



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

GIORNATA DEL DOTTORATO 2022

Tematica di ricerca: "Scienze e Biotecnologie degli Alimenti"

29 Aprile 2022
Villa Almerici, Cesena



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

PHD PROGRAMME

AGRICULTURAL, ENVIRONMENTAL AND FOOD SCIENCE AND
TECHNOLOGY

INDICE

DOTTORANDI ISCRITTI AL I ANNO (XXXVII CICLO)

Federico Baris, *“Insights on the mechanisms underlying the colour expression and stability of Italian rosé wines”*

Gebremedhin Gebremariam Gebremical, *“Applications of cold atmospheric plasma, as green technology, for food shelf-life extension and waste reduction”*

Celeste Lazzarini, *“Production and analytical characterization of new and traditional foods: focus on sustainability”*

Cesare Ravagli, *“Technological, sensory, and nutritional assessment of ecofriendly food lipids”*

Guanghao Wang, *“Exploring the influence of redox chemistry as driver in precision winemaking”*

DOTTORANDI ISCRITTI AL II ANNO (XXXVI CICLO)

Beatrice Cellini, *“Biotechnological valorization of residues and by-products from agro-food industries”*

Fabio D’Elia, *“Study and development of innovative seafood products through the application of emerging process technologies”*

Cristian Galaz, *“Factors affecting wine stability: innovative approaches for sustainable enology”*

Ilaria Grigoletto, *“Sustainability of technology, quality control and consumption of olive oil”*

Qiuyu Lan, *“Metabolomics to investigate the effects of treatments on food and of food consumption on health”*

DOTTORANDI ISCRITTI AL III ANNO (XXXV CICLO)

Federica Barbieri, *“Isolation and characterisation of autochthonous lactic acid bacteria for improved bio-protective cultures and functional starters”*

Flavia Casciano, *“Effetto di alimenti destinati a specifiche categorie di consumatori sulle funzionalità prebiotiche”*

Cecilia Crippa, *“Genomic characterization of Klebsiella spp. isolates collected from artisanal food productions”*

Margherita D’Alessandro, *“Biotechnological and molecular approaches for the study of GRAS microorganisms to be used in the production of functional dairy foods”*

Samantha Rossi, *“Approcci biotecnologici per la valorizzazione di fonti proteiche alternative, scarti e sottoprodotti dell’industria alimentare”*

DOTTORANDI ISCRITTI AL I ANNO
(XXXVII CICLO)

Insights on the mechanisms underlying the colour expression and stability of Italian rosé wines

Federico Baris (email: federico.baris2@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: XXXVII; Anno di frequenza: I

Tutor: Fabio Chinnici; Co-tutor: Antonio Castro Marin

1. Curriculum

Federico Baris è nato a Bologna il 13/09/1996. Nel Settembre 2018 si laurea nella Triennale di Tecnologie Agrarie presso l'Università di Bologna, con la tesi dal titolo: "*Peach latent mosaic viroid (PLMVd), trasmissione del viroide tramite potatura*". Nell'Aprile 2021 consegue la laurea magistrale in Scienze e Tecnologie Agrarie con la tesi dal titolo: "*Utilizzo di esche zuccherine come metodo di distrazione di formiche dalle cocciniglie farinose della vite*". Parallelamente al corso di laurea magistrale, ha partecipato, presso l'Università di Firenze, ad un Master in Futuro Vegetale, basato su di un approccio multidisciplinare al progetto di soluzioni innovative ispirate al mondo vegetale, in un nuovo territorio dove ricerca botanica, sociale e progettuale si incontrano. Da Maggio a Settembre 2021 ha svolto un lavoro come tecnico delle produzioni a Castel San Pietro Terme, (Palazzo di Varignana,) approfondendo le conoscenze sulla coltivazione di olivo, mandorlo, nocciolo e con un focus specifico sulla coltivazione della vite.

2. Stato dell'arte

Nell'ultimo decennio, il consumo di vini rosati nel mondo ha visto statistiche in costante crescita. Nella campagna 2018 (ultimi dati disponibili) il volume complessivo commercializzato è stato di 25.6 milioni di ettolitri (+ 31% rispetto al 2002), con la Francia (28% del totale), gli USA (17%) e la Spagna (15%) leader di settore (Roseè Wine World, 2020). I vini rosati italiani rappresentano il 10% della produzione mondiale con ottime performance di esportazione (+13%) e prezzi medi all'export in costante crescita (+35% dal 2008). Il rosato italiano piace dunque all'estero ma stenta a trovare spazio in Italia, i cui produttori potrebbero, invece, cogliere l'opportunità offerta dal positivo andamento delle preferenze internazionali, migliorando la comunicazione e l'attrattività del vino rosato sul mercato interno. Il colore è una delle principali caratteristiche visive dei vini e ricopre una fondamentale importanza nella definizione della qualità percepita del prodotto. Probabilmente in misura maggiore rispetto ai vini bianchi e rossi, il colore dei vini rosati è un fattore di qualità fondamentale, poiché in grado di influenzare le scelte di acquisto.

La classe fenolica delle antocianine ed i pigmenti da loro derivati sono i principali responsabili del colore dei vini rossi e rosati. Le prime sono localizzate nelle cellule epidermiche delle uve a bacca rossa e sono estratte nel corso delle fasi di macerazione breve attuate per le vinificazioni in rosato (He et al., 2012). Durante la fermentazione e specialmente nel corso del primo o secondo anno di conservazione, però, le antocianine vanno a subire reazioni e condensazioni, spesso legate a cinetiche ossidoriduttive, che porta alla formazione di derivati antocianici (questi ultimi cruciali per la stabilità del colore) (Hernandez et al., 2011). La tipologia delle reazioni coinvolte include la auto-associazione e la copigmentazione (per i vini giovani), la condensazione con catechine e procianidine a formare molecole polimere o, infine, la formazione di nuovi pigmenti quali le piranoantocianine ed i loro polimeri (tipici di vini evoluti) (He et al., 2012). Il colore e la stabilità di questi derivati varia da composto a composto ma, in linea di massima, si ritiene che i prodotti di condensazione fra antocianine e flavan-3-oli, mediati o meno dalla presenza di acetaldeide, siano quelli più idonei a stabilizzare il colore dei vini (Hernandez et al., 2011).

La specificità compositiva dei vini rosati fa sì che l'espressione e la stabilità del colore dipendano fortemente i) dalla varietà dell'uva, ii) dalla quantità di antociani estratti durante le macerazioni brevi, iii) dal rapporto molare fra antocianine e tannini (estratti dalla bacca od aggiunti in vinificazione), iv) dallo stato ossidoriduttivo del vino e v) dall'entità delle reazioni che coinvolgono queste ultime classi di composti nelle fasi di fermentazione ed affinamento (He et al., 2012). Le eccessive quantità di antocianine possono comportare drastiche perdite di colore a seguito di ossidazione. Nei vini rosati, infatti, l'ossidazione dei flavanoli (catechine e procianidine) innesca il fenomeno dell'imbrunimento non enzimatico dei prodotti (Li, Guo, & Wang, 2008). Un eccesso di polifenoli può, inoltre, influenzare negativamente l'aroma dei vini a seguito della possibile formazione di chinoni in grado di reagire in modo irreversibile con aromi varietali quali i tioli, generando molecole inodori (Gil et al, 2019).

3. Obiettivi e risultati attesi

Il presente progetto di ricerca si propone di approfondire i meccanismi di formazione, evoluzione e stabilizzazione del colore dei vini rosati. Si intende, inoltre, valutare l'efficacia di diverse strategie di cantina, in grado di permettere la gestione di questa componente della qualità dei vini prodotti, ed il suo mantenimento nel corso della shelf-life. 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 diverse metodologie analitiche distinte e consolidate per la determinazione del colore, antociani e tannini nei vini rosati.

A2) Valutazione di tecniche analitiche per colore e tannicità di facile applicazione in ambiente produttivo, basati su determinazioni di tipo spettrofotometrico, tra le quali: a) acquisizione spettri UV/Vis in assorbanza e riflettanza; b) fenoli reattivi alla vanillina; c) fenoli reattivi alla p-DAC; d) indice dei tannini reattivi alla gelatina (potere astringente); e) metodo di Bate-Smith; f) metodo della metilcellulosa

A3) Interazione antocianine e tannini in matrice modello con il fine di modellizzare i fenomeni sotto studio; si ritiene importante poter lavorare in condizioni di laboratorio, utilizzando matrici sintetiche o mosti bianchi e rossi previamente caratterizzati e successivamente testati a diverse combinazioni per variare il rapporto fra pigmenti, tannini ed acidi fenolici.

A4) Elaborazione di una mappa del profilo cromatico e tannico attraverso l'esecuzione di uno screening analitico-sensoriale di vini rosati italiani, acquisiti sul mercato e provenienti dai territori nazionali storicamente vocati a questi prodotti (Bardolino, Valtenesi, Abruzzo, Puglia), ma anche distretti emergenti (Toscana, Sicilia) o dediti ai rosati spumanti (base Lambrusco in Emilia, base Pinot nero in Franciacorta o Trento).

A5) Valutazione dell'influenza del tempo di macerazione e della presenza di tannini enologici di diverse origini, sull'evoluzione nel tempo del colore (spettrofotometria, profilo CIELab) e sulla componente fenolica (HPLC-DAD-TOF) e volatile (GC-MS) di vini rosati vinificati in laboratorio.

A6) Vinificazioni in scala meso in almeno una delle due vendemmie successive al primo anno, con lo scopo di studiare due diverse tecniche enologiche applicate ai vini rosati: la spumantizzazione e la macro/micro ossigenazione.

A7) Scrittura e pubblicazione della tesi di dottorato, poster, articoli scientifici e presentazione orale con la pubblicazione di almeno 2 articoli alla fine del progetto, pubblicati su riviste nazionali ed internazionali sottoposte a peer review, nel campo delle scienze e tecnologie alimentari. Almeno 1 presentazione orale e 1 poster pubblicati negli atti, alla fine del progetto, riguardanti l'argomento del progetto svolte in congressi nazionali ed internazionali di scienze e tecnologie alimentari

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>Valutazione di tecniche analitiche per colore e tannicità</i>			■	■	■	■													
A3) <i>Interazione antocianine e tannini in matrice modello</i>				■	■	■	■												
A4) <i>Elaborazione di una mappa del profilo cromatico e tannico</i>				■	■	■	■												
A5) <i>Valutazione influenza tempo macerazione e presenza tannini</i>								■	■	■	■	■	■						
1) analisi colore, fenoli, volatili dei vini								■	■	■	■	■	■						
2) Studio shelf life/evoluzione dei parametri suddetti														■	■	■	■	■	
A6) <i>Vinificazioni in scala meso</i>																			
1) studio spumantizzazione e macro/micro ossigenazione																			
2) analisi colore, fenoli, volatili dei vini e loro evoluzione																			
A7) <i>Pubblicazioni – comunicazioni e stesura della tesi finale</i>																			

4. Bibliografia

- Gil M., Louazil P., Iturmendi N., Moine V., Cheyrier V., Saucier C. (2019) Effect of polyvinylpyrrolidone treatment on rosés wines during fermentation: Impact on color, polyphenols and thiol aromas. Food Chemistry
- He F, Liang N-N, Mu L, Pan Q-H, Wang J, Reeves MJ, Duan C-Q. Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their Color Expression. Molecules. 2012; 17(2):1571-1601.
- Hernández, B., Sáenz, C., Alberdi, C., Alfonso, S., & Diñeiro, J. M. (2011). Colour Evolution of Rosé Wines after Bottling. South African Journal of Enology & Viticulture, 32(1).
- Li, H., Guo, A., Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. Food chemistry, 108(1), 1-13.
- Rosè Wine World Tracking, Annual Report, 2020 (<https://www.rosewinesworldtracking.com/>)

Applications of cold atmospheric plasma, as green technology, for food shelf-life extension and waste reduction

Gebremedhin Gebremariam Gebremical (email: gebremedh.gebrimica2@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: XXXVII; Anno di frequenza: I
Tutor: Prof.ssa Santina Romani
Co-tutor: Dott. Filippo Capelli, Dott.ssa Silvia Tappi, Dott. Romolo Laurita

1. Curriculum

Date of birth: 05/05/1986, Ethiopia, Tigray.

BSc, Food Science and Postharvest Technology, Haramaya University, Dire Dawa, Ethiopia, 2006-2008

MSc, Postharvest Technology, Institute of Technology, Haramaya University, Dire Dawa, Ethiopia, 2009-2012

Ph.D. Chemical Engineering (Food Engineering), School of Chemical and Bioengineering, Addis Ababa Institute of Technology, Addis Ababa University, Ethiopia. 2015-2020

Starting PhD course in Agricultural, Environmental and Food Science and Technology at the Department of Food Science, University of Bologna, Since January 2022.

4 articles published in national and international journals and 2 in proceeding

2. State of the art

Green and environmentally friendly strategies to protect food from contamination, spoilage, and food modification are a key element in addressing global food security and sustainability (Galford et al., 2020). To achieve this, novel or emerging food processing technologies based on high-tech advances were introduced in the food industry more than two decades ago (Jermann, Koutchma, Margas, Leadley, & Ros-Polski, 2015). Accordingly, the food industry is exploring alternative non-thermal physical technologies as well as hurdle methods (Zhang, Wang, Zeng, Han, & Brennan, 2019). Many conventional treatment and thermal preservation technologies have been tested on food, but most of them have various problems with food, economic feasibility and environmental issues (Picart-Palmade, Cunault, Chevalier-Lucia, Belleville, & Marchesseau, 2019). To address the above issues, new non-thermal technologies have been used in the food industry (Bermudez-Aguirre, 2019), although, to date, only a few of them have been validated and approved by regulatory agencies for use in the food industry. To address the existing issues non-thermal technologies, other new and emerging technologies such as cold plasma (in gaseous form) and plasma activated water (PAW) are also being explored (R Laurita, Barbieri, Gherardi, Colombo, & Lukes, 2015; Romolo Laurita et al., 2021). Cold plasma is a novel and smart green technology that is considered promising for sustainable food consumption patterns and ensuring global food security (Misra, Schlüter, & Cullen, 2016). Plasma is the fourth state of matter that contains a mixture of reactive species that play a key role in various food applications with promising results (Luo et al., 2020). PAW is generated by exposing water to a plasma discharge that contains reactive species, creates an acidic environment that leads changes in redox potential and conductivity. Due to its uniform treatment, uniform mixture of reactive species, environmental friendliness, and human's safe, compared to the conventional use of chemical and hydrothermal techniques with promising results, it is used in food sector for decontamination, detoxification, technological and functional modifications. Even though PAW is a novel and promising alternative technology, there are some issues to be addressed such storability, limited application, safety of PAW treat food, scale-up and also because of the complexity of chemistry and process parameters, is challenging to optimize and validate PAW for different food products.

Cold atmospheric plasma (gas plasma) could be used decontaminate foods from microorganisms, pesticides, food allergens, mycotoxins, and to functionalize food with promising results, however, contrasting results; have also been observed in terms of colour and lipid oxidation (Foligni et al., 2022; Misra & Jo, 2017). Since plasma is mainly considered a very superficial treatment with low penetration depth, and given the encouraging results obtained with different products, a deeper understanding of drying efficiency, impregnation and food property modification is certainly needed. Inconsistencies in the results obtained in the literature often result from the lack of process optimization and the use of different types of plasma devices, application modes, etc., which makes it very difficult to compare results. Finally, the reactive species induced by plasma exposure in different products can potentially lead to the formation of toxic components. Currently, there are very few studies evaluating this aspect, which is absolutely necessary for the approval of plasma by governmental agencies. Further research in this direction is strongly recommended.

3. Objectives

The aim of the project is to investigate and optimise the applications of cold plasma and to increase the knowledge of its effects on different food matrices during production and processing.

The dissertation project can be divided into the following tasks, which are summarised in Table 1.

A1) Literature review of previous studies on the application of cold plasma in agribusiness, properties and types of plasma (configuration, diagnostic methods and characterisation of plasma).

A2) Application of PAW to modify food starches considering different starch types, e.g. waxy maize, normal maize, potato and cassava, and evaluation of the effects on structural and functional properties.

A3) Application of cold plasma for drying fruits with the aim of improving the efficiency of the process, investigating drying kinetics and quality parameters.

A4) Inactivation of microorganisms, detoxification of toxins and pesticides from food by cold plasma, with the aim of increasing the chemical and biological safety of food.

A5) Application of cold plasma to extend the shelf life of treated foods, investigation of the ability of cold plasma to preserve foods from spoilage and quality degradation.

A6) Evaluate the safety/toxicity, scalability and environmental impact of cold plasma, contributing to the approval and acceptance of cold plasma for commercial purposes.

A7) Write dissertations, posters, scientific paper publications and oral presentations

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

Activities	Months	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	
A1) Literature review		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1) Types, structure and characterisation of plasma		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2) Effect of cold plasma on food matrices		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A2) Application of PAW for starch modification				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A3) Application of plasma for drying fruits						■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A4) Application of plasma to extend shelf-life of treated foods								■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A5) Inactivation of microorganisms, toxins and pesticides from food by cold plasma											■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A6) Evaluation of safety, scale-up and environmental impact of cold plasma																				■
A7) Writing articles, publications, poster presentations and dissertations																				■

4. Bibliography

- Bermudez-Aguirre, D. (2019). *Advances in cold plasma applications for food safety and preservation*: Academic Press.
- Foligni, R., Mannozi, C., Ismaiel, L., Capelli, F., Laurita, R., Tappi, S., . . . Mozzon, M. (2022). Impact of Cold Atmospheric Plasma (CAP) Treatments on the Oxidation of Pistachio Kernel Lipids. *Foods*, *11*(3), 419.
- Galford, G. L., Peña, O., Sullivan, A. K., Nash, J., Gurwick, N., Pirolli, G., . . . Wollenberg, E. (2020). Agricultural development addresses food loss and waste while reducing greenhouse gas emissions. *Science of The Total Environment*, *699*, 134318.
- Jermann, C., Koutchma, T., Margas, E., Leadley, C., & Ros-Polski, V. (2015). Mapping trends in novel and emerging food processing technologies around the world. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *31*, 14-27.
- Laurita, R., Barbieri, D., Gherardi, M., Colombo, V., & Lukes, P. (2015). Chemical analysis of reactive species and antimicrobial activity of water treated by nanosecond pulsed DBD air plasma. *Clinical Plasma Medicine*, *3*(2), 53-61.
- Laurita, R., Gozzi, G., Tappi, S., Capelli, F., Bisag, A., Laghi, G., . . . Vittori, S. (2021). Effect of plasma activated water (PAW) on rocket leaves decontamination and nutritional value. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *73*, 102805.
- Luo, J., Nasiru, M. M., Yan, W., Zhuang, H., Zhou, G., & Zhang, J. (2020). Effects of dielectric barrier discharge cold plasma treatment on the structure and binding capacity of aroma compounds of myofibrillar proteins from dry-cured bacon. *LWT*, *117*, 108606.
- Misra, N., & Jo, C. (2017). Applications of cold plasma technology for microbiological safety in meat industry. *Trends in Food Science & Technology*, *64*, 74-86.
- Misra, N., Schlüter, O., & Cullen, P. J. (2016). *Cold plasma in food and agriculture: fundamentals and applications*: Academic Press.
- Picart-Palmade, L., Cunault, C., Chevalier-Lucia, D., Belleville, M.-P., & Marchesseau, S. (2019). Potentialities and limits of some non-thermal technologies to improve sustainability of food processing. *Frontiers in nutrition*, *5*, 130.
- Zhang, Z. H., Wang, L. H., Zeng, X. A., Han, Z., & Brennan, C. S. (2019). Non-thermal technologies and its current and future application in the food industry: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, *54*(1), 1-13.

