensory attributes of virgin olive oils, both positive (fruity) and negative such as the main defects (fusty-muddy, winy-vinegary, musty-humid-earthy, frostbitten olives, rancid) used to classify the samples. Their intensity values (VOCs) were employed to validate four PLS-DA models (EV vs noEV; L vs noL; Lvs V; EV vs V) as described by Valli *et al.* (2020) with minor modification. Through the combination of probability data obtained from the application of the four chemometric models, the 117 analysed samples were estimated. In total, 63 samples were predicted as V, 16 as IN (inconsistent), 38 as EV, and 0 as L. Of particular interest are IN samples, so named because models are unable to assign a unique commercial category based on the simultaneous evaluation of the generated probabilities. As shown in Table 2, comparing the percentage of correct classification across different commercial categories, around 70% of the samples analysed so far were correctly classified according to sensory evaluation. The dataset will be further expanded with 37 additional samples, already analysed but with data processing still pending, to enhance the robustness of the chemometric models.

Table 2. Comparison of correctly classified samples for each commercial category (Panel test) by HS-GC-IMS, applied to 117 olive oil samples.

Commercial category	HS-GC-IMS	
	Correctly cassified	%
EVOO	20/24	83
VOO	51/58	88
BL	11/33	33
LOO	0/2	0
TOTAL	117/82	70

Moreover, based on the data obtained through HS-GC-IMS analyses conducted by the five laboratories involved in the study, an inter-laboratory study was carried out to assess the reproducibility of the results. Data from one laboratory were excluded due to a significant difference compared to the other laboratories. These differences are likely attributable to the use of an older-generation HS-GC-IMS instrument characterized by lower sensitivity than the more advanced version used by the other laboratories. Analysis of monomer and dimer signal intensities showed that one of the four laboratories consistently reported higher values. This difference may be related to variations in the purity of the nitrogen used as the carrier gas. However, as shown by the analysis of the second principal component (PC2) in Figure 1, the samples formed distinct clusters based on the laboratory but followed a similar overall trend. For instance, the

sample identified as 50 (circled in red in Figure 1) is located in the same region of the plot across all laboratories, indicating similar scores. This suggests that, despite instrumental variations, the systems can extract comparable information, demonstrating overall consistency in analytical performance across laboratories. Moreover, to investigate the level of agreement among laboratories, two preliminary PLS-DA models (EV vs noEV and V vs noV) were developed using a dataset of 97 samples. Model performance was assessed using permutation testing; however, neither model achieved robust statistical significance ($p > 0.05$), with results being non-significant or close to the significance threshold. The study is currently ongoing to calibrate the models using all samples analyzed to date, with the aim of improving their robustness. Despite these limitations, the predictive model for V vs noV showed a good level of agreement between the four laboratories. On the contrary, the EV vs noEV model had lower results, due to a data set not fully balanced. Therefore, it will be necessary to incorporate additional EVOO samples (robustly classified by the panels) in order to improve the formation of the PLS-DA models. At present, it is not possible to develop a unified and shared predictive model among all laboratories because of the instrumental and operational differences that affect the elution and detection of compounds. It is therefore necessary to further expand the data set in order to improve the robustness of the models and to assess possible strategies for inter-laboratory harmonisation.

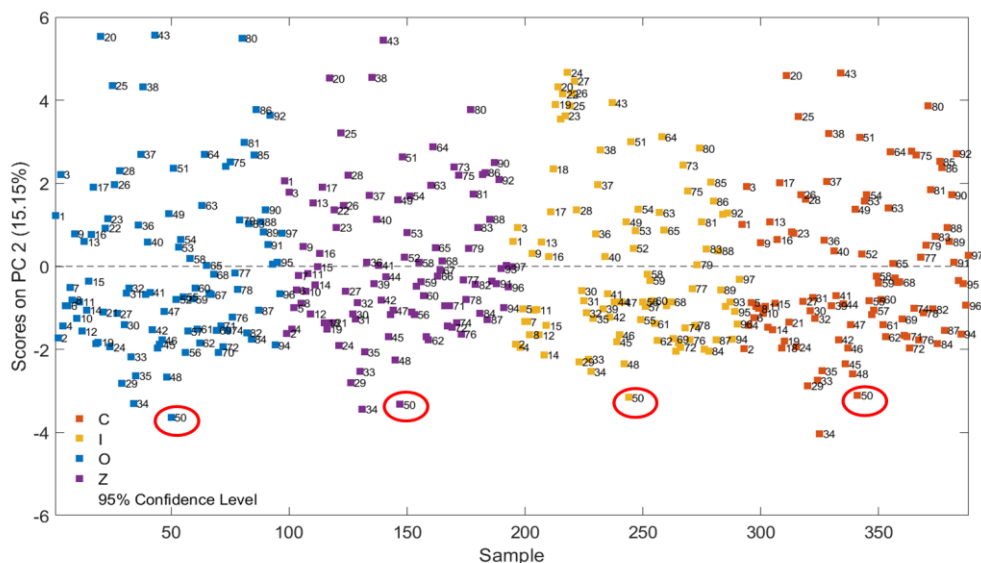


Figure 1. Score plot obtained from the PC2 of 97 olive oil samples analyzed by HS-GC-IMS across four laboratories, each indicated by a different color. The sample circled in red, is shown as an example of the consistent scores obtained across laboratories.

5. Publications produced during the PhD activities

- Casadei E, Valli E, Bendini A, Barbieri S, Tucci R, Ferioli F, Gallina Toschi T (2024) Valorization of monovarietal Nostrana di Brisighella extra virgin olive oils: focus on bioactive compounds, *Front. Nutr.* 11: 1353832.
- Tucci R, Casadei E, Valli E, Cevoli C, Barbieri S, Bendini A, Gallina Toschi T (2024) Analysis of virgin olive oils volatiles: quality grade evaluation and study of modifications during storage. *Proc. of FoodOmics 2024 7th International Conference*. pp. 174-175.
- Casadei E, Valli E, Bendini A, Barbieri S, Tucci R, Ferioli F, Gallina Toschi T (2024) How to optimize the endowment of bioactive compounds in Nostrana di Brisighella monovarietal extra virgin olive oils. *Proc. of FoodOmics 2024 7th International Conference*. pp. 88-90.
- Tucci R, Casadei E, Valli E, Cevoli C, Mingione S., Baroccio F, Barbieri S, Bendini A, Carpino S, Gallina Toschi T (2024) Analysis of the volatiles of virgin olive oils: quality grade evaluation and study of modifications during storage. *Proc. of MS 8a edizione Food Day*. pp. 34-35.
- Tucci R, Casadei E, Valli E, Cevoli C, Mingione S., Baroccio F, Barbieri S, Bendini A, Carpino S, Gallina Toschi T (2024) HS-GC-IMS screening method to support the virgin olive oils panel test: an inter-laboratory study. *Proc. of XXVIII Congresso Allianz MiCo–Milano Convention Centre-Fiera Milano Milano*, volume 2 (pp. 482-482).
- Tucci R, Bendini A, Casadei E, Ferioli F, Valli E, Barbieri S, Cevoli C, Gallina Toschi T (2024). Head space gas chromatography coupled to ion mobility spectrometry to assess the oxidative status of virgin olive oils during storage. In *Euro Fed Lipid 5th International Symposium on Lipid Oxidation and Antioxidants* (pp. 98-98).
- Bendini A, Casadei E, Tucci R, Ferioli F, Valli E, Barbieri S, Cevoli C, Gallina Toschi T (2024). Targeted, semi-targeted and untargeted analytical approaches applied to assess the oxidative status of virgin olive oils during storage. *Proc. of Euro Fed Lipid 5th International Symposium on Lipid Oxidation and Antioxidants*. pp. 30-30.
- Tucci R, Cevoli C, Bendini A, Barbieri S, Casadei E, Valli E, Gallina Toschi T (2025). Changes in the Volatile Profile, Fruity Flavor, and Rancidity in Virgin Olive Oils During Storage by Targeted and Untargeted Analytical Approaches. *Foods* 14.