Production and analytical characterization of new and traditional foods: focus on sustainability

Celeste Lazzarini (email: celeste.lazzarini3@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: XXXVII; Anno di frequenza: I

Tutor: Prof.ssa Tullia Gallina Toschi; Co-tutor: Dott. Enrico Valli

1. Curriculum

Celeste Lazzarini, born in 1994, after the studies at scientific high school she graduated in Natural Sciences with the thesis entitled “Taxidermic preparation of Indo-pacific Teleost. Methodologies for the preparation, conservation and museal display”. She continued the studies with the graduation in Science and Management of Nature obtained in the A.Y. 2020, following the international curriculum “Global Change Ecology and Sustainable Development Goals” with the thesis “Sustainable technologies and extraction for the valorization of a tomato by-product”.

Since November 2021 she has been a PhD student at University of Bologna, XXXVII cycle, with the research project “Production and analytical characterization of new and traditional foods: focus on sustainability”. She has been elected as representative of PhD students in the STAAA Academic Board (2022-2025).

On December 2022 she co-authored her first scientific article entitled “Sustainable Drying and Green Deep Eutectic Extraction of Carotenoids from Tomato Pomace” (Lazzarini C.; Casadei E.; Valli E.; Tura M.; Ragni L.; Bendini A.; Gallina Toschi T. *Foods* 11(3): 405).

2. State of the art

Malnutrition is a matter of major concern globally, and it is also addressed by the United Nations in its Agenda 2030 within the Sustainable Development Goals (SDG) 2 through the promotion of practices voted to eradicate all forms of malnutrition (FAO, 2020).

It is well known that around 1.3 billion tonnes of food is lost or wasted every year globally, nearly one third being edible parts, mostly from fruits, vegetable and cereals. As a matter of fact to increase the affordability of healthy diets, the costs of nutritious foods must come down, as their accessibility has to rise (FAO, 2020). One of the strategy to reach this goal is reducing pre-harvest and post-harvest losses and wastes, both in terms of quantity and quality and in each food supply chain, through the valorization of by-products, with a resulting increase in sustainability and circularity of the whole food sector (FAO, 2020).

According to Garn and Leonard (1989), more than 7'000 crop species have been cultivated and domesticated, but no more than 150 species are intensively cultivated for commercial purpose and just three main crops provide 60 % of world's food energy intake (Garn & Leonard 1989). Moreover, the use of local and traditional species can increase agricultural sustainability by reducing the need for external inputs, such as pesticides and fertilizers, and, depending on their species, can also improve soil fertility and the resilience of the entire system against climate change (Li X. and Siddique K.H.M. 2018).

Food insecurity is severe especially in developing countries, but it is gradually improved due to the increased agricultural export and growing needs demands from consumers (Tran et al., 2022). In fact, consumers are more and more attracted by healthy foods; markets are following this trend by highlighting this kind of products and adding functional ingredients to regular foods (Meyerding et al. 2018).

In this framework, the enrichment of local foods with bioactive compounds would meet the market demand for healthy products, and a proper labelling, with indication of the geographical area of provenience and possibly the health claim can be also a driver of economic growth for developing countries by exporting new food products (Bradley et al., 2011). It is particularly important to choose the appropriate technological approaches for supplemented food preparation in such a way new foods, produced from traditional and local ingredients or raw materials and added with extracted compounds with beneficial health effects can have a place in global market (Hedhili et al., 2021).

One of the major causes of food insecurity is climate change: the increase in the severity of natural disaster events in such a way it has become fundamental to discover strategies to cope with that. Agroecology is an integrated approach that applies ecological and social concepts for the management of the food sector and the agricultural system, optimizing the interactions between plants, animals, humans and the environment taking into consideration the social aspects for a sustainable production (FAO, 2020b). The agroecology approach is coherent with the use of by-products for the formulation of new enriched food and the promotion of knowledge on local biodiversity and raw material; in addition to that the improvement of food production processing techniques is another driver towards a more efficient and sustainable food making.

Sustainable food technologies play a very relevant role in determining the global sustainability of the food systems; some of them work without the direct application of thermal energy and use of chemicals such as the cold pressing for the production of unconventional and specialty edible oils, which recently have gained a lot of attention due to their

useful and beneficial properties (Vladic et al., 2020) Besides the use of non-thermal technologies, another example of sustainable extraction method is vacuum distillation which is used for the separation of mixtures with thermolabile compounds. It allows to operate at low temperatures, avoiding the degradation of several compounds in the extract. This technique can be applied to obtain natural products (e.g. essential oils) (Falcao et al. 2012). Different techniques could be applied for the separation of oil fraction from the seeds such as the more sophisticated supercritical fluid extraction and the simpler cold pressing (Vladic et al., 2020).

3. Objectives and expected results

The PhD research project pursues the main objective to enhance the diversity of food production through the application of sustainable technologies for developing new food products based on local ingredients and raw materials. Strategies for the food by-products and waste valorization to recover high added value bioactive compounds are applied on a lab scale with the opportunity to be transferred to pilot and industrial scale towards a circular economy approach.

Moreover, the PhD project focuses on sustainable techniques for the production as well as analytical characterization, both sensory and instrumental, of the new food products and ingredients. The research project is implemented according to the activities reported in the Gantt chart here below.

A1) Bibliographic research regarding the analytical characterization of food products obtained from different local raw materials. Research in the literature is also voted to the study of innovative and sustainable technologies for the valorization of food wastes and losses to recover valuable compounds.

A2) Sustainable food technologies: food raw materials, by-products and new food are prepared using local raw materials, ingredients and treated food by-products and waste. The bioactive compounds, to be incorporated in within the new formulations, are extracted using sustainable techniques (e.g. vacuum distillation, non-thermal drier, ...).

A3) Analytical characterization of food products: the instrumental and sensory evaluation of the new products is carried out to characterize them.

A4) Labelling of new and traditional food products.

A5) Writing and editing of research papers and final thesis.

Table 1. Gantt diagram showing the 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																			
A2) Sustainable food technologies																			
1) Vacuum distillation																			
2) Non-thermal drier																			
3) ...																			
A3) Analytical characterization of food products																			
1) Characterization of raw materials																			
2) Characterization of by products																			
3) Characterization of new food products																			
A4) Labelling																			
A5) Writing and editing of research papers and final thesis																			

4. Bibliografia

- Bradley E. L., Castel L., Chaudry Q. (2011). Applications of nanomaterials in food packaging with the consideration of opportunities for developing countries. *Trends Food Sci. Technol.* 22:604-610.
- Falcao M. A.; Fianco A. B.; Luca A. M.; Pereira M. A. A. , Torres F. C.; Vargas R. M. F.; Cassel E. (2012). Determination of antibacterial activity of vacuum distillation fractions of lemongrass essential oil. *Pytochem Rev* 11:405-412.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2020b). Biodiversity for food and agriculture and ecosystem services. Thematic study for the State of the World's Biodiversity for Food and Agriculture. Rome.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, IFAD, UNICEF, WFP, and WHO (2020). 2020 The state of food security and nutrition in the world. Transforming food systems for affordable healthy diets. Rome.
- Garn S. M and Leonard W. R. (1989). What did our ancestors eat? *Nutrition Review* 47:337- 345.
- Hedhili A., Lubbers S., Bou-Maroun E., Griffon F., Akinyemi B. E., Husson F., Valentin D. (2021). Moringa oleifera supplemented biscuits: Nutritional values and consumer segmentation. *S. Afr. J. of Bot.* 138: 406-414.
- Meyerding S. G. H.; Kurzdorfer A.; Gassler B. (2018) Consumer preferences for superfood ingredients. The case of bread in Germany. *Sustainability* 10: 4667.
- Tran D.; Broeckhoven I.; Hung Y.; Diem My N. H.; De Steur H.; Verbeke W. (2022). Willingness to pay for food labelling schemes in Vietnam: a choice experiment on water spinach. *Foods* 11:722.
- Vladic J., Gavaric A., Jokic S., Pavlovic N., Moslavac T., Popovic L., Matias A., Agostinho A., Banozic M., Vidovic S. (2020). Alternative to conventional edible oil sources: cold pressing and supercritical CO₂ extraction of plum (*Prunus domestica* L.) Kernel seed. *Acta. Chim. Slov.* 67:778-784.

Technological, sensory, and nutritional assessment of ecofriendly food lipids

Cesare Ravagli (cesare.ravagli2@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: XXXVII; Anno di frequenza: I

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

1. Curriculum

- Cesare Ravagli nasce a Pesaro il 26 dicembre 1997.
- Il 25 luglio 2019 consegue la Laurea in Tecnologie alimentari con voto di 106 decimi su 110 presso Alma Mater Studiorum – Università di Bologna Campus di Scienze degli Alimenti di Cesena in seguito a presentazione di relazione finale e conseguente superamento della prova. Titolo tesi: “Caratterizzazione di acque potabili nella regione Marche”. RELATORE: FAUSTO GARDINI; MATERIA: BIOLOGIA DEI MICRORGANISMI (SSD: AGR/16).
- Il 01 aprile 2020 vince il concorso come assegnista di borsa di ricerca presso Alma Mater Studiorum – Università di Bologna Campus di Scienze degli Alimenti di Cesena per il progetto denominato: "Valutazione dello stato ossidativo e dei composti minori di alimenti di diversa origine attraverso l'impiego di tecniche rapide e avanzate" (estremi Data inizio: 01/04/2021 Data fine: 01/12/2021).
- Il 26 Ottobre 2021 consegue la Laurea in Scienze e Tecnologie alimentari con voto 108 decimi su 110 presso Alma Mater Studiorum – Università di Bologna Campus di Scienze degli Alimenti di Cesena in seguito a presentazione di relazione finale e conseguente superamento della prova. Titolo tesi: “Attività antimicrobica di oli essenziali estratti da macroalghe brune e piante della costa adriatica orientale”. RELATORE: GIULIA TABANELLI CORRELATORE: FEDERICA BARBIERI; MATERIA: 29588 MICROBIOLOGIA AVANZATA E PREDITTIVA.
- Il 01 gennaio 2021 inizia il suo dottorato di ricerca tramite borsa di dottorato PON R&I 2014-2020, tematica vincolata Salute, Alimentazione e qualità della vita (Azione IV.5 GREEN), il tema di ricerca è Food science and Biotechnology, ed il titolo del progetto di dottorato è “Technological, sensory, and nutritional assessment of ecofriendly food lipids.”

2. Stato dell'arte

L'industria alimentare fa uso intensivo di oli, grassi e derivati sia di origine animale che vegetale per una miriade di prodotti diversi. A livello mondiale, nel 2014, sono stati consumati 165 milioni di tonnellate di sostanze grasse e la stima è che tale quantità arrivi a raddoppiare nei prossimi 30 anni. Dopo l'istituzione del Regolamento europeo 2019/649 (in modifica del precedente 1925/2006), l'industria alimentare ha dovuto per necessità porre attenzione particolare all'uso di grassi idrogenati per evitare l'uso di acidi grassi *trans* ed è cresciuto così il consumo di olio di palma. Nel 2011 in Italia sono state importate 77.000 tonnellate di olio di palma per uso alimentare che corrispondevano all'8,4% del totale importato, mentre oltre il 90% era destinato alla produzione di biocarburanti. L'importazione di questo grasso nel nostro paese è aumentata progressivamente passando da 40.000 tonnellate/anno nel periodo 2005-2008 a 75.000 nel 2009 e 76.000 nel 2010 (Dati ISTAT). Questo elevato consumo è legato sia alla sua produttività (4.5 tonnellate di olio/ettaro contro 1 tonnellata di olio/ettaro del girasole da olio) che alle sue caratteristiche tecnologiche. Questo olio è stato oggetto di critiche sia per gli aspetti nutrizionali che per quelli ambientali: i primi legati alla presenza di molecole di neofornazione tossiche, sono venuti meno grazie al miglioramento delle tecniche di produzione e di raffinazione che hanno portato ad avere valori comparabili di MCPD (Arris et al., 2020; Knutsen et al., 2018) per tutti gli oli raffinati. Gli aspetti ambientali sono stati affrontati con l'istituzione della Roundtable on Sustainable Palm Oil (RSPO) che è un multi-stakeholder capace di fornire e certificare olio di palma sostenibile. Sia per il fatto che l'olio di palma certificato è disponibile in quantità fissate e a prezzi incrementati, sia perché al consumatore è rimasta una certa diffidenza nei confronti di questo grasso, si è aperta una nuova pagina nell'approvvigionamento delle sostanze grasse per aumentare la sicurezza e la sostenibilità di questa filiera e di quelle ad essa collegate. Al netto di queste considerazioni e al fine di ridurre l'impatto ecologico, economico nonché etico dell'industria si rende necessaria la valorizzazione dei sottoprodotti da altre filiere (vitivinicola, cerealicola e del pomodoro) incrementando la sostenibilità del recupero di sostanze grasse anche in virtù del contenuto in composti bioattivi (tocoferoli e steroli in particolare). Importante quindi la messa a punto di miscele di oli e grassi da sottoprodotti, anche addizionati di altri grassi tal quali o frazionati, idonei a conferire alle formulazioni le caratteristiche complessive di sicurezza e la shelf life richiesta, con una particolare attenzione all'ossidazione lipidica. Particolarmente interessante è la possibilità di valorizzare i sottoprodotti del settore cerealicolo italiano come germe di riso e germe di grano tenero e duro, storicamente parte integrante della produzione agricola italiana. I dati ISTAT ci dicono che nel 2020 la produzione di grano duro in Italia è stata di circa 4 milioni di tonnellate, che deve essere degerminato nelle prime fasi della molitura. Il germe di grano rappresenta circa il 2% del peso della cariosside e contiene una quantità di

grasso estraibile pregevole (circa il 15%), con molecole di elevato interesse organolettico e industriale, come l'acido cis-linoleico (C18:2 cis, circa il 59.7% dei grassi totali) e l'insieme degli acidi grassi monoinsaturi (MUFAs, circa il 29% dei grassi totali) (Orsavova et al., 2015). Stessa considerazione può essere fatta per il germe di riso, residuo della pilatura del riso, che attualmente in Italia ammonta a circa 2,5 milioni di tonnellate l'anno (dati ISTAT); il germe di riso esattamente come il suo analogo di grano presenta una elevata quantità di acido linoleico, ma anche una pregevole quantità di acido palmitico (C16:0, circa il 20%) (Orsavova, 2015 et al.). L'agricoltura italiana, inoltre, produce anche grandi quantità di vinaccioli, dalla filiera enologica e di semi di pomodoro, dall'industria conserviera. Il primo è molto ricco di acidi grassi insaturi, così come di antiossidanti e risulta quindi piuttosto resistente agli stress termici tipici della frittura; il secondo, invece, oltre a licopene e beta carotene, contiene il 25 % di acido palmitico che, essendo saturo, ha un'ottima stabilità. Lo studio di queste matrici potrebbe portare all'elaborazione di miscele utili all'industria, in grado di ridurre gli sprechi di grassi "buoni" con conseguente incremento della sostenibilità della filiera, anche grazie alla riduzione dell'inquinamento causato dai trasporti.

3. Obiettivi e risultati attesi

Il presente progetto di ricerca si propone di studiare miscele di oli vegetali innovativi da impiegare in prodotti da forno (dolci e salati) in sostituzione agli oli comunemente usati oggi dall'industria alimentare (olio di palma e olio di oliva). Il progetto di tesi di dottorato può essere suddiviso nelle seguenti attività, riepilogate nel diagramma di Gantt riportato in Tabella 1:

A1) Studio di miscele di oli vegetali innovative;

- A1.1) Caratterizzazione compositiva e qualitativa degli oli ottenibili dalle filiere cerealicola, enologica e del pomodoro, anche in funzione della qualità e della tipologia della materia prima e delle condizioni di processo.
- A1.2) Formulazione di miscele di oli precedentemente caratterizzati, anche tramite frazionamento dei campioni di partenza;

A2) Produzione di prodotti da forno con le miscele di oli predisposte (OR1) e confronto con analoghi ottenuti con grassi attualmente in uso nell'industria alimentare;

A3) Valutazione delle caratteristiche reologiche, tecnologiche, nutrizionali, sensoriali e della sicurezza d'uso dei prodotti ottenuti;

A4) Valutazione economica e sostenibilità ambientale dell'impiego di miscele di olio alternative agli oli attualmente impiegati per la produzione di prodotti da forno;

A5) Valutazione di tecniche innovative per l'analisi dei prodotti ottenuti, nonché delle miscele al fine di costruire modelli utilizzabili a livello aziendale e di miglior qualità rispetto alle analisi tradizionali;

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>Studio di miscele di oli vegetali innovative</i>																			
1) Caratterizzazione compositiva e qualitativa degli oli ottenibili dalle filiere cerealicola, enologica e del pomodoro,																			
2) Formulazione di miscele di oli precedentemente caratterizzati, anche tramite frazionamento dei campioni di partenza																			
A2) <i>Produzione di prodotti da forno con le miscele di oli messi a punto</i>																			
1) Studio miscele di olio sostitutive dell'olio di palma																			
2) Produzione di prodotti da forno con suddetti oli																			
A3) <i>Caratterizzazione dei prodotti formulati</i>																			
A4) <i>Valutazione economica e sostenibilità ambientale dell'impiego di miscele di olio alternative</i>																			
A5) <i>Valutazione di tecniche innovative per l'analisi dei prodotti e delle miscele ottenute</i>																			
A6) <i>Ricerca bibliografica</i>																			

4. Bibliografia

Arris F.A., Thai V. T.S., Manan W.N., & Sajab M.S. (2020) A revisit to the formation and mitigation of 3-chloropropane-1,2-diol in palm oil production. *Foods*, 9, 1769.

Knutsen H. K., Alexander J., Barregård L., Bignami M., Brüschweiler B., Ceccatelli S. (2018) Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Update of the risk assessment on 3-monochloropropane diol and its fatty acid esters. *EFSA Journal*, 16.

Orsavova J., Misurcova L., Ambrozova J.V., Vicha R., Mlcek J. (2015) Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. *International Journal of molecular science*, 16, 12871-90.

Exploring the influence of redox chemistry as driver in precision winemaking

Guanghao Wang (email: guanghao.wang2@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: XXXVII; Anno di frequenza: I

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

1. Curriculum

Date of birth: 29/09/1994, Handan, China.

B.E., Biological Engineering, Polytechnic College of Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, China, 2012-2016.

M.E., Biological Engineering, College of Bio-Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, China, 2017-2020. Thesis: Study on the application of hydrogen isotope at specific site of ethanol in wine authenticity.

Ph.D. Food Science and Biotechnology, Department of Agricultural and Food Sciences, University of Bologna, Italy, 2021-present.

2. State-of-Art

The redox potential in winemaking has great influence on a large number of (bio)chemical reactions and therefore has a great impact on the final quality of the wine and its aging capacity (Killeen et al. 2018). The sensitivity of a wine to oxidation or reduction is variable over time and according to the oenological practices. These phenomena are at the origin of the improvement or deterioration of aromas, color (i.e. browning), etc. of wines, according to the level of mastery of oenological practices.

According to the Nernst Equation, the redox potential is determined by the ratio of oxidative state to reductive state at a fixed temperature, and its values can be modified by many redox active chemicals supplemented during wine fermentation or storage (Liu et al. 2017), which effect on the redox potential and wine quality need to be further investigated and explained. Besides oxygen, some commonly additives used in winemaking with potential redox activity include tannins, yeast extract, mannoproteins, glutathione, sulfur dioxide (SO₂) and ascorbic acid (Reg. EU 2019/934). In general, oxygen increases the redox potential whereas inert gases (e.g. nitrogen, carbon dioxide) reduce the redox potential, which level can be maintained by adjusting the ratio of mixed gases or by adding redox active compounds.