Fostering sustainability in the olive oil supply chain: valorization of typical virgin olive oils, olive mill by-products and waste

Sofia Zantedeschi (email: sofia.zantedeschi2@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: XXXVIII; Anno di frequenza: III

Tutor: Tullia Gallina Toschi; Co-tutor: Enrico Valli, Matilde Tura

1. Stato dell'arte

Lo sviluppo sostenibile, definito come “soddisfare i bisogni attuali senza compromettere quelli delle generazioni future” (Brundtland, 1987), si fonda su tre pilastri relativi ad aspetti ambientali, sociali ed economici, finalizzati a proteggere le risorse naturali, promuovere l'economia locale e coinvolgere nel processo decisionale le comunità locali (Menozzi, 2014).

La produzione di olio d'oliva, un prodotto di grande valore economico nella dieta mediterranea, è in continua crescita a livello mondiale (Guasch-Ferré *et al.*, 2014). È importante garantire e favorire la sostenibilità della filiera dell'olio d'oliva, per fornire un vantaggio competitivo ai produttori e un incentivo ai consumatori, poiché rappresenta un valore aggiunto e un elemento di differenziazione (Lombardo *et al.*, 2021).

Al fine di supportare la sostenibilità socio-economica della filiera olivicolo-olearia, la politica dell'Unione Europea per lo sviluppo rurale promuove la produzione di indicazioni geografiche (IG), tra cui la denominazione di origine protetta (DOP) e l'indicazione geografica protetta (IGP) (Menozzi, 2014). Tali certificazioni promuovono la qualità alimentare legata all'origine geografica, generando effetti positivi su aspetti economici, sociali ed ambientali che si rafforzano nel tempo grazie alla preservazione delle risorse locali coinvolte (Vandecastelaere, 2010). Infatti, i consumatori sono generalmente disposti a comprare un prodotto con certificazione IG ad un prezzo più alto rispetto ai prodotti non certificati (Cei *et al.*, 2018). Inoltre, le IG possono salvaguardare metodi tradizionali e patrimoni culturali grazie all'impiego di tecniche di produzione tradizionali (WIPO, 2021). Valorizzare i prodotti alimentari con IG può contribuire a creare posti di lavoro e stimolare la crescita economica, specialmente nelle aree rurali (Deselnicu *et al.*, 2013).

Per rendere la produzione di olio d'oliva sostenibile è necessario intervenire su tutte le fasi della filiera. Un aspetto molto importante, oltre alla valorizzazione della produzione locale di oli extra vergini di oliva di qualità, è l'elevata quantità di sottoprodotti e scarti che si generano in frantoio, quali nocciolini, sansa, acque di vegetazione e foglie. Il nocciolino viene principalmente sfruttato come una fonte di bioenergia rinnovabile e sostenibile attraverso processi di combustione e, potenzialmente, per la produzione di biocarburanti (García Martín, 2020). La sansa, invece, può essere inviata ai sansifici per produrre olio di sansa oppure può essere impiegata come materia prima per il compostaggio, per la produzione di energia tramite processi di combustione o di biogas e per l'estrazione di composti bioattivi, come i polifenoli (Dermeche *et al.*, 2013). In particolare, viene prodotta una ingente quantità di acque di vegetazione, che presentano un problema a livello ambientale, in quanto il loro potenziale inquinante può causare effetti negativi sul suolo e le falde acquifere (Gómez-Caravaca *et al.*, 2014). Tuttavia, essendo ricche di composti bioattivi, le acque di vegetazione possono essere valorizzate: ad esempio è possibile estrarre composti fenolici che, successivamente, possono essere impiegati come componenti funzionali in alimenti, cosmetici o mangimi (Comandini *et al.*, 2015). Inoltre, le foglie d'ulivo, separate dalle olive durante la produzione dell'olio, rappresentano un altro scarto raramente valorizzato. Un possibile scenario vede impiegati foglie d'ulivo e acque di vegetazione per la produzione di biogas (Romero-García *et al.*, 2014). Tuttavia, l'alto contenuto di lignina nelle foglie presenta un problema per la loro conversione in biogas (Espeso *et al.*, 2021). Considerando la grande importanza dello sviluppo di una filiera dell'olio d'oliva sostenibile e di frantoi virtuosi, è necessario investigare la valorizzazione dei sottoprodotti e degli scarti di frantoio finora meno utilizzati, quali le foglie. Queste pratiche favoriscono la sostenibilità delle risorse e la riduzione dell'inquinamento derivante dal settore dell'olio d'oliva, rappresentando anche opportunità economiche (D'Adamo *et al.*, 2019).

2. Bibliografia

- Brundtland GH (1987) Our Common Future: Report of the World Commission on Environment and Development. Geneva, UN-Dokument A/42/427.
- Cei L, Defrancesco E, Stefani G (2018) From geographical indications to rural development: A review of the economic effects of European Union policy, *Sustainability* 10(10): 3745.
- Comandini P, Lerma-García MJ, Massanova P, Simó-Alfonso EF, Gallina Toschi T (2015) Phenolic profiles of olive mill wastewaters treated by membrane filtration systems, *J. Chem. Technol. Biotechnol* 90(6): 1086-1093.
- D'Adamo, I, Falcone, PM, Gastaldi, M, Morone, P (2019) A social analysis of the olive oil sector: The role of family business, *Resour.* 8(3): 151.

- Deiana P, Santona M, Dettori S, Culeddu N, Dore A, Molinu MG (2019) Multivariate approach to assess the chemical composition of Italian virgin olive oils as a function of variety and harvest period, *Food Chem.* 300: 125243.
- Dermeche S, Nadour M, Larroche C, Moulti-Mati F, Michaud P (2013) Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies, *Process. Biochem.* 48(10): 1532-1552.
- Deselnicu OC, Costanigro M, Souza-Monteiro DM, McFadden DT (2013) A meta-analysis of geographical indication food valuation studies: What drives the premium for origin-based labels? *J. Agric. Econ.* 38(2): 204-219.
- Espeso J, Isaza A, Lee JY, Sørensen PM, Jurado P, Avena-Bustillos RD, Olaizola M, Arboleya JC (2021). Olive leaf waste management, *Front. Sustain. Food Syst.* 5: 660582.
- García Martín JF, Cuevas M, Feng CH, Álvarez Mateos P, Torres Garcia M, Sánchez S (2020) Energetic valorisation of olive biomass: Olive-tree pruning, olive stones and pomaces, *Processes* 8(5): 511.
- Gómez-Caravaca AM, Verardo V, Bendini A, Gallina Toschi T (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), pp. 301-334.
- Guasch-Ferré M, Hu F B, Martínez-González MA, Fitó M, Bulló M, Estruch R, Longobardi F, Contillo F, Catucci L, Tommasi L, Caponio F, Paradiso VM (2021) Analysis of peroxide value in olive oils with an easy and green method, *Food Control* 130: 108295.
- Lombardo L, Farolfi C, Capri E. (2021) Sustainability certification, a new path of value creation in the olive oil sector: The Italian case stud, *Foods* 10(3):501.
- Menozzi, D (2014) Extra-virgin olive oil production sustainability in northern Italy: A preliminary study, *Br. Food J.* 116(12): 1942-1959.
- Romero-García JM, Niño L, Martínez-Patiño C, Álvarez C, Castro E, Negro MJ (2014) Biorefinery based on olive biomass. State of the art and future trends, *Bioresour. Technol.* 159: 421-432.
- Vandecastelaere E, Arfini F, Belletti G, Marescotti A, Allaire G, Cadilhon J, Casabianca F, Damary PH, Estève M, Hilmi M, Jull C (2010) Linking people, places and products. *FAO*.
- World Intellectual Property Organization (2021) Geographical indications. An introduction. <https://tind.wipo.int/record/44179/files/wipo-pub-952-2021-engeographical-indications-an-introduction-2nd-%20edition.pdf>

3. Sviluppo della ricerca

La ricerca è stata sviluppata secondo i seguenti punti principali:

- 1) Caratterizzazione di oli vergini di oliva albanesi: analisi strumentale e sensoriale di due oli prodotti da due frantoi di olio albanese monovarietale Kalinjot.
- 2) Caratterizzazione di oli vergini di oliva portoghesi: analisi strumentale e sensoriale di sei campioni di oli portoghesi.
- 3) Caratterizzazione oli vergini di oliva marocchini: analisi strumentale e sensoriale di 15 campioni di oli marocchini.
- 4) Valorizzazione di sottoprodotti del frantoio: caratterizzazione (contenuto lipidico e in umidità) della sansa, di acque di vegetazione, nocciolini e foglie di ulivo. Prove di produzione di biogas con miscele di acque di vegetazione e foglie di ulivo.

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)	Caratterizzazione di oli di oliva vergini albanesi																		
	1) Analisi e parametri: OSI time, profilo dei composti volatili, perossidi, analisi sensoriale																		
A2)	Caratterizzazione di oli di oliva vergini portoghesi																		
	1) Analisi e parametri: OSI time, profilo dei composti volatili, perossidi, analisi sensoriale, fenoli totali (Folin-Ciocalteu), profilo in fenoli (HPLC)																		
A3)	Caratterizzazione di oli di oliva vergini marocchini																		
	1) Analisi e parametri: OSI time, profilo dei composti volatili, perossidi, analisi sensoriale, fenoli totali (Folin-Ciocalteu), profilo in fenoli (HPLC)																		
A4)	Valorizzazione di sottoprodotti del frantoio																		
	1) Caratterizzazione analitica (lipidi e umidità) dei sottoprodotti																		
	2) Potenziale metanigeno di acque di vegetazione in miscela con foglie di ulivo																		
A5)	Preparazione della tesi e di articoli																		

4. Principali risultati

Il presente progetto di ricerca si propone di migliorare la sostenibilità della filiera dell'olio di oliva attraverso la valorizzazione di oli di oliva vergini tipici di aree geografiche specifiche e di alcuni sottoprodotti del frantoio.

Per quanto riguarda la caratterizzazione di oli d'oliva vergini, sono stati considerati tre Paesi come casi studio: Albania, Portogallo e Marocco. Questi contesti rappresentano scenari produttivi e normativi differenti. L'Albania, attualmente tra i primi 20 Paesi produttori di olio d'oliva a livello mondiale, è una nazione emergente nel panorama oleicolo internazionale, ma non dispone ancora di alcuna IG riconosciuta. Il Portogallo, tra i primi produttori europei, in genere dopo Spagna, Italia e Grecia, vanta sei oli extra vergini certificati come DOP. Tuttavia, i relativi disciplinari risalgono agli anni '90 e necessitano di aggiornamenti. Il Marocco, settimo produttore mondiale, presenta un settore oleicolo ampiamente sviluppato e in crescita e dispone di indicazioni geografiche riconosciute a livello nazionale. Tuttavia, nessuna di queste ha ancora ottenuto il riconoscimento come IG dall'Unione Europea.