The early oxidation reactions are coupled through the redox cycling of iron between two oxidation states: oxygen oxidizes iron(II) to iron(III) while phenols reduce iron(III) back to iron(II). Low acidity accelerates the reaction of iron with oxygen, the rate-limiting step in oxygen reacting with wine (Nguyen and Waterhouse, 2021). Given that the activation of oxygen is catalyzed by an Fe(II)-tartrate complex and the dependence of oxygen uptake on the availability of iron(II) (Coleman et al. 2020), the capacity of wine to reduce iron(III) depends on its composition in nucleophiles (e.g. tannins, SO₂, glutathione, ascorbic acid, etc.), in particular the phenolic compounds of wine that are not equally oxidizable, the depletion of which could hinder further reactions.

During wine aging, two principal oxidants arise from the primary oxidation reactions, the quinones and aldehydes. Indeed, oxygen reacts with phenolic compounds and yields quinone and hydrogen peroxide; then, quinones react with nucleophiles such as tannin, SO₂, amino acid, thiols, and flavan-3-ols. In the absence of antioxidants, the quinones react with other substances, many being flavor molecules, and compromise some desirable flavors (Waterhouse et al. 2016). The second oxidation product, aldehydes, is dominated by acetaldehyde, responsible for the aroma of oxidation when these aldehydes accumulate in the absence of SO₂ (Cullere et al. 2011). Glutathione also react with acetaldehyde, but only partially, reducing, but not eliminating oxidation aromas (Peterson and Waterhouse, 2016).

3. Objectives and Milestones

The overall objective of this PhD project is to investigate the effect of redox reactions on wine composition in terms of colour components, other non-volatiles and volatiles compounds.

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

A1) Literature review about thermodynamics and kinetics of redox reaction in wine.

A2) Design of Experiment (DoE) as scientific approach to optimize the number of trials that later will be evaluated by statistical methods.

A3) Experimental trials on wine model solution to assess the electrochemical properties of individual reactants, e.g. tannin, yeast lees, mannoprotein, etc.

A4) Experimental trials on real wines - white, rosé and red - to improve their shelf-life depending on the type of antioxidant, packaging and storage conditions, assessed by physico-chemical and sensory analysis.

A5) Statistical analysis of results, both univariate and multivariate, to find optimal redox potential values where shelf-life of wines is favoured

A6) Writing and publication of doctoral theses, posters, scientific papers and oral presentations

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

Attività	Mese	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	
A1)	Literature review	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Literature study in wine redox	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A2)	Design of Experiment				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Selection of variables and levels to develop model system approach				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A3)	Experimental trials on wine model						■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	1) assess the electrochemical properties of individual reactants						■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	2) interactions between reactants									■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A4)	Experimental trials on real wines										■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	improve wine shelf-life depending on the type of antioxidant										■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A5)	Statistical analysis																			
	Univariate and multivariate approaches																			
A6)	Publication of manuscripts and thesis																			

4. Bibliography

- Killeen D.J., Boulton R.B., and Knoesen A. (2018) Advanced monitoring and control of redox potential in wine fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 69, 4, 394-399.
- Liu C.-G., Qin J.-C., and Lin Y.-H. (2017) Fermentation and redox potential. *Intech* 1-21
- REGULATION (EU) 2019/934 of 12 March 2019 supplementing Regulation (EU) No 1308/2013 of the European Parliament and of the Council as regards wine-growing areas where the alcoholic strength may be increased, authorised oenological practices and restrictions applicable to the production and conservation of grapevine products, the minimum percentage of alcohol for by-products and their disposal, and publication of OIV files. *Official Journal of the European Union* L 149, 1-52.
- Nguyen T.H., and Waterhouse A.L. (2021) Redox cycling of iron: Effects of chemical composition on reaction rates with phenols and oxygen in model wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 72, 209-216.
- Coleman R.E., Boulton R.B., and Stuchebrukhov A.A. (2020) Kinetics of autoxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Phys.* 153, 064503
- Cullere L., Ferreira V., and Cacho J. (2011) Analysis, occurrence and potential sensory significance of aliphatic aldehydes in white wines. *Food Chem.*, 127, 1397–140.
- Peterson A.L., Waterhouse A.L. (2016) H-1 NMR: A novel approach to determining the thermodynamic properties of acetaldehyde condensation reactions with Glycerol, (+)-Catechin, and Glutathione in model wine. *J. Agric. Food Chem.*, 64, 6869–6878

DOTTORANDI ISCRITTI AL II ANNO
(XXXVI CICLO)

Biotechnological valorization of residues and by-products from agro-food industries

Beatrice Cellini (e-mail: beatrice.cellini2@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: XXXVI; Anno di frequenza: II

Tutor: Prof.ssa Lucia Vannini; Co-tutor: Dott.ssa Giorgia Gozzi

1. Stato dell'arte

Secondo Eurostat (Agriculture, forestry and fisheries statistics, 2020), la produzione di alimenti, bevande e prodotti del tabacco ha generato nel 2018 nell'UE-27 circa 22,4 milioni di tonnellate di rifiuti sia pericolosi che non; tra questi si annoverano rifiuti derivanti da matrici animali e vegetali, fanghi, grassi e oli. Si tratta di circa 1,6 milioni di tonnellate in più rispetto al 2014. D'altra parte, basti pensare che i sottoprodotti che si originano dalla trasformazione di frutta ed ortaggi, come bagasse, bucce, rifilature, steli, conchiglie, crusca e semi, possono rappresentare più del 50% della materia prima. Ad oggi le destinazioni principali di riutilizzo sono la mangimistica o la produzione di energia e biocarburanti. Tuttavia, i rifiuti ed i sottoprodotti agro-alimentari sono estremamente ricchi da un punto di vista nutrizionale, in quanto possono essere caratterizzati dalla presenza, anche in quantità relativamente elevate, di proteine, lipidi, amido, micronutrienti e fibre alimentari; inoltre, molti composti sono dotati di bioattività agendo come antiossidanti, antimicrobici, antitumorali o hanno azione protettiva nei confronti di alcune patologie. Numerosi sono infatti gli studi inerenti la loro valorizzazione come ingredienti o come fonte di composti ad alto valore per l'ottenimento di alimenti fortificati o con specifiche caratteristiche qualitative e nutrizionali. Per quanto concerne i sottoprodotti vegetali, il loro utilizzo come ingredienti alimentari è stato valutato in quanto, avendo un elevato contenuto in fibra alimentare, presentano un effetto benefico non solo sulla salute del consumatore, ma anche per il miglioramento delle caratteristiche chimico-fisiche del prodotto in cui vengono addizionati (Pathania *et al.*, 2022). Per quanto riguarda i sottoprodotti del settore ittico, questi contengono polisaccaridi come chitosano che, essendo caratterizzato da attività antimicrobica ed antiossidante, è stato usato in forma di nanoparticelle per aumentare la shelf-life e prevenire fenomeni di ossidazione di carne macinata (Badawy *et al.*, 2020). Molto interessanti possono essere anche i sottoprodotti del melograno (bucce e residui della spremitura) (Lacivita *et al.*, 2021), della spremitura delle arance o della fava (*Vicia faba L.*) i quali risultano essere molto ricchi in composti bioattivi come tannini e flavonoidi considerati antimicrobici e antiossidanti (Mejri *et al.*, 2018).

Una possibile strategia per valorizzare le caratteristiche bioattive di questi sottoprodotti può essere quella di operare su di essi una fermentazione grazie a dei ceppi di lieviti e batteri lattici opportunamente selezionati sulla base di specifiche caratteristiche metaboliche (Aruna, 2019). A livello biotecnologico, la fermentazione su stato solido presenta delle potenzialità a livello industriale per essere sfruttata come parte di un processo di pre-trattamento per produrre composti bioattivi (antimicrobici, antiossidanti, nutraceutici) a partire da scarti e sottoprodotti agro-alimentari. L'industria alimentare è, ad oggi, alla continua ricerca di nuove strategie per estendere la shelf-life dei prodotti alimentari anche attraverso la sostituzione dei conservanti tradizionali con sostanze naturali o mediante produzioni sostenibili che vadano così a soddisfare il desiderio del consumatore di prodotti freschi e "naturali", mantenendo sempre gli standard di sicurezza, qualità e stabilità dell'alimento. Per di più l'utilizzo di queste sostanze può contribuire ad aumentare le caratteristiche funzionali e nutrizionali del prodotto.

2. Bibliografia

- Aruna TE (2019) Production of value-added product from pineapple peels using solid state fermentation, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 57: 102193.
- Badawy MEI, Lotfy TMR, Shawir SMS (2020) Facile synthesis and characterizations of antibacterial and antioxidant of chitosan monoterpene nanoparticles and their applications in preserving minced meat, *Int. J. Biol. Macromol.* 156: 127–136.
- Eurostat (2020) Agriculture, forestry and fisheries statistics- edizione 2020
- Lacivita V, Incoronato AL, Conte A, Del Nobile MA (2021) Pomegranate peel powder as a food preservative in fruit salad: a sustainable approach, *Foods* 10: 1359.
- Mejri F, Selmi S, Martins A, Benkhoud H, Baati T, Chaabane H, Nijm L, Serralheiro MLM, Rauter AP, Hosni K (2018) Broad bean (*Vicia faba L.*) pods: a rich source of bioactive ingredients with antimicrobial, antioxidant, enzyme inhibitory, anti-diabetic and health-promoting properties, *Food Funct.* 9(4): 2051–2069.
- Pathania S, Kaur N (2022) Utilization of fruits and vegetable by-products for isolation of dietary fibres and its potential application as functional ingredients, *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre* 27:100295.

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:

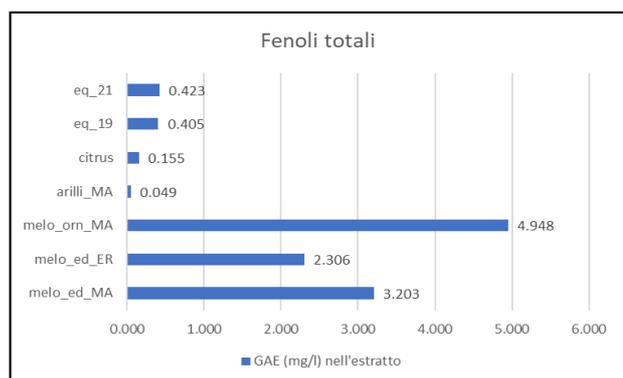
- A1) **Ricerca bibliografica**
- A2) **Caratterizzazione di sottoprodotti alimentari**, quali pastazzo di agrumi, sansa di olive, residui della lavorazione di frutta e verdura e di pesce; i sottoprodotti vengono valutati in sistema modello per alcuni caratteri di bioattività, ed in particolare la capacità antiossidante, antimicrobica, prebiotica. Valutazione anche delle proprietà tecnologiche quali formazione di gel, schiuma o capacità di trattenere acqua.
- A3) **Valorizzazione dei sottoprodotti attraverso fermentazioni guidate** con ceppi selezionati di lieviti e batteri lattici appartenenti alla Collezione di Colture Microbiche Industriali del Dipartimento. Si realizzano fermentazioni allo stato solido valutando la capacità dei ceppi di incrementare la bioattività dei sottoprodotti o di produrre metaboliti ad azione antimicrobica.
- A4) **Formulazione di alimenti con i sottoprodotti**: prodotti lattiero-caseari e da forno vengono formulati con l'aggiunta dei sottoprodotti tal quali o fermentati, e prodotti in scala da laboratorio. I prodotti così ottenuti sono analizzati durante la conservazione per valutare l'evoluzione del microbiota e delle caratteristiche qualitative e nutrizionali rispetto a prodotti di controllo di riferimento. Si realizzano inoltre dei challenge test con i microrganismi patogeni di riferimento per i diversi alimenti per verificare l'azione antimicrobica dei sottoprodotti quando impiegati come ingredienti alimentari.
- A5) **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																				
A2) Caratterizzazione dei sottoprodotti alimentari																				
Attività antimicrobica e antifungina																				
Attività antiossidante																				
Attività prebiotica																				
Caratteristiche tecnologiche																				
A3) Valorizzazione dei sottoprodotti attraverso fermentazioni guidate																				
Selezione dei microrganismi e dei ceppi																				
Fermentazione allo stato solido																				
Caratterizzazione funzionale delle matrici fermentati																				
A4) Formulazione di alimenti con i sottoprodotti																				
Formaggio fresco																				
Latte fermentato																				
Prodotti da forno																				
A5) Convegni, scrittura articoli e tesi di dottorato																				

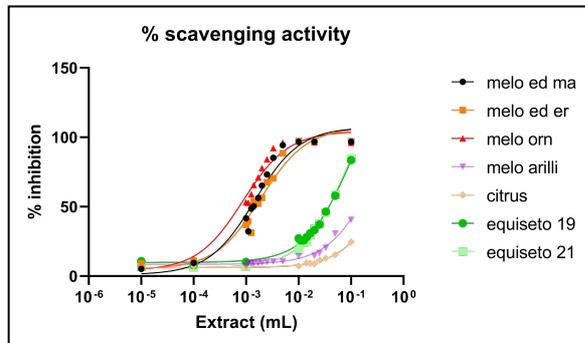
4. Stato di avanzamento della ricerca e principali risultati

Il presente progetto di ricerca si propone di valutare il possibile utilizzo di sottoprodotti del settore agro-alimentare, attualmente considerati uno scarto e quindi un costo di smaltimento per l'industria, valorizzandone alcune caratteristiche interessanti sia in materia di componenti nutrizionali, sia in termini di funzionalità, ad esempio, nel prolungamento della shelf-life del prodotto al quale vengono addizionati. La strategia adottata per tale scopo prevede l'utilizzo di tali matrici tal quali o a seguito di fermentazioni guidate ad opera di microrganismi selezionati al fine di incrementarne la bioattività.



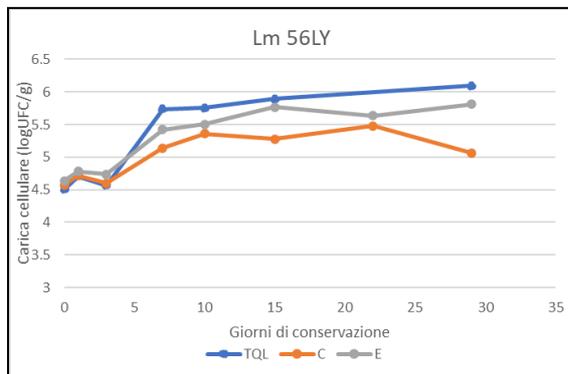
A seguito della ricerca bibliografica, in questa prima fase della ricerca, sono stati considerati per le analisi il pastazzo di agrumi - residuo della spremitura delle arance- e le bucce e gli arilli di melograno- residui della produzione dei succhi. Inoltre, si è deciso di includere l'*Equisetum arvense*, pianta infestante che viene comunque utilizzata in fitoterapia in quanto ricca di sali minerali e composti fenolici che le conferiscono attività antifungina. In particolare, sono stati presi in esame 2 diversi raccolti di *Equisetum arvense*, 2019 e 2021, (eq_19 e eq_21 rispettivamente), un campione di pastazzo di agrumi (citrus), bucce di melograno edibile raccolte in Emilia-Romagna (melo_ed_ER), bucce di melograno raccolte nelle Marche (melo_ed_MA), bucce e

arilli di melograno del tipo ornamentale raccolti nelle Marche (**melo_orn_MA**) e arilli ottenuti dalla spremitura del melograno (**arilli_MA**). Queste sostanze, una volta disidratate mediante essiccazione per l'equiseto o mediante liofilizzazione per le altre matrici, sono state polverizzate ed estratte. Gli estratti sono stati caratterizzati per il contenuto di fenoli totali mediante la tecnica del Folin-Ciocalteu, determinando un contenuto in fenoli nell'equiseto pari a 0.4 GAE (mg/l) con delle piccole differenze tra i due diversi raccolti. Per quanto concerne il sottoprodotto delle bucce di melograno, questo ha presentato un contenuto di fenoli che può arrivare anche a quasi 5 GAE (mg/l) nel caso del melograno ornamentale. Il campione di arilli e quello di citrus sono quelli che hanno mostrato il contenuto minore con rispettivamente 0.049 e 0.155 GAE (mg/l).



Di questi estratti è stata anche determinata la capacità "scavenging" nei confronti di DPPH (0.1mM) di cui è stato successivamente determinato l'IC50. I risultati sono in accordo con i dati ottenuti del contenuto fenolico in quanto i campioni con il più elevato contenuto di fenoli hanno presentato i minori valori di IC50. Tuttavia, proprio la presenza di un così elevato contenuto in sostanze fenoliche nei campioni di bucce di melograno rende il sottoprodotto difficile da incorporare direttamente in un alimento se non a seguito di un pre-trattamento di detannizzazione per ridurre la sensazione di astringenza.

È stata inoltre valutata l'attività antimicrobica di questi estratti nei confronti di alcuni ceppi di microrganismi patogeni considerati contaminanti di numerosi alimenti e di ceppi con attività probiotica; per i patogeni sono stati testati 2 ceppi di *Escherichia coli* (555 e ATCC25922), 2 ceppi di *Listeria monocytogenes* (56LY e ScottA) e 2 ceppi di *Salmonella enteritidis* (155 e 86), mentre tra i ceppi con attività probiotica sono stati considerati isolati di *Lactiplantibacillus plantarum* B391.4A, *Pediococcus pentosaceus* B392.2A ed *Enterococcus faecalis* B392.2B. L'insieme dei risultati dimostra una interessante attività antimicrobica degli estratti, evidenziando, sebbene con differenti intensità, effetti inibitori nei confronti di tutti i ceppi patogeni oggetto di studio. Al contrario, i microrganismi probiotici non hanno presentato una rilevante sensibilità agli estratti. Complessivamente, gli estratti di bucce di melograno sono risultati caratterizzati da un'attività maggiore rispetto alle altre sostanze prese in esame.



Due delle matrici precedentemente caratterizzate (pastazzo di agrumi ed equiseto) sono state utilizzate per la produzione di formaggi tipo "primo sale", a cui sono stati addizionati anche ceppi con attività probiotica. I formaggi così formulati sono stati usati per un challenge test contaminandoli deliberatamente con *Listeria monocytogenes* 56LY. I formaggi sono stati valutati durante una conservazione di 21 giorni in atmosfera ordinaria a 4°C per lo sviluppo della microflora naturalmente presente e per lo sviluppo del ceppo patogeno aggiunto. Dalle analisi microbiologiche è stato rilevato come lo sviluppo del patogeno è stato inibito di oltre 1 Log UFC/g dalla presenza di pastazzo di agrumi. Per quanto riguarda invece la carica dei batteri mesofili totali, nei primi giorni di conservazione non si è rilevata una sostanziale differenza tra i campioni di controllo e quelli contenenti il sottoprodotto, mentre a partire dal giorno 7, i campioni di controllo hanno presentato una carica di 2 Log UFC/g superiore agli altri, raggiungendo valori di 7.45 Log UFC/g che sono superiori alla soglia critica per la definizione della shelf-life microbiologica del prodotto.

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

Atti di convegno:

Cellini B, Gozzi G, Vannini L (2021) Valorisation of olive pomace and tomato by-products with selected yeasts strains, Proc. of 6th International Conference on Microbial Diversity 2021 - Advances in Microbial Diversity MD2021, San Casciano Val di Pesa, Firenze, Italy, SIMTREA, Società Italiana di Microbiologia Agro-Alimentare e Ambientale, 2021, pp. 55.

Vannini L, Gozzi G, Bruno V, **Cellini B** (2021) Valorization of agri-food by-products as functional ingredients for soft cheeses. Proc of 2nd International E-Conference on Nutrition and Food Science, 2021, pp. 21.

Gozzi G, **Cellini B**, Bruno V, Lanciotti R, Vannini L (2021) Valorisation of food by-products into functional "primo sale" cheese, Proc. 6th International ISEKI-Food Conference "Sustainable Development Goals in Food Systems: Challenges and Opportunities for the Future", 2021.

Cellini B. (2021) Biotechnological valorisation of residues and by-products from agro-food industries. Proc. of First Virtual (XXV) Workshop on the developments in the Italian PhD research on food science technology and biotechnology, University of Palermo, September 2021.

Studio e realizzazione di prodotti ittici innovativi attraverso l'applicazione di tecnologie di processo emergenti

Fabio D'Elia (e-mail: fabio.delia2@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: XXXVI; Anno di frequenza: II

Tutor: Prof. Marco Dalla Rosa; Co-tutor: Prof. Pietro Rocculi; Prof.ssa Santina Romani

1. Stato dell'arte

Grazie alla crescente domanda da parte dei consumatori di alimenti minimamente lavorati e con una shelf-life estesa, sia la ricerca scientifica che quella industriale stanno studiando l'applicazione di processi innovativi per garantire prodotti alimentari sicuri e di alta qualità. Tra le varie categorie alimentari, i prodotti ittici sono stati oggetto di un significativo aumento della domanda, grazie alle loro interessanti proprietà nutrizionali. L'ultima edizione del rapporto *The State of World Fisheries and Aquaculture* (SOFIA) prevede che entro il 2030 saranno prodotti 200 milioni di tonnellate di prodotti ittici totali, compresi quelli provenienti dall'acquacoltura e dalla pesca (con un aumento del 18% rispetto agli attuali livelli di produzione globale) (FAO, 2020). I prodotti ittici freschi sono altamente deperibili a causa della loro composizione biochimica. Per estenderne la shelf-life, potrebbero essere commercializzati prodotti ottenuti previo trattamento termico, che se da un lato fornisce un'inattivazione efficiente della carica microbica, dall'altro causa perdite significative di composti termolabili, e talvolta cambiamenti negativi nelle caratteristiche sensoriali, fisico-chimiche e nutrizionali degli alimenti. Al contrario, attraverso l'uso di trattamenti non termici emergenti, risulta possibile migliorare la qualità igienica e sanitaria dei prodotti evitando le modificazioni promosse dall'utilizzo delle alte temperature, oltre a ridurre i costi energetici associati a questa operazione tecnologica (Economou e Boziaris, 2021). In particolare, come riportato da diversi studi, attraverso l'utilizzo di tecnologie quali alte pressioni idrostatiche (HPP), ultrasuoni (US), luce ultravioletta (UV), luce pulsata (PL), irradiazione (IR), campi elettrici pulsati (PEF) e plasma freddo (CP), può essere possibile ottenere prodotti sicuri e di qualità superiore, se confrontati con quelli ottenuti con processi tradizionali (Economou e Boziaris, 2021; Olatunde e Benjakul, 2018). La tecnologia HPP si basa sull'applicazione di alte pressioni su alimenti confezionati in imballaggi flessibili, sia solidi che liquidi, attraverso un mezzo fluido. L'applicazione dell'HPP ai prodotti ittici è principalmente finalizzata a prolungare la loro shelf-life, minimizzandone le alterazioni della qualità e del valore nutrizionale durante la conservazione (Romulo, 2021). La tecnologia ad ultrasuoni (US) è considerata un trattamento semplice, economico e con ridotti consumi energetici. Nel settore ittico, questa tecnologia può essere utilizzata come pre-trattamento per operazioni successive come l'estrazione di specifici composti bioattivi, il recupero di molti componenti dai sottoprodotti, ma anche per migliorare le performances di operazioni successive quali disidratazione, scongelamento, filtrazione ed essiccazione (Economou e Boziaris, 2021). Il trattamento PEF si basa sull'uso di impulsi elettrici ad alto voltaggio e di breve durata su diversi biomateriali posti tra 2 elettrodi (Kotnik et al., 2019). Sono differenti le applicazioni del PEF nel settore dei prodotti ittici, ad esempio: migliorare la diffusione del sale nel muscolo del pesce e la capacità di reidratazione del pesce disidratato (Genovese et al., 2022); migliorare la capacità di trattenere l'acqua del pesce; intenerire la polpa di molluschi e accelerare il trasferimento di massa per migliorare il processo di essiccazione (Cropotova et al., 2021). L'attività di dottorato ha inoltre riguardato alcune applicazioni basate sul trattamento con plasma freddo (CP) per la decontaminazione dei prodotti alimentari, mostrando un buon potenziale nella riduzione della carica microbica grazie alla formazione di particelle cariche, radicali liberi, fotoni, specie chimiche reattive e radiazioni ultraviolette generate durante il trattamento. Il CP è stato riconosciuto come una promettente tecnologia di conservazione non termica per i prodotti ittici, grazie alla sua elevata efficacia di inibizione della crescita di diversi tipi di microrganismi anche se potrebbe causare fenomeni indesiderati come la più rapida ossidazione di lipidi e proteine (Olatunde et al., 2021). Alla luce di una ridotta consistenza a livello di letteratura scientifica attualmente disponibile sul tema, appare di rilevante importanza l'esplorazione dell'effetto delle suddette tecnologie emergenti applicate ai prodotti ittici in quanto attraverso l'uso di trattamenti non termici, può essere possibile non solo migliorare la qualità igienica e sanitaria dei prodotti, ma anche gli attributi di qualità, oltre a ridurre i costi energetici. Infine, nell'ottica dell'aumento della sostenibilità, questo approccio potrebbe risultare estremamente utile nel ridurre le perdite alimentari nonché l'impatto ambientale della produzione alimentare.

2. Bibliografia

- Cropotova, J., Tappi, S., Genovese, J., Rocculi, P., Laghi, L., Dalla Rosa, M., & Rustad, T. (2021). Study of the influence of pulsed electric field pre-treatment on quality parameters of sea bass during brine salting. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 70, 102706.
- Economou, S. I., & Boziaris, I. S. (2021). Non-Thermal Methods for Ensuring the Microbiological Quality and Safety of Seafood. *Applied Sciences*, 11(2).

FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Fao.

Genovese, J., Tappi, S., Tylewicz, U., D'Elia, F., De Aguiar Saldanha Pinheiro, A.C. and Rocculi, P. (2022), Dry-salted cod (*Gadus morhua*) rehydration assisted by pulsed electric fields: modelling of mass transfer kinetics. *J Sci Food Agric*.

Kotnik, T., Rems, L., Tarek, M., & Miklavčič, D. (2019). Membrane Electroporation and Electroporability: Mechanisms and Models. *Annual Review of Biophysics*, 48(1), 63–91.

Olatunde, O. O., & Benjakul, S. (2018). Nonthermal Processes for Shelf-Life Extension of Seafoods : A Revisit, 17, 892–904.

Olatunde, O. O., Shiekh, K. A., & Benjakul, S. (2021, May 1). Pros and cons of cold plasma technology as an alternative non-thermal processing technology in seafood industry. *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd.

Romulo, A. (2021). The impact of high-pressure processing treatment on microbial inactivation of seafood - a review. *Food Research*, 5(2), 38–44.

3. Obiettivi

In questo contesto, l'obiettivo di questo progetto di dottorato è quello di valutare l'efficacia di trattamenti non termici emergenti quali US, PEF, HPP e CP come operazione unitaria, o in combinazione tra loro, per l'aumento della shelf-life e/o delle *performances* di processo per la preparazione di prodotti ittici freschi e/o processati al minimo, esplorando le potenzialità di innovazione di processo/prodotto di tali tecnologie. Lo scopo del progetto è quindi quello di ottenere prodotti alimentari innovativi, non solo in termini di stabilità, ma anche con nuove caratteristiche reologiche, cromatiche e strutturali. La comprensione dei fenomeni che interessano i prodotti studiati è effettuata attraverso la valutazione dei cambiamenti chimico-fisici e microstrutturali delle matrici, seguendo i diversi parametri di processo per ogni tecnologia utilizzata. In questa direzione, questo progetto di ricerca di dottorato può essere suddiviso nelle seguenti attività, secondo il diagramma di Gantt riportato nella tabella 1:

A1) Ricerca bibliografica.

A2) Studio della matrice (analisi preliminari).

A3) Valutazione dei parametri di processo US e PEF per ottenere il processo più efficace per sviluppare prodotti ittici innovativi.

A4) Valutazione dei parametri di processo HPP e CAP per la riduzione della carica microbica e l'impostazione del processo più efficace.

A5) Preparazione di poster scientifici, articoli e tesi.

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

Activity	Month	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	
A1) <i>Ricerca bibliografica</i>		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A2) <i>Studio della matrice (analisi preliminari)</i>		■	■																	
A3) <i>Valutazione dei parametri di processo per ottenere il più efficace processo per sviluppare prodotti ittici innovativi</i>				■	■	■	■	■	■	■										
1) PEF, US				■	■	■	■	■	■	■										
2) Analisi qualitative				■	■	■	■	■	■	■										
3) Studi di <i>Shelf-life</i>											■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A4) <i>Valutazione dei parametri di processo per la riduzione della carica microbica e impostazione del processo più efficace</i>											■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1) HPP, CAP											■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2) Analisi qualitative e microbiologiche											■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
3) Studi di <i>Shelf-life</i>																				■
A5) <i>Preparazione della tesi, di poster e articoli</i>																				■

4. Stato di avanzamento della ricerca e principali risultati

Il presente progetto di ricerca si propone di valutare l'effetto di tecnologie emergenti non termiche sulle caratteristiche qualitative e microbiologiche di differenti specie ittiche. Di seguito sono riportate le ricerche condotte:

- Reidratazione di merluzzo salato a secco (*Gadus morhua*) assistita da campi elettrici pulsati;
- Valutazione dell'effetto dei campi elettrici pulsati sulle cinetiche di salagione di branzino fresco;
- Effetto del trattamento con plasma freddo sulla shelf-life di filetti di orata;
- Ottimizzazione di un processo innovativo di crio-affumicatura di salmone ;
- Utilizzo di campi elettrici pulsati per la modulazione del trasferimento di massa durante la salagione di filetti di salmone.

Lo studio sulla reidratazione del merluzzo salato ed essiccato (bacalà) è stato condotto con la finalità di ridurre i tempi di reidratazione in ambito industriale, processo che può richiedere anche fino a 5 giorni, con problemi di gestione delle

soluzioni di ‘ammollo’ e di elevato rischio in termini di qualità igienico-sanitarie per le industrie ittiche. Pertanto, il presente studio ha voluto indagare l'influenza di due pre-trattamenti PEF [PEF (1) 500 V cm⁻¹ e PEF (2) 1000 V cm⁻¹] sulla cinetica del trasporto di massa durante il processo di reidratazione del baccalà. Il processo di reidratazione è stato effettuato in condizioni statiche per 6 giorni, immergendo i campioni in acqua di rubinetto (5 ± 0,5 °C). I risultati ottenuti hanno mostrato come, grazie all'uso della tecnologia PEF, sia possibile aumentare la velocità del processo di reidratazione, modificando inoltre la ridistribuzione del sale. In generale, i campioni pre-trattati con PEF hanno mostrato un maggiore aumento di peso e una minore perdita di sale rispetto ai campioni di controllo durante il processo di reidratazione.

Nell'ambito dello studio relativo alla valutazione dell'effetto dei PEF sulle cinetiche di salagione di branzino fresco, è stato valutato l'impatto di differenti trattamenti a diverse intensità (0,3, 0,9 e 1,5 kV/cm) prima del processo di salamoiatore. Dopo 24, 96, 144 e 192 ore di conservazione refrigerata, sono stati determinati il peso, il contenuto in acqua, la percentuale di NaCl, l'attività dell'acqua e il contenuto in MDA/kg di prodotto nei campioni allo scopo di verificare la possibilità di accelerare il trasferimento di massa nella matrice, ed in secondo luogo per valutare l'effetto dei PEF sull'ossidazione lipidica. In base ai risultati ottenuti, si può affermare che le differenze riscontrate tra i campioni trattati con PEF e il campione di controllo sono state molto ridotte. A differenza di quanto emerso da studi precedenti, realizzati con il medesimo trattamento PEF e sulla stessa matrice, il pretrattamento con PEF non ha migliorato il rendimento in peso e acqua dei prodotti, né accelerato in modo significativo l'assorbimento di NaCl durante il processo di salamoiatore. Solo nei campioni trattati all'intensità di 0,9 kV/cm è stato osservato un aumento significativo del contenuto di sale rispetto al controllo, trascorse 192 ore dall'immersione in salamoia. Senza dubbio, queste discrepanze sono dovute alla variabilità della materia prima. Inoltre, si può ipotizzare che lo stato di *rigor mortis*, possa essere un fattore determinante delle differenze con le sperimentazioni precedenti. Tale parametro può sicuramente avere un effetto significativo sullo stato delle proteine e sulla loro polarizzazione ed interazione con le altre molecole polari presenti nel tessuto, all'applicazione di un campo elettrico.

Inoltre sono state condotte ricerche sull'effetto del trattamento con CP su filetti di orata, con lo scopo di valutare l'applicazione di tale tecnologia per estendere la shelf-life del prodotto confezionato in atmosfera modificata (80% N₂ e 20% CO₂). I campioni sono stati divisi in tre gruppi sperimentali, due dei quali rispettivamente trattati con aria (18 kV per 20 min), miscela di Argon (18 kV per 20 min) e un gruppo non trattato; per la generazione del plasma è stata utilizzata una sorgente con configurazione SDBD (*Surface dielectric barrier discharge*). Dopo confezionamento, i filetti sono stati sottoposti a conservazione refrigerata (4±1°C) per 14 giorni. Durante questo periodo sono state indagate le possibili differenze tra i tre gruppi sperimentali, in termini di caratteristiche qualitative (concentrazione percentuale di O₂ e CO₂, pH, contenuto in acqua, TBARS, *texture*, colore e variazione sensoriale). Dai risultati ottenuti è emerso un effetto protettivo del trattamento sulle caratteristiche chimico-fisiche, ad eccezione del mantenimento del colore ed un incremento dell'indice TBARS, entrambi strettamente dipendenti dallo stato ossidativo dei campioni, che sembra essere stato accelerato dall'applicazione del trattamento con plasma freddo. Sono necessari ulteriori studi che possano indagare l'utilizzo del plasma freddo come tecnologia sanificante a freddo, minimizzando l'effetto negativo dell'ossidazione sui prodotti ittici.

Al fine di migliorare il processo di salatura di filetti di salmone, è stato condotto uno studio sull'applicazione del PEF su campioni di salmone atlantico prima di sottoporli a salatura a secco. Sono stati utilizzati 4 diversi pretrattamenti PEF, per 2 differenti tempi (3 e 6 ore), e sono state indagate le possibili differenze in termini di fenomeni di trasferimento di massa (calo peso, assorbimento di sale e perdita d'acqua), attività dell'acqua, *texture*, colore e TBARS. L'applicazione di campi elettrici di 0,64 kV/cm, applicati su campioni di salmone poi sottoposti a salatura per 3 ore, ha favorito la diffusione del sale nei tessuti, permettendo il raggiungimento del livello target di NaCl nel prodotto (che negli altri casi si è verificato solo con una salatura di 6 ore). In tali campioni si è assistito anche ad una maggiore ritenzione idrica, ottenendo così un processo di salatura più efficace di quello normalmente applicato dall'industria. Il PEF non ha modificato parametri quali attività dell'acqua, *texture*, colore ed ossidazione lipidica nei campioni. Sono necessari ulteriori studi al fine di verificare la corrispondenza tra i dati ottenuti e quelli in letteratura riguardanti altre tipologie di matrici carnee, nonché la risposta a successive fasi di affumicatura/essiccazione e conservazione refrigerata.

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

- D'Elia F., De Aguiar Saldanha Pinheiro A. C., Di Gregorio C., Picone G., Tappi S., Capozzi F., Rocculi P., (2020) Innovative smoked salmon obtained by cryo-smoking. In 6th International Conference on Foodomics 2020
- Genovese, J., Tappi, S., Tylewicz, U., D'Elia F., De Aguiar Saldanha Pinheiro, A.C. and Rocculi, P. (2022) Dry-salted cod (*Gadus morhua*) rehydration assisted by pulsed electric fields: modelling of mass transfer kinetics. *J Sci Food Agric*.

Wine stability, implications of yeast mannoprotein additions prior bottling of wine

Cristian Galaz Torres (cristian.galaz2@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: XXXVI; Anno di frequenza: II

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

This Ph.D. thesis research project is aimed to setting up diverse experimental strategies on laboratory and winery pilot scale to identify the technological and organoleptic consequences of apply diverse doses of mannoprotein concentrate just prior to the last filtration of wine, understanding the role of mannoprotein concentrate and wine physicochemical characteristics to provide a guide to their selection and dosage and thus improve the quality of the wine.

1. State-of-the-Art

Yeast mannoproteins are highly glycosylated glycoproteins that contain about 80% of D-mannose associated with residues of D-glucose and N-acetylglucosamine, with a 10-20% of proteins. They present a wide range of molecular weights that can typically vary from 5 to 400 KDa, but even up to 800 KDa. Their location is in the external layer of the yeast cell wall and are connected to a matrix of amorphous β -1,3 glucan by covalent bonds, making up to 35-40% of the cell wall. There are two moments in vinification when they are released: During alcoholic fermentation and after yeast autolysis by exogenous β -1,3-glucanase enzyme, being this last group similar but with less protein content (Rodrigues et al., 2012).

Table 1 Enological properties of mannoproteins linked to a particular molecular weight.

Properties	Molecular weight (MW KDa)	Specific effect	Studied at
Inhibition of tartrate salt crystallization	30-50 kDa	Improve tartaric stability	WW
Interaction with flor wines	49 kDa	Velum formation and surface hydrophobicity	FW
Prevention of Haze	420 kDa	Decreasing the particle size of the haze	WW
Improving foaming	Enzymatic extracted 31,8 kDa	Heat-stability in the presence of them	WW
Mouthfeel and taste improving	Mild thermal extracted 10-21.5 kDa	Contribute to foam quality and stability	SW
Tannin precipitation	PS fraction of 13-93kDa*	Reduction of palate hotness and increasing of viscosity at higher pH	WW
Color stability	high-MW ~110 kDa	Reduction of proanthocyanidins	RW
	high-MW ~110 kDa	Possible stable color loss	RW

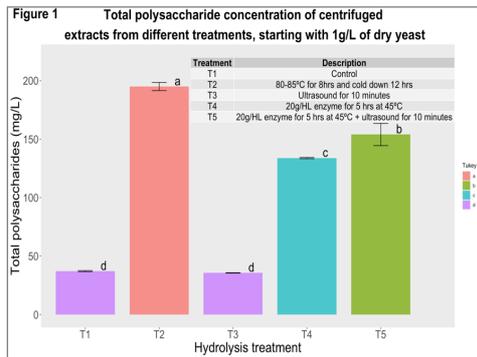
PS: polysaccharide; WW: White wine; FW: Flor wine; SW: Sparkling wine; RW: Red wine

*: Polysaccharide contains both grape and yeast polysaccharide

Commercial preparations of yeast mannoprotein were first authorized for their addition in white wine to improve its tartaric and protein stability in the early 2000s, but then, its use quickly spread to red wines for other proposes than well-known chemical stabilization, starting to be attractive due to its influence on technological and organoleptic effect on these wines. Within the already know enological properties of mannoproteins in wine production, the following can be named: Inhibition of tartrate salt crystallization, reduction of protein haze, stimulation of malolactic fermentation, wine enrichment during autolysis of lees, interaction with flor wines, yeast flocculation, and autolysis in sparkling wines, adsorption of toxic ochratoxin; interaction with aromatic compounds, color stabilization, reduction of astringency and increased body and mouthfeel sensations (Guadalupe and Ayestarán, 2008). Table 1 lists some of these properties linked to a particular molecular weight, range, or method of extraction, together with the specific effect and the type of wine where it has been studied (Caridi 2006; Gawel et al. 2016; Guadalupe et al., 2010; Núñez et al., 2006). Knowing that color is one of the most recognized aspects of red wine quality and together with mouth sensations strongly determine its overall quality (Merrell et al., 2018; Sacchi et al., 2005). Mannoprotein's presence in the wine matrix could play an important role by affecting for better or worse both aspects within the winemaking process. Technological and organoleptic implications of the use of mannoproteins added at the very end of the process, just before the last filtration remain to be deepen understood, and thus, this Ph.D. thesis Project will be directed to understand the role of the combination of the physicochemical characteristics of mannoprotein and the wine matrix to provide a guide to their selection and dosage prior to the last filtration, knowing the technological and organoleptic consequences, therefore improving the quality of the wine.