Sono stati analizzati, dal punto di vista chimico e sensoriale, due oli albanesi monovarietalici 100% Kalinjot, ottenuti da due frantoi situati nel sud-ovest del Paese. Lo studio conferma le caratteristiche qualitative di questi oli, coerenti con quanto già osservato in letteratura per la varietà Kalinjot (Topi et al., 2019; Velo & Topi, 2017; Morina & Kongoli, 2022). Entrambi gli oli hanno rispettato i limiti previsti per gli oli extra vergini secondo il Reg. UE 2022/2104. Gli oli in esame presentano un medio contenuto di composti fenolici (7.00 ± 0.12 mg GA/20 g e 5.36 ± 0.10 mg GA/20 g) superando la soglia necessaria per apporre in etichetta l'indicazione salutistica relativa ai polifenoli. Essi presentano un oxidative stability index (OSI) time superiore a 20 ore, parametro importante per indicare la stabilità ossidativa nel tempo ed avere un'indicazione sulla shelf-life del prodotto. A valori più elevati di OSI time corrisponde una maggiore resistenza all'ossidazione, quindi si può presumere una shelf-life più lunga. L'analisi SPME-GC-MS ha rilevato 33 composti volatili, con prevalenza di aldeidi, alcoli e chetoni. In particolare, tra i composti principali sono stati identificati e quantificati le aldeidi (Z)-2-esenale, esenale e (E)-2-pentenale, gli alcoli (Z)-3-esen-1-olo e 1-esanolo e l'1-penten-3-one, associati alla caratteristica sensoriale olfattiva di "verde". I composti volatili associati ai difetti, come l'acido butanoico e l'acido acetico, invece, sono stati rilevati a concentrazioni notevolmente inferiori. Nelle mappe di calore ottenute dall'analisi HS-GC-IMS sono stati identificati dodici composti volatili, inclusi quelli associati a note fruttate secondo letteratura. Inoltre, l'analisi sensoriale ha rilevato due attributi positivi secondari minori, ovvero il sentore di erba e quello di pomodoro, rilevanti anche per la possibile futura applicazione di una denominazione di origine. Infatti, gli attributi organolettici secondari possono essere caratteristici del territorio di produzione dell'olio ed indicati nei disciplinari di produzione, in quanto dipendono da fattori come le condizioni pedoclimatiche e la cultivar degli ulivi (Deiana et al., 2019).

Lo studio sugli oli d'oliva marocchini, nell'ambito del progetto di ricerca europeo FoodLand, ha riguardato l'analisi di 15 oli vergini prodotti da cinque cooperative della regione di Béni Mellal: Abou Jamil, Al Khair, Amhouach, Tamskourt e Colza. I campioni di olio sono stati ottenuti da olive prevalentemente della cultivar Picholine Marocaine ($\geq 80\%$) e mediante estrazione con decanter a due fasi. Le analisi hanno incluso parametri di qualità (acidità libera, perossidi e estinzioni specifiche nell'ultravioletto), stabilità ossidativa (Rancimat e microESR), composizione fenolica (Folin e HPLC-UV-VIS), composizione in acidi grassi, volatili (HS-SPME/GC-MS) e profilo sensoriale. Nove campioni hanno rispettato i requisiti, previsti dal Consiglio Oleicolo Internazionale e dal Reg. UE 2022/2104, per l'olio extra vergine sia a livello compositivo che sensoriale, mentre sei sono stati classificati come vergini in quanto presentavano difetti sensoriali con bassa intensità (riscaldamento, rancido o avvinato), probabilmente legati a una gestione non ottimale delle olive nella fase post-raccolta. I risultati ottenuti confermano, nel complesso, la buona qualità degli oli analizzati, seppur migliorabile, e supportano la possibilità di valorizzare a livello europeo l'IG nazionale "Huile d'olive Dir Béni Mellal", attraverso una futura richiesta di registrazione come IGP.

Infine, relativamente allo studio sugli oli di oliva vergini portoghesi, sono in corso le analisi di due oli DOP Azeite de Moura, la DOP con la produzione più elevata a livello nazionale, tipico del sud del Paese (Alentejo), e Azeite de Trás-os-Montes, rappresentativo del nord-est portoghese, il cui disciplinare è stato recentemente aggiornato (agosto 2024). Sono stati selezionati tre oli di oliva da tre produttori diversi per ciascuna DOP, su cui si stanno eseguendo analisi chimiche e sensoriali per la loro caratterizzazione. Sono state svolte le analisi dei parametri richiesti per la classificazione merceologica secondo la normativa europea e per la verifica della conformità ai rispettivi disciplinari (acidità libera, perossidi, estinzioni specifiche nell'ultravioletto, acidi grassi ed analisi sensoriale) e la stabilità ossidativa (Rancimat e microESR). Inoltre, sono in corso le analisi sul profilo dei composti volatili e sulla composizione fenolica (Folin-Ciocalteu e HPLC-UV-VIS).

La seconda linea di ricerca riguarda la caratterizzazione e la valorizzazione dei sottoprodotti del frantoio. In particolare, ogni anno sono stati campionati sansa, acque di vegetazione, nocciolini e foglie di olivo presso il frantoio CAB Brisighella e sono stati caratterizzati, in termini di percentuale di umidità e di contenuto totale in lipidi. I valori percentuali di umidità e lipidi estratti sono costanti tra le due campagne olearie, con medie di 37,17% nelle foglie, 20,55% e 0,55% nei nocciolini, 82,92% e 0,62% nelle acque di vegetazione e 45,67% e 3,00% nella sansa. Questi

parametri sono fondamentali poiché influenzano la resa, la qualità e l'efficienza dei processi di valorizzazione come l'estrazione di composti bioattivi, la produzione di biogas e di energia termica.

Inoltre, è stato studiato il potenziale utilizzo di foglie d'ulivo polverizzate in co-digestione con acque di vegetazione (OMWW) per la produzione di biogas. A tal fine, è stato condotto un test di potenziale metanigeno (BMP) su tre formulazioni: acque di vegetazione come controllo (OMWW), OMWW con l'aggiunta del 4% di foglie (OMWW+4) e OMWW con il 10% di foglie (OMWW+10). Le miscele sono state caratterizzate in termini di solidi totali, solidi volatili, pH e contenuto lipidico totale.

I risultati hanno evidenziato che l'aggiunta del 4% di foglie non ha determinato un aumento statisticamente significativo della produzione cumulativa di biogas rispetto al controllo (180 vs 185 Nm³/t al giorno 35, $p > 0,05$). Al contrario, l'aggiunta del 10% ha comportato una riduzione significativa di tale produzione (118 Nm³/t, $p = 0,0042$).

Tuttavia, in entrambe le formulazioni con foglie si è osservato un miglioramento della qualità del biogas: la percentuale di metano (CH₄) è aumentata significativamente rispetto al controllo, raggiungendo il 52,6% con OMWW+4 e il 53,8% con OMWW+10, rispetto al 50,7% del campione non addizionato.

Questi risultati indicano che un'aggiunta moderata di foglie può migliorare la qualità del biogas senza compromettere la resa, mentre percentuali troppo elevate possono ostacolare il processo. Sono in corso ulteriori ottimizzazioni per definire le condizioni più favorevoli di co-digestione.

Il lavoro sugli oli albanesi è stato pubblicato su *Italian Journal of Food Science*. È stata inoltre recentemente sottomessa una short communication alla rivista *Waste*, relativa alla co-digestione di acque di vegetazione e foglie di ulivo per la produzione di biogas. Sono attualmente in fase di stesura una review sulla valorizzazione dei sottoprodotti del frantoio, un articolo sulla caratterizzazione degli oli marocchini e un altro dedicato agli oli DOP portoghesi. Tutti questi lavori confluiranno nella mia tesi di dottorato.

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

Zantedeschi S (2023) Improving sustainability of the vegetable oils supply chains: innovative analytical methods for quality control, valorization of by-products and reduction of waste. In: Book of Abstract. 27th Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science, Technology and Biotechnology, pp. 228–229.

Zantedeschi S (2024) Fostering sustainability in the olive oil supply chain: valorization of typical extra virgin olive oils and olive mill by-products. In: Book of Abstract. 28th Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science, Technology and Biotechnology, pp. 385–386.

Zantedeschi S, Casadei E, Mandrioli M, Barbieri S, Ferioli F, Hoxha F, Valli E, Gallina Toschi T (2025) Fatty acids, volatile and phenolic composition, quality and sensory profile of two Albanian Kalin jot extra virgin olive oils, *Ital J. Food Sci.* 37(1): 277–289.

Zantedeschi S, Tura M, Valli E, Barbieri S, Bendini A, Mokhtari N, et al. (2024) Unlocking the potential of Moroccan virgin olive oils for a possible recognition by the European Union's geographical indication through comprehensive analytical characterization of their quality and composition. In: Book of Abstracts. 11th International Symposium on Recent advances in food analysis, Prague, p. 47.

Zantedeschi S, Valenti F, Maraldi M, Augustin Martinez G, Tura M, Valli E, et al. (2024) Evaluating co-digestion of olive mill wastewater and olive leaves for biogas production. In: Book of Abstract. IX PhD Students Meeting in Environment and Agriculture, p. 28.