4. The research progress and principal results

Based on different studies found during the literature search, several preliminary tests for the extraction, characterization and quantification of mannoproteins under different conditions have been carried out:



For explorative extraction methodologies, three approaches based on thermal, enzymatic and ultrasonic techniques or a combination of the latter two were tested against a control. Polysaccharide extraction was performed from a 1 g/L suspension of dry yeast and quantified by the total polysaccharides method (Segarra *et al.* 1995). The best result with respect to total polysaccharides concentration in the supernatant after one week of contact with the model wine was the heat treatment at 80-85°C for 8 hours with 12 hours of cooling at room temperature, followed by enzymatic treatment with 20g/HL of Beta-Glucanase at 45°C for 5 hours plus ultrasound for 10 minutes, obtaining 195 mg/L and 154 mg/L respectively. In the same terms, the combination of enzymatic treatment and ultrasound had a better result than each one separately.

In parallel, eight commercial mannoproteins, specific for the pre-bottling phase of the wine and with different declared stability properties, were analyzed for their characterization.

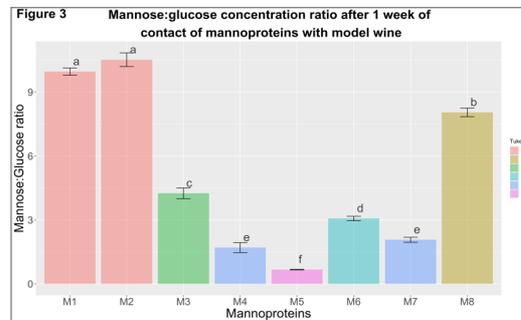
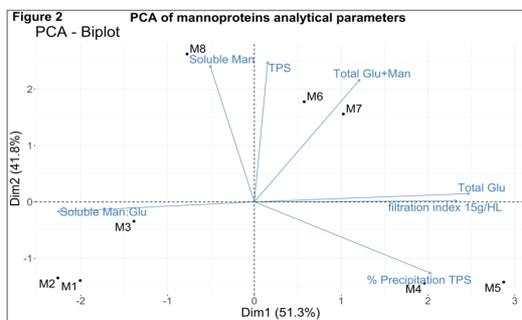
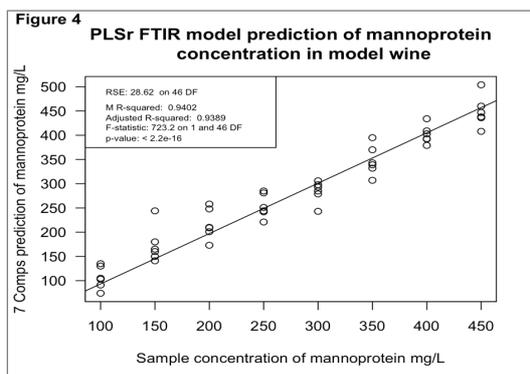


Figure 2 presents the principal component analysis of the eight mannoproteins with dimension 1 and 2 explaining respectively 51.3% and 41.8% of the variance. It can be seen the closeness of the mannoproteins as a function of total polysaccharides analysis (Segarra *et al.*, 1995), glucose and mannose concentration by enzymatic assay K-MANGL kit (Megazym) and modified filterability index test using a 0.65-micron cellulose acetate filter (G. Meglioli *et al.*, 1983) analyses, performed on suspensions and supernatants. It is observed that, the higher the concentration of glucose in the suspension, the lower the filterability, the higher the percentage of precipitation in terms of total polysaccharides and the lower the mannose:glucose ratio of mannoproteins supernatant. While in turn, the concentration of glucose in the suspension is neither related to the concentration of total polysaccharides in the suspension nor to the concentration of mannose in the supernatant. Therefore, a high glucose concentration in the raw mannoprotein could be a sign of less technological quality.

While Figure 3 shows the grouping of the same mannoproteins according to the mannose:glucose ratio in the supernatant after one week of contact with the model wine, simulating a real wine application and the characterization of their remaining mannoproteins once bottled. This information will be used for experiment planning, as the mannose:glucose ratio as well as molecular weight have been related to different types of wine stability (Ribeiro *et al.*, 2014).



For rapid quantification explorative techniques, a calibration curve from 100 to 450 mg/L was performed with the purest and most concentrated mannoprotein (M8) to then generate a predictive model of its concentration in model wine, using a spectrum generated by a Bacchus FTIR instrument from 950 to 3050 cm^{-1} and a Partial Least Squares Regression (PLSR) statistical analysis. Through a pre-treatment of the data with the Interval Partial Least Squares technique (IPLS), two segments of the spectrum (1092-1230 and 1377-1516 cm^{-1}) capable of reducing the root mean squared error (RMSE) were chosen, in order to perform the regression and achieve an R-squared of 0.94 with a RSE of 28.62 mg/L of the prediction.

Sustainability of technology, quality control and consumption of olive oil

Ilaria Grigoletto (email: ilaria.grigoletto2@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: XXXVI; Anno di frequenza: II

Tutor: Dott. Enrico Valli; Co-tutor: Prof.ssa Tullia Gallina Toschi

1. State of the art

In the Mediterranean basin, olive oil represents one of the main food products, since almost the 90% of the world production comes from this area, concentrating mainly on European countries like Spain, Italy and Greece, but also on others, such as Tunisia and Morocco. In the European Union, virgin olive oils (VOOs) can be classified in three commercial categories depending on their quality degree: extra virgin (EV), virgin (V) and lampante (L) (Reg. EC n. 2019/1604). The different quality level of each commercial category corresponds to a different value and, subsequently, to various price. Nowadays, one of the main worldwide challenges is the achievement of the 17 sustainable development goals, known as SDGs. Among these, it is important to mention the SDG 12, namely “responsible consumption and production”, and specifically the target 12.3, which focuses on the halve per capita food waste at the retail and consumer level by 2030 and reduce food losses along the food production and supply chains. In addition, Europe is trying to become the first continent with zero impact in 2050 and to do this the European Green Deal provides a roadmap promoting an efficient use of resources by moving to a clean, circular economy and to restore biodiversity and cut pollution. In the context of olive oil production and quality control, it is important to consider that most of the official analytical methods to assess the quality and genuineness of VOOs consist of time-consuming and complex procedures, often with the use of toxic chemicals and solvents which are dangerous for human health and the environment (Valli et al., 2016). For these reasons, there is a strong and growing demand for rapid, easy-to use and environmentally friendly analytical procedures. This could be possible by adopting techniques that do not require solvents at all, such as the determination of volatile compounds by gas-chromatographic techniques with headspace-solid phase microextraction (HS-SPME-GC), ion mobility spectrometry (HS-GC-IMS) or HS-Flash-GC (Quintanilla-Casas et al., 2020). It is well known that volatile compounds have a crucial role to determinate VOOs quality, since they are directly responsible for the olfactory notes, and the application of methods for their determination could be used as support for sensory analysis in the classification of VOO based on the quality grade (Quintanilla-Casas et al., 2020; Barbieri et al., 2020). In addition, olive oil production, as agro-industrial activity, in the Mediterranean area has a strong environmental impact, since it generates up to 30 million tons of waste per year, in which olive pomace is one of the principal by-products (Chandra and Sathiavelu, 2009). Agronomic factors, such as olive farming-systems, fertilization, irrigation, pests and diseases influence olive oil composition (Malheiro et al., 2014). Consequently, the adoption of sustainable agronomical practices can affect olive oil quality. Olive pomace is the main residue from the mechanical extraction of the olive oil from the olive fruits and it is composed of skin, pulp and stone pieces, water, and oil. The major problem related to olive pomace is that it contains organic compounds with phytotoxic properties, that are dangerous for the environment. Although olive mill wastes represent an important environmental problem, they also contain high added value molecules, such as phenolic compounds (Dermeche et al., 2013), widely recognised for their beneficial properties (e.g. antioxidant activity). For this reason, this by-product can be considered a natural and economic source of phenolic compounds and their valorisation as functional ingredients in pharmaceutical, cosmetic and food industries (Nunes et al., 2016) represents a promising sustainable strategy, especially with a view to circular economy.

2. Bibliography

- Barbieri, S., Cevoli, C., Bendini, A., Quintanilla-Casas, B., García-González, D.L., 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.
- Chandra, M. and Sathiavelu, S. (2009). Waste management in the olive oil industry in the Mediterranean region by composting. *Clean Technologies and Environmental Policy* 11: 293–298.
- Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry* 48: 1532–1552.
- European Commission. Reg. (EU) n. 2019/1604 amending Reg. (EU) n. 2568/91 of 27 September 2019 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. *OJ L* 250, 30.9.2019, 14–48.
- Nunes, M.A., Pimentel, F.B., Costa, A.S.G., Alves, R.C., Oliveira, M.B.P.P. (2016). Olive by-products for functional and food applications: challenging opportunities to face environmental constraints. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 35: 139–148.

- Malheiro, R.; Casal, S.; Baptista, P.; Pereira, J.A. (2014). How agronomic factors affects olive oil composition and quality. In De Leonardis (Eds) *Virgin Olive Oil: Production, Composition, Uses and Benefits for Man*. Nova Science Publishers: 118-141.
- Quintanilla-Casas, B., Bustamante, J., Guardiola, F., García-González, D.L., Barbieri, S., Bendini, A., Gallina Toschi, T., Vichi, S., Tres, A. (2020). Virgin olive oil volatile fingerprint and chemometrics: Towards an instrumental screening tool to grade the sensory quality. *LWT - Food Science and Technology* 121: 108936.
- Valli, E., Bendini, A., Berardinelli, A., Ragni, L., Riccò, B., Grossi, M., Gallina Toschi, T. (2016). Rapid and innovative instrumental approaches for quality and authenticity of olive oils. *European Lipid Science and Technology* 118: 1601–1619.

3. Objectives

Within the overall objectives 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**
- A2) **Olive pomace valorisation**: development of sustainable methods for the extraction of phenolic compounds from olive pomace, as well as characterization and shelf-life evaluation of the phenolic extracts.
- A3) **Rapid and sustainable analytical methods for quality and authenticity of virgin olive oils**: development and application of easy-to use, innovative and sustainable analytical approaches to evaluate the quality and genuineness of virgin olive oils.
- A4) **Comparative study of virgin olive oils** produced in experimental fields using sustainable and non-sustainable agricultural practices.
- A5) **Writing and editing of the PhD thesis, scientific papers, oral and/or poster communications.**

Table 1. Gantt diagram for this PhD thesis project

Activity	Months	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
A1)	Bibliographic research	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A2)	Olive pomace valorisation			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■				
	1) Development of sustainable extractions			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■				
	2) Characterization and shelf-life study								■	■	■	■	■	■	■				
A3)	Rapid and sustainable analytical methods																		
	1) Methods development																		
	2) Methods application																		
A4)	Comparative study of virgin olive oils																		
A5)	Thesis and paper preparation	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

4. Research progress and main results

This PhD project is focused on sustainability aspects in relation to technology, quality control and consumption of olive oils. In particular, rapid, easy-to-use and sustainable analytical approaches to assess the quality and genuineness of virgin olive oils (VOOs) with a reduced use in the laboratory of toxic chemicals or solvents and energy consumption are currently under investigation. The research has started from the application of rapid instrumental methods to evaluate the quality and genuineness of VOOs. These analytical approaches include analytical techniques for the determination of volatile compounds, such as Flash-GC and gas chromatography coupled with ion mobility spectrometry (HS-GC-IMS). In fact, the study of the volatile fraction shows a relevant potential to support the sensory analysis (panel test) for the determination of the commercial category of VOOs. For this reason, firstly, a bibliographic search was dedicated to the study of the volatile compounds in olive oil mainly related to the sensory attributes. In this context, HS-GC-IMS analyses were performed on an olive oil set composed of 119 samples, collected in order to have a relevant and balanced variety in the commercial categories of VOOs (among extra virgin, virgin and lampante) determined by sensory analysis (panel test). The samples were classified in the commercial category using a previously developed HS-GC-IMS prediction approach, based on a PLS-DA model (Valli et al., 2020). The results obtained are satisfactory in terms of percentage of correctly classified samples for the different commercial categories (see table 2).

Table 2. Results of the prediction model on the olive oil samples set.

COMMERCIAL CATEGORY	NUMBER OF SAMPLES CORRECTLY CLASSIFIED	%
EVOO	30/42	71.4
VOO	31/54	57.4
LOO	16/23	69.6
TOT	79/119	66.4

Other analytical methods were applied to this sample set, such as Flash-GC, for which the application of the statistical

models previously developed to predict the commercial category (Barbieri et al., 2020) is now in course. The final aim is to combine data obtained by these different analytical techniques (data fusion) for providing the most reliable instrumental methods and models to estimate the VOO quality grade as tools to support the panel test.

In addition, the development and application of rapid and sustainable analytical methods to evaluate the quality and genuineness of VOOs are consisting in the improvement of the analytical conditions of the methods currently in use (e.g. HS-GC-IMS). The study will be focused also on different data elaborations (e.g. images analysis of the heat maps obtained by HS-GC-IMS).

Finally, the same set of samples will be analysed by spectroscopic methods (e.g. NIR, FT-IR, Raman), during a 4-months visiting period at Queen's University Belfast planned possibly in the next months, with the aim to combine the results with those obtained with the gas-chromatographic techniques (Flash-GC and HS-GC-IMS), carrying out a data fusion using different chemometrics approaches. In particular, a focus on the rancid defect will be considered, since it is directly related to the oxidation status of olive oil, and subsequently to its quality.

Moreover, a research is in course aimed to the technological valorisation of olive pomace by obtaining sustainable extracts rich in phenolic compounds, potentially usable in different industrial sectors, such as pharmaceutical, food and cosmetic. This activity is carried out in the framework of the Prima project SUSTAINOLIVE "Novel approaches to promote the SUSTAINability of OLIVE cultivation in the Mediterranean" (Grant Agreement no. 813904), 2019 – 2023. Firstly, a bibliographic search regarding the extraction of phenolic compounds from olive oil by-products and their specific phenolic profile was carried out. Then, the research activity was addressed to the set-up of a sustainable method for the extraction of phenolic compounds reducing or avoiding the use of toxic solvents. For this reason, several tests have been carried out on the olive pomace provided by a local mill during the olive oil season 2020/21 and stored at -18 °C in the laboratory. Trials were performed by using solvents, such as ethanol, that are less toxic for the environment than the usual adopted for extraction, and applying techniques that could favour this process, e.g. ultrasound-assisted extraction. Then, the obtained extracts have been hydrolysed and analysed by UHPLC-DAD, in order to assess the tyrosol and hydroxytyrosol contents. Then, a spectrophotometric analysis of the total phenolic content was carried out (130.83 ± 1.77 mg gallic acid/g olive pomace).

Secondly, the valorisation of olive pomace, by developing an innovative and sustainable technology to obtain extracts rich in phenolic compounds, is currently continuing on olive pomace samples provided by the same local mill during the past olive oil season 2021/22. A mechanical approach (using a lab scale screw-press) was applied on the olive pomace by adding a mixture of water and food grade ethanol (80:20 % v/v) and two types of samples were obtained, one more liquid drained from the lower part of the mill and one drier from the frontal part. The study of the phenolic fraction, started during the academic year 2021/22 with the preliminary tests, will be carried out by HPLC analysis (UHPLC-DAD and HPLC-MS/MS) to reach a complete profiling of the phenolic fraction. Then, the research will continue with the set-up of the best technological conditions to obtain stable hydroalcoholic phenolic extracts (using food grade ethanol and water) and with the assessment of their stability during a shelf-life study.

Finally, in the frame of Prima project SUSTAINOLIVE, during the past and next olive oil seasons, a comparative study will be carried out between VOOs obtained in experimental fields in which sustainable agricultural practices are adopted and others in which they are not followed. The olive oil samples have been provided by three different countries (Italy, Greece, and Tunisia) in which farms, involved in the project, have been previously selected. Other variables, such as olive fruit variety, location, olives maturity, technology conditions of milling and storage, will be taken into account. The main aim is to investigate the effect of sustainable agricultural solutions in the olive oil quality by applying chemical and instrumental analyses, such as free acidity, peroxide value, specific extinctions in UV, fatty acids determination, total phenolic compounds spectrophotometric assessment, as well as sensory analysis.

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

Lazzarini C, Valli E, Casadei E, Grigoletto I, Ragni L, Bendini A, Gallina Toschi T (2021) A sustainable approach for the valorisation of a tomato by-product: green techniques for lycopene extraction, in: 6th International ISEKI-Food Conference, "Sustainable Development Goals in Food Systems: Challenges and Opportunities for the Future", 2021, pp. 142 (Online: Live and On-demand, 23-25 June 2021)

Grigoletto I, (2021) Sustainability of technology, quality control and consumption of olive oil, in: First Virtual Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology (Online, 14-15 September 2021).

Metabolomics to investigate the effects of treatments on food and of food consumption on health

Qiuyu Lan (email: qiuyu.lan@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: XXXVI; Anno di frequenza: II

Tutor: Luca Laghi; Co-tutor: Fausto Gardini

1. State-of-Art

With the growing demand for healthy and convenient foods with a long shelf life, alternatives to treatments based on thermal exchange or additives are increasingly desirable, to optimize the microbiological profile or physical and chemical characteristics of foodstuff.

Fermentation as a preservation technique, depends on the biological activity of microorganisms for production of a range of metabolites which can suppress the growth of undesirable microflora in foodstuffs. As an example, *Lactobacillus sakei* is often used for the natural fermentation of dry fermented meat sausages (Hugas, et al., 1993) because in meat environments it can outcompete undesired microorganisms, including pathogenic species (Chaillou, et al., 2013). The reason for its success relies on its wide genetic and phenotypic diversity. This makes it able to use a variety of substrates to obtain energy for survival (Coconcelli & Fontana, 2010) whenever its main source of energy, hexose, and pentose sugars, is depleted. A deeper knowledge of these mechanisms and features is helpful to optimize the use of this species at industrial level.

Microbiological profile and physic-chemical properties of foodstuff are increasingly adjusted by the application of physical non-thermal technologies. Among them, high hydrostatic pressures (HHP) have been demonstrated effective as a preservation technique of various foodstuff (Economou & Boziaris, 2021). The effect of HHP has been studied in a variety of fish and seafood matrices, among the most perishable food matrices, but results vary considerably depending on process parameters but also on specific product characteristics (Tsironi, et al., 2019).

To investigate the overall effects of the above-mentioned fermentation or physic non-thermal approaches on the characteristics of food, it is possible to rely on the study of its metabolome, the ensemble of its small organic molecules, shading light on the metabolism of its cells and of its microorganisms. Proton high-resolution nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) is one of the election analytical platforms for metabolomics investigation. Examples of its application can be traced in the work by Gao et al. (2022), who investigated the changes in the flavor, nutritional quality and functional characteristics of soymilk during fermentation, using ¹H-NMR metabolomics to monitor the metabolite profile of *Bacillus subtilis* BSNK-5-fermented soymilk. Lou et al. (2020) monitored metabolites change in fish models inoculated with *Shewanella baltica* during spoilage by ¹H-NMR. They found ¹H-NMR is a valuable tool to acquire information on quality changes in food under stress conditions.

Furthermore, the metabolome's changes of food have implications on human health upon eating (Johanningsmeier, et al., 2016). ¹H-NMR spectroscopy can provide significant information about connections between food composition and health, through biofluids observation (De Filippis et al., 2016). In fact, while it is accepted that the diet has a significant impact on a living creature health, the complete set of small molecule metabolites present in foods that make up the human diet and the role of food production systems in altering food metabolome are still largely unknown.

2. Bibliography

- Chaillou S, Lucquin I, Najjari A, et al. (2013) Population Genetics of *Lactobacillus sakei* Reveals Three Lineages with Distinct Evolutionary Histories. Plos One, 8(9): e73253.
- Coconcelli PS, Fontana CA. (2010) Starter Cultures for Meat Fermentation: Wiley-Blackwell, pp. 199–218.
- De Filippis F, Pellegrini N, Vannini L, et al. (2016) High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. Gut. 65(11): 1812-1821.
- Economou SI, Boziaris IS. (2021) Non-Thermal Methods for Ensuring the Microbiological Quality and Safety of Seafood. Appl. Sci. 11 (2): 833.
- Gao YX, Xu B, Fan HR, et al. (2020) ¹H NMR-based chemometric metabolomics characterization of soymilk fermented by *Bacillus subtilis* BSNK-5. Food Research International, 138: 109686.
- Hugas M, Garriga M, Aymerich T, et al. (1993) Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. International Journal of Food Microbiology, 18(2): 107-113.
- Johanningsmeier SD, Harris GK, Klevorn CM. (2016) Metabolomic Technologies for Improving the Quality of Food: Practice and Promise, Annual Review of Food Science and Technology, 7:413–438.
- Tsironi T, Anjos L, Pinto PIS, et al. (2019) High pressure processing of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets and tools for flesh quality and shelf life monitoring, Journal of Food Engineering, 262: 83-91.
- Lou XW, Zhai DD, Yang HS. (2020) Changes of metabolite profiles of fish models inoculated with *Shewanella baltica*

during spoilage. Food Control, 123: 107697.

3. Objectives

The project of the doctoral thesis may be divided into the following activities, summarized by the Gantt diagram reported in Table 1:

- A1) Literature review about latest research related to investigating the effects of stress conditions on the physiological response and metabolism of food-related microorganisms.
- A2) Set up and application of specific NMR SOP (Standard operation procedures).
- A3) Metabolomics-oriented experiments focusing on the consequences of treatments on food composition and quality.
- A4) Metabolomics-oriented experiments focusing on the relationship between food composition and health.
- A5) Writing and publishing the doctoral thesis, posters, scientific articles, and oral presentations.

Table 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) Literature review and Experimental design		■	■	■	■	■													
	1) preliminary studies in metabolomics	■																	
	2) experiment design		■	■	■														
A2) Set up and apply specific NMR SOP						■	■	■	■	■	■	■							
A3) Experiments focusing on the metabolites of food under treatments								■	■	■	■	■							
	1) read papers to select the most appropriate foods to investigate							■	■	■	■	■							
	2) assessments of the changes of metabolites with treatments												■	■	■	■	■	■	■
A4) Experiments focusing on the metabolites and health																			
	1) assessments of the changes of metabolites during processing																		
	2) assessments of the relationship between food composition and health																		
A5) To write and publish the doctoral thesis																			

4. Research progress and principal results

In the first year, I focused on studies about fermented food metabolome and tests allowing me to set up and apply specific SOP (standard operation procedures) designed to obtain information about fermented food characteristics. These works allowed me to gain confidence about the complete workflow needed to analyze ¹H-NMR data, through the creation of script developed in-house based on R computational language and on the application of ¹H-NMR specific software MNOVA (Mestrelab Research, S.L., Spain). The works had as an outcome the paper “Insights in the metabolomic diversity of *Latilactobacillus sakei*”, it describes the cultivation of five strains of different origins in a defined medium with glucose or ribose at two concentrations. The medium was analyzed through ¹H-NMR spectroscopy, to monitor amino acid consumptions and accumulation of organic acids and aroma compounds.

A second group of works, carried out in the academic year 2021/2022, revolved around metabolomics-oriented experiments focusing on the effect of high hydrostatic pressure (HHP) on metabolism of different seafood products, based on striped prawn (*Penaeus kerathurus*), rose shrimp (*Parapenaeus longirostris*) and grey mullet (*Mugil cephalus*). Three pressure levels (400, 500 and 600 MPa) were applied for 10 min. Metabolomics by ¹H-NMR and microbiological analyses were performed on the three seafood products during chilled storage, considering the end of the microbial shelf life when reaching a microbial load of 6 log cfu/g.

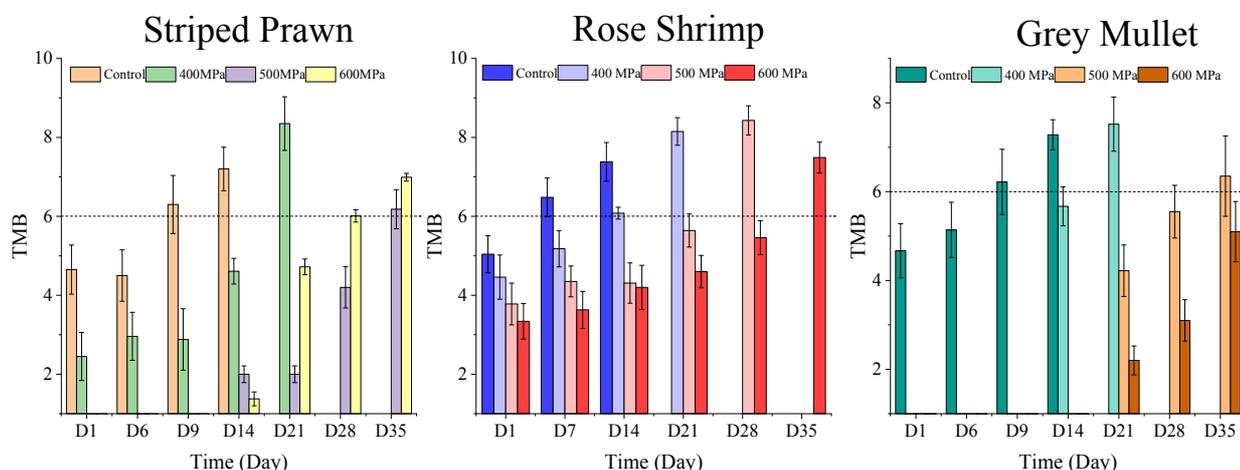


Figure. 1 Changes in microbial cell loads (log CFU/g) of total mesophilic bacteria (TMB) of packaged striped prawn, rose shrimp, and grey mullet in relation to the High Hydrostatic Pressure (HHP) treatments applied (400, 500, 600 MPa).

Total microbial count (Figure. 1) showed that and the application of 600 MPa allowed to extend the microbiological shelf life of seafoods up to 30 days. The application of lower pressures was able to inactivate *E. coli*, total Coliforms, sulfite reducing anaerobic bacteria (AB), *Pseudomonas* and positive coagulase staphylococci, however *Lactobacillus spp.*, *Pseudomonas spp.* and/ or total Coliforms were able to recover during storage of seafood (data not shown). On the other side, any treated sample showed lower viable counts throughout the storage compared to the untreated counterpart.

¹H-NMR spectra representative of striped prawn, rose shrimp, and grey mullet is shown in Figure 2. Signals from molecules derived from high fermentation activity, such as putrescine and cadaverine, were detected only at the end of shelf-life in untreated samples. Other molecules, such as acetate, pyruvate and acetoin, could be quantified along the entire storage period, with intensities showing different trends between treated and untreated samples. Some molecules, such as nucleotides, trimethylamine (TMA), and biogenic amines are related to the freshness of seafood. Moreover, some low-weight molecules are known to contribute to the specific taste of seafood, which is classified into umami, sweet, sour, and bitter. The freshness and taste related metabolites would provide novel insights into the freshness and taste quality of seafood as affected by high pressures suggested. The results suggested that the HHP processing slows down the degradation of nucleotides and amino acids and thus inhibits the decay of freshness and umami taste of seafood (data not shown).

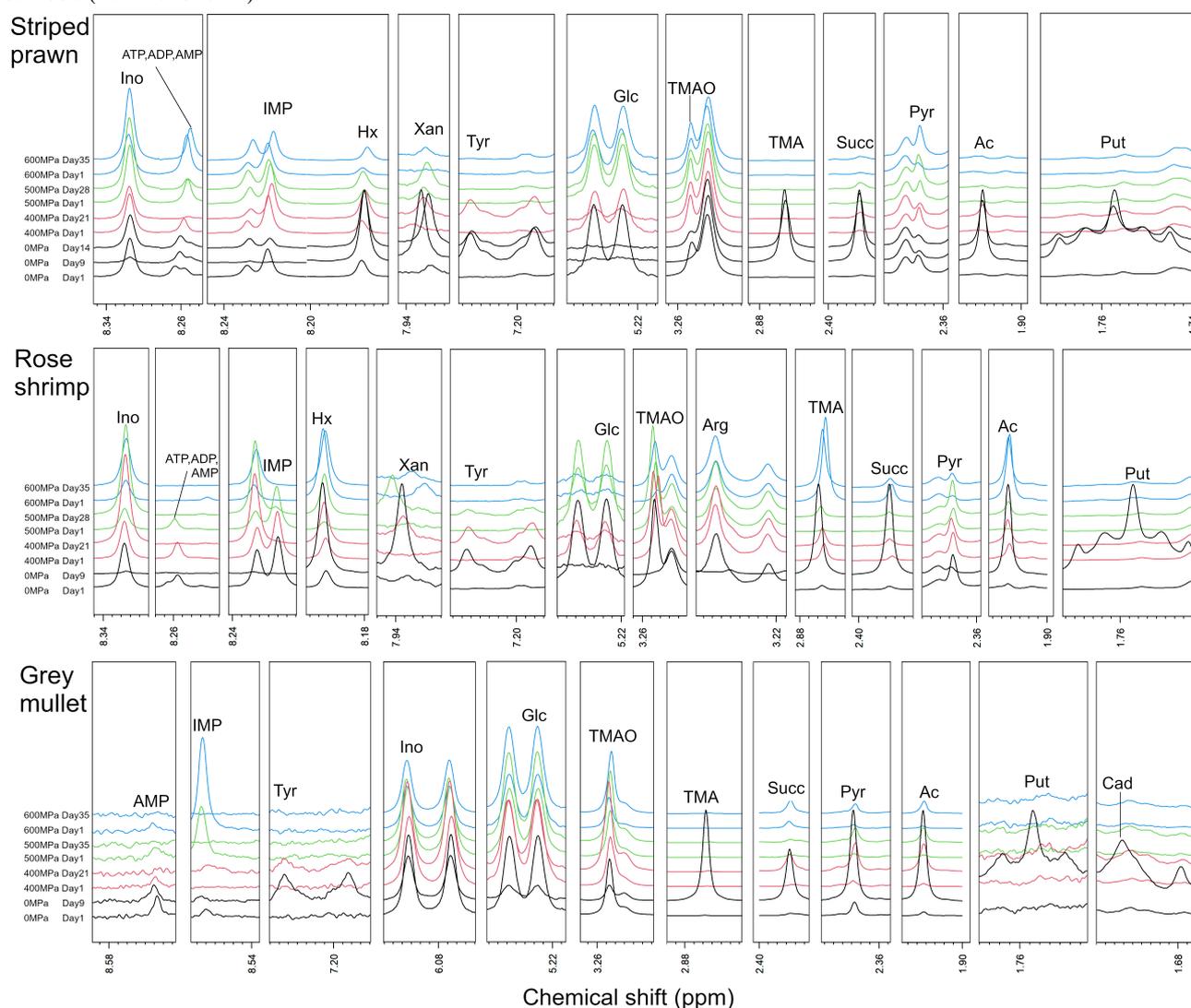


Figure. 2 A part of ¹H NMR spectra of tiger prawn, rose shrimp, grey mullet untreated and treated with HHP (400, 500, 600 MPa) during storage. Put, putrescine; Ac, Acetate; Pyr, Pyruvate; Succ, Succinate; TMA, Trimethylamine; TMAO, Trimethylamine N-oxide; Glc, Glucose; Xan, Xanthine; Ino, Inosine; Hx, Hypoxanthine; Cad, Cadaverine; Tyr, Tyramine; Arg, Arginine; ATP, adenosine-5'-triphosphate; ADP, adenosine-5'-diphosphate; AMP, adenosine-5'-monophosphate; IMP, inosine-5'-monophosphate.

5. Publication produced during the PhD activities

Barbieri, F.; Laghi, L.; Montanari, C.; Lan, Q.; Levante, A.; Gardini, F.; Tabanelli, G. (2022) Insights into the Metabolomic Diversity of *Lactobacillus sakei*. *Foods*, 11, 477.

2Three manuscripts are being drafted on the effect of HHP on metabolism of seafood during chilled storage.

DOTTORANDI ISCRITTI AL III ANNO
(XXXV CICLO)

Isolamento e caratterizzazione di batteri lattici autoctoni: ricerca di nuovi possibili candidati starter funzionali o colture bioprotettive

Federica Barbieri (email: federica.barbieri16@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: XXXV; Anno di frequenza: III

Tutor: Prof. Fausto Gardin; Co-tutor: Dott.ssa Giulia Tabanelli, Prof.ssa Lucia Vannini

1. Stato dell'arte

L'attuale aumento della popolazione mondiale pone una forte pressione sulla disponibilità delle risorse energetiche ed alimentari a livello globale. La risposta a questa evidenza deve passare attraverso un'ottimizzazione delle rese produttive, con una riduzione dei rifiuti e degli sprechi alimentari (Hoff, 2011). L'approccio Nexus promuove la riduzione degli sprechi e l'uso efficiente delle risorse energetiche come importante strategia per garantire la sicurezza alimentare e la sostenibilità dell'intero sistema produttivo, in un'ottica di economia circolare. Inoltre, la degradazione degli alimenti, con conseguente diminuzione della sicurezza e della qualità microbiologica, è considerata dal Comitato per la Sicurezza Alimentare della FAO (2015) uno dei principali fattori responsabili dell'incremento di questi sprechi in tutte le fasi della filiera produttiva. Il miglioramento della qualità degli alimenti e l'incremento della loro shelf-life richiedono lo sviluppo di nuove soluzioni "green" e strategie mirate e adattate alle caratteristiche peculiari dei diversi prodotti. Queste soluzioni devono necessariamente andare incontro alla richiesta dei consumatori di prodotti naturali e innovativi, sicuri e con ottime proprietà nutrizionali e sensoriali. Tra i diversi approcci, gli studi si sono concentrati verso tecniche rispettose dell'ambiente basate sulla bioconservazione e sulla bioprotezione. Nel primo caso vengono impiegati composti bioattivi naturali con una marcata attività antibatterica e antiossidante, mentre nel secondo caso sono utilizzate colture bioprotettive, al fine di ridurre la proliferazione di microrganismi degradativi e/o patogeni, ottenendo un prolungamento della shelf-life. Ad oggi, i composti bioattivi derivanti da sottoprodotti di piante aromatiche o da matrici vegetali secondarie possono rappresentare una valida alternativa naturale e sicura agli additivi sintetici (Calo et al., 2015). Un limite di queste applicazioni nell'industria alimentare, però, potrebbe essere rappresentato dal conseguente impatto organolettico. Tuttavia, la combinazione di tali composti con strategie alternative potrebbe ridurre la concentrazione utilizzata. In particolare, i batteri lattici (LAB), oltre ad essere utilizzati come colture starter per le loro proprietà tecnologiche, possono svolgere anche un'attività di bioprotezione grazie alla loro attitudine a competere con la microflora spontanea e alla produzione di specifici metaboliti ad azione antimicrobica (batteriocine), senza esercitare effetti negativi sulle caratteristiche organolettiche degli alimenti (Chikindas et al., 2018). Nelle industrie alimentari è ormai comune l'uso di colture starter al fine di controllare i processi fermentativi e ottenere prodotti standardizzati. Di contro, questo, insieme alla poca varietà di ceppi commercializzati, porta ad un inevitabile appiattimento delle tipicità dei prodotti, riducendone la riconoscibilità e le peculiarità. Esistono tuttavia produttori locali che basano ancora l'ottenimento dei loro prodotti su processi fermentativi spontanei, che costituiscono un'importante eredità culturale fortemente legata all'origine e al territorio di produzione. Questi alimenti offrono l'opportunità di esplorare le complesse dinamiche che interessano le componenti microbiche responsabili di questi processi. La biodiversità che ne risulta, non solo per quanto riguarda le specie presenti, ma a livello di biotipo, rappresenta una grande riserva da cui attingere per l'isolamento di nuovi ceppi da utilizzare come colture starter. Lo screening delle loro proprietà tecnologiche e funzionali è fondamentale per la loro applicazione mirata come colture autoctone, in grado di determinare una differenziazione dei prodotti che si riflette sulla tipicità e riconoscibilità organolettica, oltre che di garantire qualità e sicurezza igienico-sanitaria.

2. Bibliografia

- Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC (2015) Essential oils as antimicrobials in food systems - A review, *Food Control* 54:111-119.
- Chikindas ML, Weeks R, Drider D, Chistyakov VA, Dicks LM (2018) Functions and emerging applications of bacteriocins, *Curr Opin Biotechnol* 49:23-28.
- FAO (2015) Global initiative on food loss and waste reduction - "Save food", Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Hoff H (2011) Understanding the Nexus. Background Paper for the Bonn 2011 Conference: The Water, Energy and Food Security Nexus. Stockholm, Sweden: Stockholm Environment Institute (SEI).

3. Sviluppo della ricerca

La ricerca è stata sviluppata secondo i seguenti punti principali:

- 1) Caratterizzazione di salami fermentati spontaneamente provenienti da diversi Paesi Europei (Italia, Slovenia, Spagna e Croazia).

- 2) Isolamento ed identificazione di ceppi di batteri lattici da salami fermentati spontaneamente e caratterizzazione dei biotipi per quanto riguarda la loro sicurezza e le loro proprietà bioprotettive e tecnologiche.
- 3) Studio *in vitro* degli effetti di composti naturali (estratti vegetali e oli essenziali) con attività antimicrobica per inibire lo sviluppo di microrganismi patogeni e ammino produttori.
- 4) Applicazione delle strategie di bioprotezione (colture bioprotettive e composti bioattivi) in sistemi reali per incrementare la shelf-life e migliorare la qualità microbiologica degli alimenti: salsicce fresche, prodotti carnei fermentati (salami) e prodotti ready-to-eat (frutta di VI gamma).

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 di diversi salami fermentati spontaneamente				■	■	■	■	■											
A3) Isolamento ed identificazione di LAB e loro screening a livello di sicurezza e tecnologico					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■					
1) isolamento ed identificazione molecolare di ceppi isolati da salami fermentati spontaneamente					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■					
2) caratteristiche di sicurezza: determinazione dei profili di antibiotico resistenza e ricerca dei geni correlati e della capacità di produrre ammine biogene								■	■	■	■	■	■	■					
3) valutazione dell'attività antimicrobica <i>in vitro</i> verso microrganismi degradativi e/o patogeni e ricerca dei geni codificanti le batteriocine								■	■	■	■	■	■	■					
2) caratterizzazione tecnologica dei ceppi ritenuti sicuri: performance di crescita/acidificazione a diverse temperature di incubazione e concentrazioni di sale, produzione di molecole d'aroma ed elaborazione dei dati ottenuti attraverso modelli di microbiologia predittiva										■	■	■	■	■					
A4) Studio degli effetti di composti naturali con attività antimicrobica verso microrganismi degradativi e/o patogeni											■	■	■	■	■				
1) caratterizzazione di composti bioattivi ottenuti da prodotti di scarto di origine vegetale e studio delle loro proprietà antimicrobiche																			
2) studio <i>in vitro</i> di composti bioattivi per inibire lo sviluppo di microrganismi patogeni o ammino produttori e impiego della citometria di flusso per valutare le risposte cellulari agli stress applicati																			
A5) Applicazione delle strategie di bioprotezione in sistemi reali																■	■	■	■
1) impiego di colture bioprotettive selezionate e composti bioattivi per l'incremento della shelf-life e il miglioramento della qualità microbiologica dei prodotti e challenge test verso i principali patogeni alimentari																			
2) impiego di colture selezionate utilizzate come starter per la produzione di prodotti carnei fermentati (salami)																			
3) caratterizzazione dei prodotti ottenuti e studi di shelf-life																			
A6) Preparazione della tesi e di articoli		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

4. Principali risultati

Il presente progetto di ricerca si propone di valutare e sviluppare nuovi approcci per il prolungamento della shelf-life e il miglioramento della sicurezza e qualità microbiologica di prodotti freschi (salsicce) o fermentati (salami), attraverso l'uso di colture bioprotettive o di starter funzionali e/o composti bioattivi naturali con proprietà antimicrobiche e antiossidanti. In particolare, nel primo anno del presente progetto di tesi le analisi si sono concentrate sulla caratterizzazione microbiologica, chimico-fisica e di sicurezza di 15 salami fermentati spontaneamente provenienti da 4 diversi Paesi Europei: Italia, Slovenia, Spagna e Croazia. Inoltre, le indagini molecolari hanno messo in evidenza una biodiversità microbica ancora marcatamente presente in prodotti artigianali, che riflette infatti le peculiarità locali e i legami con il territorio. La grande variabilità riscontrata ha permesso di valorizzare il patrimonio genetico microbico di questi prodotti tradizionali utilizzati nello specifico come fonte di isolamento di ceppi di batteri lattici, possibili candidati per essere applicati nelle industrie come promettenti colture starter o bioprotettive autoctone. In particolare, sono state isolate 826 colonie di presunti batteri lattici a partire dalle piastre ottenute a seguito del campionamento microbiologico. Gli isolati, una volta purificati, sono stati caratterizzati geneticamente attraverso analisi repPCR ed un rappresentante di ogni biotipo riscontrato è stato identificato a livello tassonomico, utilizzando sia tecniche PCR specie-specifiche sia il sequenziamento del gene rRNA 16S (Figura1).

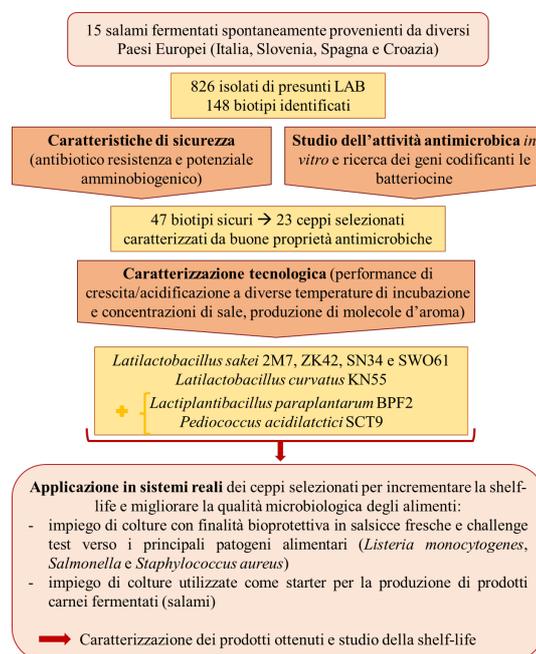


Figura 1: Schematizzazione dei principali task del progetto di tesi.

Le indagini hanno permesso di evidenziare come in generale *Latilactobacillus sakei* (62.2%) e, in misura minore, *Latilactobacillus curvatus* (26.4%) fossero le specie più comunemente associate alla fermentazione della carne. La distribuzione dei biotipi però variava da salame a salame: i campioni italiani e sloveni erano caratterizzati da una bassa biodiversità, al contrario dei campioni spagnoli e croati in cui è stata registrata una maggiore biodiversità sia a livello di numerosità dei biotipi presenti che di specie. In particolare, i campioni spagnoli erano caratterizzati dalla presenza della specie *Companilactobacillus alimentarius* (riscontrata ad una percentuale del 8.1%), che si configura come una particolarità microbiologica dell'area geografica di produzione di questi salami. Nella fase successiva del lavoro, i 148 ceppi identificati sono stati studiati per quanto riguarda alcuni aspetti di sicurezza, quali il profilo di antibiotico resistenza e la capacità di produrre ammine biogene (AB), per escludere la presenza di tali caratteri che pregiudicano il loro utilizzo nelle industrie. I risultati degli antibiogrammi hanno mostrato una diffusa resistenza alla streptomicina mentre per altri antibiotici (gentamicina, kanamicina e tetraciclina) i valori di resistenza riscontrati risultavano estremamente variabili in relazione sia alla specie che ai ceppi testati, alcuni dei quali erano caratterizzati anche da resistente multiple. Per quanto riguarda la determinazione delle AB, tutti i ceppi appartenenti alla specie *Lat. sakei* hanno dato esito negativo per gli amminoacidi testati (tirosina, istidina, lisina e ornitina), mentre alcuni ceppi di *Comp. alimentarius* e *Lat. curvatus*, prevalentemente di origine spagnola, erano in grado di produrre tiramina, putrescina e/o istamina. L'aspetto sicuramente interessante è che alcune di queste caratteristiche di sicurezza si sono dimostrate essere fortemente legate all'origine geografica degli isolati (maggiore incidenza di resistenza agli antibiotici e di capacità di produrre AB nei ceppi isolati da prodotti spagnoli e croati), ad indicare un effetto delle condizioni ambientali nell'esercitare una pressione selettiva sulle comunità microbiche e sui loro metabolismi (Figura2).

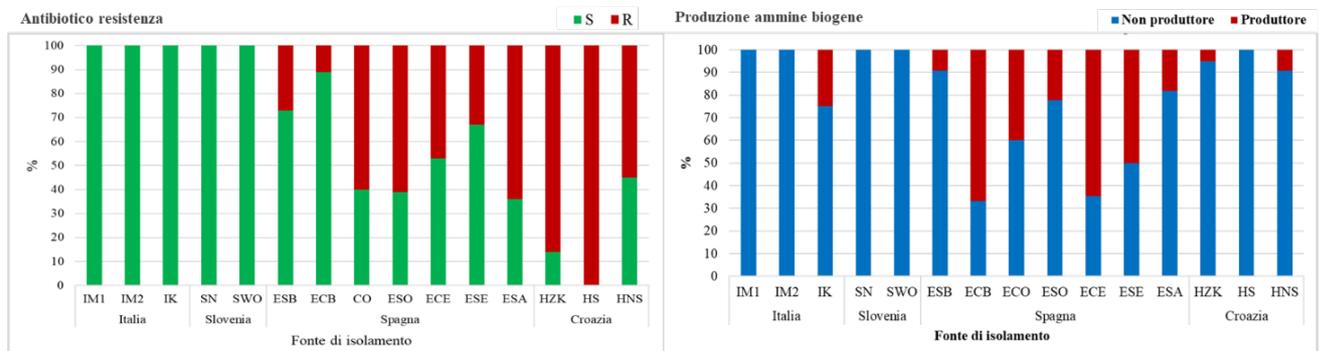


Figura2: Distribuzione dell'antibiotico resistenza e della produzione di ammine biogene nei ceppi analizzati, divisi per fonte di isolamento. I risultati sono riportati come % di resistenti/positivi (rosso) sul totale.

I ceppi che sono risultati sensibili agli antibiotici precedentemente testati e incapaci di produrre AB sono stati caratterizzati anche per alcuni aspetti funzionali, come la potenziale attività antimicrobica, testata *in vitro*, verso ceppi di *Escherichia coli* e *Listeria innocua* (Figura_3). I migliori risultati sono stati osservati nei ceppi di origine croata e indagini ulteriori hanno dimostrato che tale attività potrebbe essere dovuta alla capacità di produrre batteriocine, poiché molti di questi ceppi erano caratterizzati dalla presenza di uno o più geni codificanti per la produzione di sakacina e curvacina. Sulla base dei risultati ottenuti è stato possibile selezionare un gruppo di 23 ceppi appartenenti alle specie *Lat. sakei* e *Lat. curvatus*, considerati sicuri e promettenti da un punto di vista applicativo, grazie alla loro spiccata attività antimicrobica verso microrganismi degradativi e/o patogeni. Tali ceppi sono stati valutati a livello tecnologico per quanto riguarda il loro potere acidificante e le loro performances di crescita a diverse temperature di incubazione e in presenza di diverse concentrazioni di sale, al fine di selezionare i migliori candidati da utilizzare su scala industriale come colture starter e/o bioprotettive, in grado di garantire qualità e sicurezza agli alimenti e al contempo attribuire ai prodotti tradizionali le loro peculiari caratteristiche. Come prevedibile, all'aumentare della concentrazione di sale o al diminuire della temperatura i risultati hanno evidenziato una riduzione delle cinetiche di crescita, caratterizzate da una velocità di sviluppo ridotta e un incremento della fase lag. Questi parametri, comunque marcatamente variabili, non sembravano essere legati all'origine dei ceppi. Inoltre, uno dei biotipi testati non era in grado di crescere alla temperatura di incubazione più bassa (10°C), a dimostrare come queste performance tecnologiche siano fortemente dipendenti dal ceppo piuttosto che dalla specie considerata. Infine, è stata studiata anche l'attitudine dei biotipi nel produrre composti d'aroma, inoculandoli in un sistema reale (un impasto carneo simulante un salame), per valutare una possibile azione nell'influenzare il profilo organolettico dei prodotti finiti. Questo profilo presentava una significativa variabilità nella composizione in molecole d'aroma in relazione al ceppo testato. In particolare, alcuni ceppi erano caratterizzati da uno scarso accumulo di questi composti, rendendoli possibili candidati come colture bioprotettive per via del loro basso impatto organolettico.

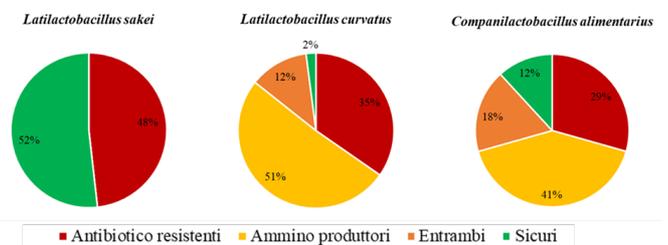


Figura3: Percentuale dei ceppi di LAB classificati in base ai loro aspetti di sicurezza come sicuri, antibiotico resistenti, ammino produttori o entrambi.

Un altro aspetto considerato in questo progetto di dottorato consiste nello sfruttare sottoprodotti di origine vegetale come risorse di composti bioattivi con conseguente riduzione degli sprechi alimentari attraverso la valorizzazione di materie prime non convenzionali. Nel corso del progetto di ricerca di cui il mio dottorato fa parte, sono stati ottenuti estratti fenolici (EF) e oli essenziali (EO) dai sottoprodotti di lavorazione di alcune piante tipiche della macchia mediterranea e in particolare dalle foglie di mora (*Rubus fruticosus*) e dagli aghi di ginepro (*Juniperus oxycedrus*). Questi EF e EO sono stati poi testati *in vitro* per valutare il loro effetto sullo sviluppo di microrganismi patogeni e ammino produttori, possibili contaminanti alimentari (*Listeria monocytogenes* ed *Enterococcus faecium*). In particolare, sono state studiate le cinetiche di crescita di questi microrganismi in presenza dei EF e EO, addizionati ad una concentrazione sub-letale, e la risposta fisiologica cellulare a questo tipo di stress. In generale, i risultati hanno mostrato una maggiore efficacia da parte degli EO nell'ostacolare la crescita dei microrganismi target, rispetto agli EF (Figura4).

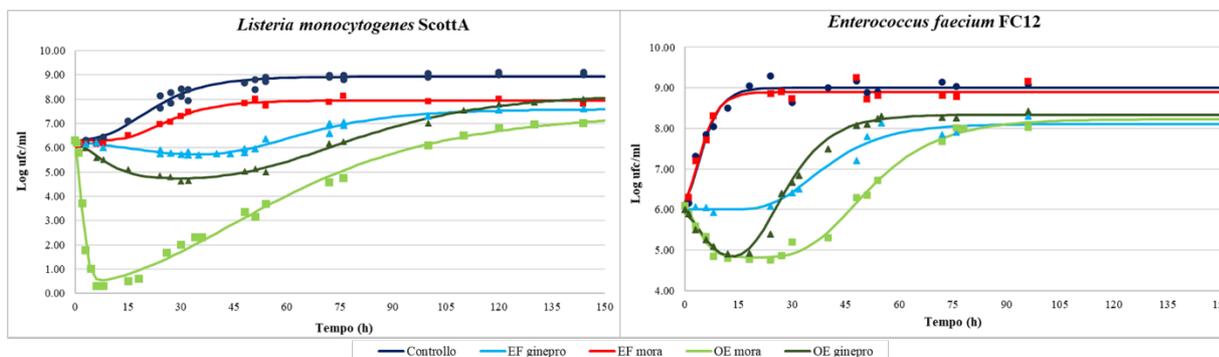


Figura4: Cinetiche di crescita di *L. monocytogenes* ScottA e *Ent. faecium* FC12 in relazione alla presenza degli EF e degli EO di foglie di mora e aghi di ginepro.

L'EF di mora non è stato in grado di inibire significativamente la crescita dei due microrganismi testati, mentre la presenza dell'EF di ginepro ha indotto un prolungamento della fase di latenza di *Ent. faecium* e causato una lieve decrescita in *L. monocytogenes*, seguita da uno sviluppo che ha portato a concentrazioni cellulari di 1 log inferiori al controllo. Questo andamento ha caratterizzato in maniera più evidente i campioni addizionati con gli OE, che si sono dimostrati più efficaci nel ridurre le cinetiche di crescita di entrambi i microrganismi target. In particolare, l'OE di mora ha determinato un'importante perdita di coltivabilità nelle popolazioni microbiche fin dalle prime ore di incubazione. Tuttavia, le cellule hanno mostrato la capacità di riprendere in seguito la propria attività metabolica e una fase di moltiplicazione attiva, seppur raggiungendo un carico cellulare al di sotto di quello dei controlli. Queste osservazioni sono state confermate dalle analisi citofluorimetriche. Anche nel caso dell'EO di mora, i dati ottenuti hanno messo in evidenza come i danni cellulari indotti sono stati per lo più sub-letali e temporanei, evidenziando comunque una percentuale cospicua di cellule danneggiate. Inoltre, i campioni di *Ent. faecium* FC12, noto produttore di tiramina e 2-fenilettilammina, sono stati valutati anche per l'effettivo accumulo di AB: come prevedibile, i composti naturali non hanno compromesso la capacità del microrganismo di produrre queste molecole, ma rallentandone la crescita, ne hanno ritardato di conseguenza l'accumulo.

I risultati hanno dimostrato che gli OE rappresentano un promettente impiego come conservanti naturali e saranno quindi caratterizzati attraverso analisi gas-cromatografiche per evidenziare la presenza di molecole a riconosciuto effetto antimicrobico. Tuttavia, la sola presenza di questi composti potrebbe non bastare per inibire la proliferazione microbica, rallentandola solamente. Sulla base di queste osservazioni, i futuri trial in sistemi reali prevederanno l'applicazione di strategie combinate, come ad esempio l'aggiunta di più composti naturali di diversa origine o di colture bioprotettive, al fine di massimizzare l'effetto di questi composti e sfruttare eventuali effetti sinergici.

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

- Barbieri F, Laghi L, Gardini F, Montanari C, Tabanelli G (2020) Metabolism of *Lactobacillus sakei* Chr82 in the presence of different amounts of fermentable sugars, *Foods*, 9:720.
- Barbieri F, Tabanelli G, Montanari C, Dall'Osso N, Šimat V, Smole Možina S, Baños A, Ozogul F, Bassi D, Fontana C, Gardini F (2021) Mediterranean spontaneously fermented sausages: spotlight on microbiological and quality features to exploit their bacterial biodiversity, *Foods*, 10:2691.
- Barbieri F, Laghi L, Montanari C, Lan Q, Levante A, Gardini F, Tabanelli G (2022) Insights in the metabolomic diversity of *Lactobacillus sakei*, *Foods*, 11:477.
- Montanari C, Barbieri F, Gardini F, Tabanelli G (2021) Competition between starter cultures and wild microbial population in sausage fermentation: a case study regarding a typical Italian salami (Ventricina), *Foods*, 10:2138.
- Tabanelli G, Barbieri F, Montanari C, Gardini F (2019) Application of natural antimicrobial strategies in seafood preservation. In Ozogul Y (Ed) *Innovative technologies in seafood processing*, Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, Chapter 12.
- Tabanelli G, Barbieri F, Campedelli I, Venturini MC, Gardini F, Montanari C (2020) Effects of bioprotective cultures on the microbial community during storage of Italian fresh filled pasta, *Food Control*, 115:107304.
- Tabanelli G, Barbieri F, Soglia F, Magnani R, Gardini G, Petracci M, Gardini F, Montanari C. Safety and technological issues of dry fermented sausages produced without nitrate and nitrite. Submitted to *Food Res Int.*

4. Principali risultati

Il presente progetto di ricerca si propone di valutare l'effetto di alimenti, componenti alimentari o integratori sul microbiota intestinale umano grazie al modello intestinale *in vitro* MICODE. In particolare, di seguito saranno descritti i risultati ottenuti da: i) uno studio finalizzato a valutare il potenziale prebiotico della crusca di canapa, un potenziale integratore prebiotico; ii) uno studio volto ad esplorare l'impatto sul microbiota intestinale umano di salami riformulati con antiossidanti e acido ascorbico come sostituti dei nitriti.

Per quanto riguarda il primo studio, la fermentazione colonica *in vitro* con MICODE è stata utilizzata per studiare il potenziale prebiotico della crusca di canapa (HB) e della crusca di canapa trattata con alcalasi (HBPA). In particolare, al fine di comprendere i potenziali benefici per la salute di HBPA, è stato adottato un approccio interómico che accoppia la genomica microbica (qPCR e Sequencing Illumina) e la metabolomica (SPME GC-MS).

I risultati mostrati in **Figura 1** hanno evidenziato una riduzione della ricchezza microbica (numero di OTU osservate), la cui causa può essere trovata nel passaggio dalla condizione *in vivo* a quella *in vitro*. Al contrario, l'abbondanza (Chao 1) per HBPA era significativamente più alta alla fine della fermentazione ($p < 0.05$), mentre una riduzione non significativa è stata osservata per HB o FOS. Sono stati osservati picchi di uniformità (Shannon) per HB ($p > 0.05$) e HBPA ($p < 0.05$), ma non sono stati osservati cambiamenti nella dominanza (Simpson) ($p > 0.05$).

La diversità tra i campioni (diversità beta) è stata esaminata con l'analisi Bray-Curtis ed ha indicato la capacità di mantenere una condizione di eubiosi in seguito alla fermentazione di entrambi i campioni HB e HBPA, con una capacità di HBPA maggiore rispetto a HB.

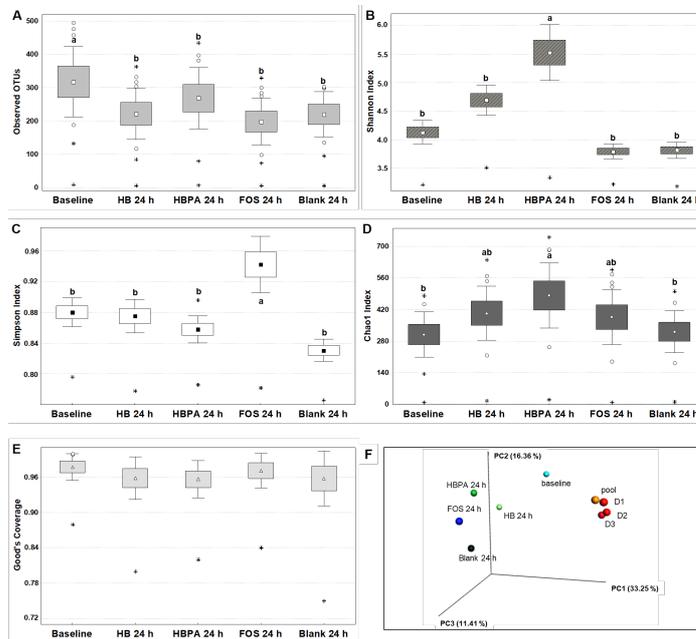


Figura 1. Diversità alfa e beta del microbiota. A – E = indicatori di alfa diversità; F = beta diversità Bray Curtis PCoA. ^{ab} Lettere differenti indicano una significatività statistica Student's t-test ($p < 0.05$).

Al fine di valutare il potenziale prebiotico di HB e HBPA, è stato utilizzato il qPI (qPCR Prebiotic index), un'equazione basata su valori di quantificazione espressi come Log₁₀ cell/mL. Considerando i risultati (**Figura 2**), il substrato fermentato con la migliore attività prebiotica era FOS dopo 18 ore e il secondo classificato era HBPA dopo 24 ore.

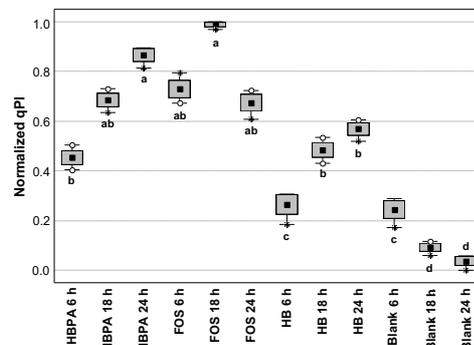


Figura 2. qPCR Prebiotic Index (qPI) a diversi time points. ^{abcd} Lettere differenti indicano significatività statistica da Tukey's honestly significant differences (HSD) test ($p < 0.05$).

Per analizzare, invece, i principali cambiamenti nei metaboliti microbici correlati al potenziale prebiotico, è stato considerato lo shift dei carichi dalla baseline (BL) all'endpoint (24 h) di 10 molecole con bioattività rinomata nell'uomo. Dai risultati mostrati nella **Figura 3A**, la concentrazione di acidi organici è aumentata con HB, HBPA e FOS, mentre nel controllo bianco (Blank) non è stata registrata alcuna variazione.

La capacità dell'HBPA, una volta fermentato, di liberare più SCFA dell'HB potrebbe essere dovuta alla maggiore disponibilità di peptidi/proteine a MW inferiore e alla maggiore preferenza di fermentazione di questi substrati da parte di *Lactobacillales* e *Bifidobacteriaceae*.

Il secondo set di metaboliti ha mostrato un andamento diverso per i substrati rispetto al controllo bianco (**Figura 3B**). L'abbondanza di indolo è aumentata con HB, HBPA e FOS ma è diminuita nel controllo bianco. Al contrario, fenolo, p-cresolo, benzaldeide e 2,4-(DTBP) sono stati ridotti con HBPA e parzialmente con HB, mentre aumentati con il controllo bianco. Gli shift registrati dalle fermentazioni con FOS e HBPA rispetto alla baseline (linea rossa) hanno indicato un leggero aumento dell'indolo e una riduzione dei metaboliti (fenoli) correlati alla degradazione dei grassi e delle proteine animali.

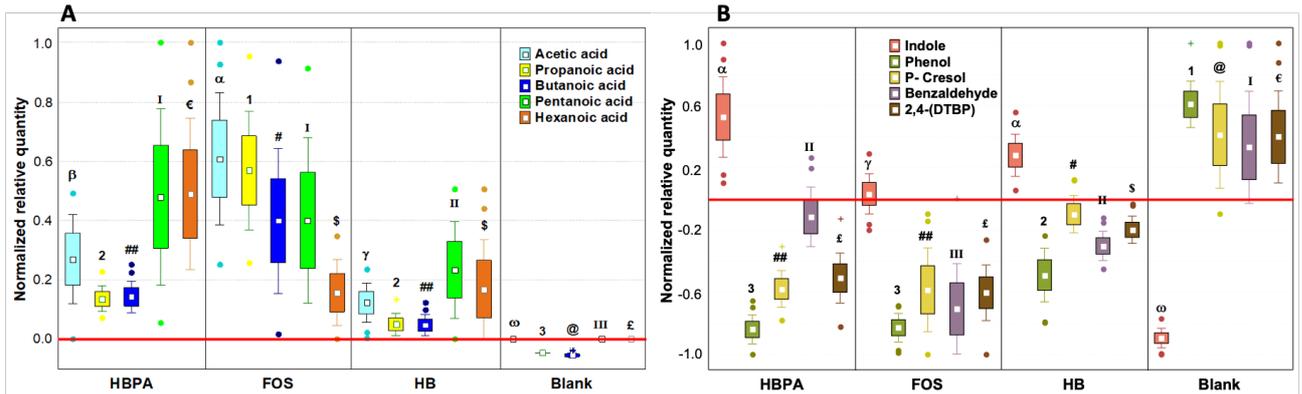


Figura 3. Shift dell'abbondanza relativa di metaboliti microbici benefici (A) e di metaboliti potenzialmente tossici (B), espressi come abbondanza relativa rispetto alla baseline dopo 6, 18 e 24 h di fermentazione. I casi con lettere o numeri o simboli differenti all'interno di una singola variabile indipendente sono significativamente differenti per Tukey's HSD test ($p < 0.05$)

Per quanto riguarda, invece, il secondo studio, la fermentazione colonica *in vitro* con MICODE è stata utilizzata per studiare gli effetti sul microbiota intestinale di salami riformulati sostituendo i nitriti con acido ascorbico e antiossidanti vegetali. I risultati mostrati in **Figura 4A** mostrano l'incremento degli acidi organici dopo la fermentazione colonica dei salami rispetto alla baseline. Durante la fermentazione, la formulazione con acido ascorbico (SA) produce circa 7 volte acido acetico e circa 4 volte acido pentanoico ed esanoico. La formulazione con mix antiossidanti e acido ascorbico (SMA), invece, produce ridotte quantità di ciascuno dei composti prima citati, mentre il controllo con nitriti (CNO2) produce la più alta quantità di acido butanoico, pentanoico ed esanoico.

I risultati mostrati in **Figura 4B** mostrano, invece, la capacità delle formulazioni SA, SMA e CNO2 di produrre meno sostanze potenzialmente tossiche rispetto al controllo senza nitriti (CO). Le formulazioni SMA e CNO2 producono in modo simile ($p > 0.05$) circa 6 volte meno questi metaboliti rispetto al controllo CO ($p < 0.05$). Al contrario, il benzotiazolo è prodotto maggiormente in seguito alla fermentazione di CNO2 rispetto a CO2, probabilmente a causa della presenza di nitriti, i quali stimolano nel colon la crescita di batteri solfato-produttori, che producono dimetil disolfato e contribuiscono così alla formazione di composti tossici, come il benzotiazolo. In particolare, la formulazione SMA si è dimostrata in grado di ridurre la produzione di molecole dannose ad un livello comparabile a quello osservato con l'utilizzo dei nitriti (CNO2).

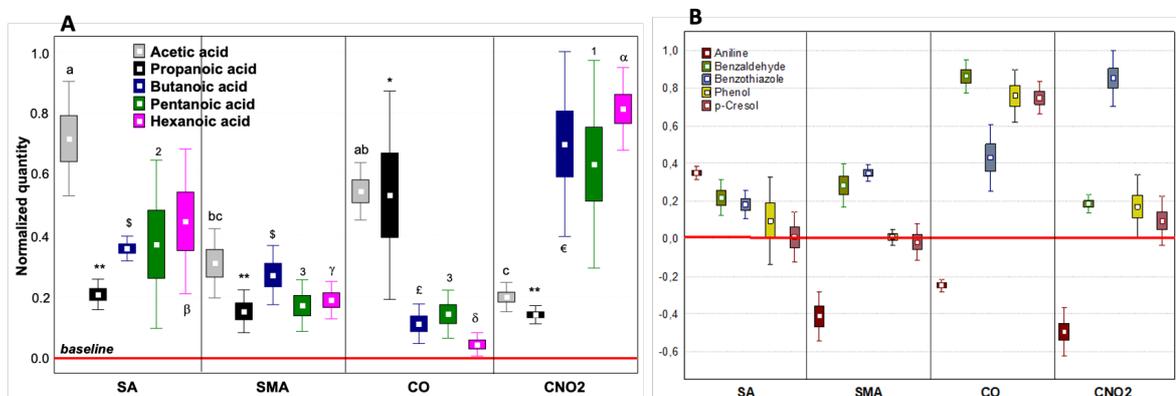


Figura 4. Shift dell'abbondanza relativa di metaboliti microbici benefici (A) e di metaboliti potenzialmente tossici (B), espressi come abbondanza relativa rispetto alla baseline dopo 6, 18 e 24 h di fermentazione. I casi con lettere o numeri o simboli differenti all'interno di una singola variabile indipendente sono significativamente differenti per Tukey's HSD test ($p < 0.05$).

Passando all'analisi del microbiota, la **Figura 5A** mostra i risultati ottenuti per i batteri benefici. In particolare, all'endpoint soltanto SA ha mostrato un incremento significativo di *Lactobacillales* mentre, per quanto riguarda le *Bifidobacteriaceae*, tutte le formulazioni ne hanno favorito la crescita, eccetto CNO₂, che ne ha invece ridotto l'abbondanza. *Clostridium* gruppo IV subisce una significativa riduzione in quasi tutte le formulazioni ad eccezione di SMA ($p < 0.05$). *Bifidobacterium longum* è aumentato con entrambe le formulazioni innovative SA e SMA ($p < 0.05$). *Akkermansia muciniphila* subisce una riduzione significativa per entrambe le formulazioni innovative, mentre la crescita del gruppo BPP risulta supportata soltanto da SMA ($p < 0.05$).

Considerando i taxa opportunisti (**Figura 5B**), all'endpoint le *Enterobacteriaceae* risultano incrementate dopo la fermentazione di tutti i campioni, compreso il controllo bianco (BC). In particolare, all'EP si rileva un incremento minore con le formulazioni innovative di tutte le popolazioni microbiche opportuniste considerate.

A

qPCR Target	Cells/mL	Log(F/C)		ANOVA
		TI	EP	
Lactobacillales				
CO	4.80E+06 ± 3.64E+05	0.56	0.82 ^{ab}	0.681032
SA	4.80E+06 ± 3.64E+05	0.72 ^a	2.13 ^{ab}	0.001842
SMA	4.80E+06 ± 3.64E+05	0.94	1.74 ^a	0.165766
CNO ₂	4.80E+06 ± 3.64E+05	0.72	1.10 ^{ab}	0.418668
BC	4.80E+06 ± 3.64E+05	0.44 ^a	-1.34 ^{ab}	0.048217
		0.932508	0.043936	P value
Bifidobacteriaceae				
CO	4.10E+08 ± 4.77E+07	-0.11 ^b	0.48 ^{ab}	0.056606
SA	4.10E+08 ± 4.77E+07	0.08 ^{ab}	1.04 ^a	0.003197
SMA	4.10E+08 ± 4.77E+07	1.01 ^{ab}	2.04 ^{ab}	0.013858
CNO ₂	4.10E+08 ± 4.77E+07	-0.52 ^b	-0.83 ^b	0.058814
BC	4.10E+08 ± 4.77E+07	-0.32 ^b	-2.43 ^{ab}	0.046692
		0.000459	0.000315	P value
Clostridium Group IV				
CO	1.36E+08 ± 1.83E+07 ^a	-1.44 ^{ab}	-1.38 ^{ab}	0.000121
SA	1.36E+08 ± 1.83E+07	0.11 ^a	-0.40 ^{ab}	0.054040
SMA	1.36E+08 ± 1.83E+07	0.02 ^a	-0.02 ^a	0.902669
CNO ₂	1.36E+08 ± 1.83E+07 ^a	-0.64 ^{ab}	-1.19 ^{ab}	0.000436
BC	1.36E+08 ± 1.83E+07 ^a	0.28 ^a	-1.81 ^{ab}	0.000024
		0.000021	0.000011	P value
B. longum				
CO	1.08E+08 ± 1.52E+07 ^a	-1.70 ^{ab}	-1.41 ^{ab}	0.043768
SA	1.08E+08 ± 1.52E+07	0.03 ^a	0.96 ^a	0.023466
SMA	1.08E+08 ± 1.52E+07 ^a	0.44 ^{ab}	1.37 ^{ab}	0.000166
CNO ₂	1.08E+08 ± 1.52E+07	-3.63 ^{bc}	-3.86 ^c	0.000001
BC	1.08E+08 ± 1.52E+07	-2.02 ^{bc}	-3.38 ^c	0.000003
		0.000429	0.000001	P value
A. muciniphila				
CO	4.03E+05 ± 7.74E+04	-0.15	-0.07 ^a	0.063283
SA	4.03E+05 ± 7.74E+04 ^a	-1.19 ^b	-1.52 ^{ab}	0.000062
SMA	4.03E+05 ± 7.74E+04 ^a	-0.91 ^{ab}	-1.08 ^{ab}	0.000034
CNO ₂	4.03E+05 ± 7.74E+04	-0.27	-0.79 ^{ab}	0.051172
BC	4.03E+05 ± 7.74E+04 ^a	-0.51 ^a	-3.06 ^c	0.000004
		0.105302	0.000001	P value
F. prausnitzii				
CO	1.26E+04 ± 3.18E+03 ^a	-0.66 ^b	-1.41 ^{ab}	0.001359
SA	1.26E+04 ± 3.18E+03 ^a	0.42 ^a	-0.77 ^{ab}	0.061564
SMA	1.26E+04 ± 3.18E+03	0.05	-0.41 ^a	0.191359
CNO ₂	1.26E+04 ± 3.18E+03	-0.15	-0.83 ^{ab}	0.072828
BC	1.26E+04 ± 3.18E+03 ^a	0.28 ^a	-1.82 ^{ab}	0.001090
		0.090691	0.023811	P value
BPP group				
CO	6.82E+09 ± 3.05E+08	-0.27	-0.29 ^a	0.918863
SA	6.82E+09 ± 3.05E+08	-0.13	-0.47 ^{ab}	0.512972
SMA	6.82E+09 ± 3.05E+08 ^b	0.03 ^a	1.16 ^{ab}	0.005472
CNO ₂	6.82E+09 ± 3.05E+08 ^a	-0.68 ^b	-2.23 ^b	0.023051
BC	6.82E+09 ± 3.05E+08 ^a	-1.70 ^b	-2.54 ^b	0.009275
		0.244794	0.000006	P value

B

qPCR Target	Cells/mL	Log(F/C)		ANOVA
		TI	EP	
Enterobacteriaceae				
CO	7.85E+07 ± 4.58E+05 ^b	0.84 ^{ab}	2.56 ^{ab}	0.049707
SA	7.85E+07 ± 4.58E+05	0.56 ^b	0.70 ^{ab}	0.052006
SMA	7.85E+07 ± 4.58E+05 ^b	0.94 ^{ab}	1.21 ^{ab}	0.005644
CNO ₂	7.85E+07 ± 4.58E+05 ^b	1.09 ^{ab}	1.86 ^{ab}	0.000008
BC	7.85E+07 ± 4.58E+05 ^b	2.32 ^{ab}	3.93 ^{ab}	0.006603
		0.000616	0.000444	P value
Gruppo ATOP				
CO	5.29E+05 ± 1.09E+05 ^b	0.16 ^b	1.21 ^{ab}	0.024434
SA	5.29E+05 ± 1.09E+05	0.08	0.21 ^b	0.880294
SMA	5.29E+05 ± 1.09E+05	0.27	0.40 ^{ab}	0.574153
CNO ₂	5.29E+05 ± 1.09E+05 ^b	0.72 ^{ab}	1.07 ^{ab}	0.049402
BC	5.29E+05 ± 1.09E+05 ^b	0.28 ^b	1.91 ^{ab}	0.042082
		0.852626	0.026102	P value
Clostridium gruppo I				
CO	1.54E+04 ± 3.06E+03 ^b	1.68 ^a	2.49 ^{ab}	0.000208
SA	1.54E+04 ± 3.06E+03 ^b	1.24 ^a	2.48 ^{ab}	0.000308
SMA	1.54E+04 ± 3.06E+03	0.93	1.27 ^b	0.245233
CNO ₂	1.54E+04 ± 3.06E+03 ^b	1.80 ^a	2.03 ^{ab}	0.022968
BC	1.54E+04 ± 3.06E+03 ^b	1.67 ^a	3.05 ^{ab}	0.000087
		0.453844	0.018590	P value
E. coli (FtsZ)				
CO	5.04E+05 ± 2.08E+04 ^b	0.62 ^b	2.28 ^{ab}	0.031012
SA	5.04E+05 ± 2.08E+04	0.52	0.69 ^b	0.072121
SMA	5.04E+05 ± 2.08E+04	0.74	1.03 ^b	0.080023
CNO ₂	5.04E+05 ± 2.08E+04 ^b	0.89 ^a	1.36 ^{ab}	0.034346
BC	5.04E+05 ± 2.08E+04 ^b	1.89 ^a	3.79 ^{ab}	0.000019
		0.082102	0.035284	P value

Figura 5. Quantificazione batteri benefici (A) e batteri opportunisti (B) rispetto alla baseline. I casi con lettere o numeri o simboli differenti all'interno di una singola variabile indipendente sono significativamente differenti per Tukey's HSD test ($p < 0.05$).

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

- 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* 13:787. <https://doi.org/10.3390/nu13030787>
- Nissen L, Casciano F, Gianotti A (2021) Volatile changes during probiotic fermentation of combined plant-based drinks, *Food Funct* 12:3159-3169.
- Nissen L, Casciano F, Gianotti A (2020) Intestinal fermentation in vitro models to study food-induced gut microbiota shift: an updated review, *FEMS Microbiol Lett* 367:fnaa097. doi:10.1093/femsle/fnaa097.
- Nissen L, Casciano F, Babini E, Gianotti A (2021) Prebiotic potential and bioactive volatiles of hemp byproduct fermented by lactobacilli, *LWT* 151:112201. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112201>.
- Casciano F, Nissen L, Gianotti A (2021) Effect of formulation and fermentation process on volatile organic compounds and prebiotic potential of gluten-free bread fortified by spirulina (*Arthrospira platensis*), *Food Funct* 12:10226-10238.
- Nissen L, Valerii MC, Spisni E, Casciano F, Gianotti A (2021) Multiunit In Vitro Colon Model for the Evaluation of Prebiotic Potential of a Fiber plus D-Limonene Food Supplement, *Foods* 10: 2371. <https://doi.org/10.3390/foods10102371>
- Nissen L, Casciano F, Babini E, Gianotti A (2021) The Exploitation of a Hempseed Byproduct to Produce Flavorings and Healthy Food Ingredients by a Fermentation Process, *Microorganisms* 9:2418. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122418>

Genomic characterization of *Klebsiella* spp. isolates collected from artisanal food productions

Cecilia Crippa (email: cecilia.crippa2@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: XXXV; Anno di frequenza: III

Tutor: Prof. Gerardo Manfreda; Co-tutor: Dott.ssa Frédérique Pasquali, Prof. Massimiliano Petracci

1. Stato dell'arte

The *Klebsiella* genus, family *Enterobacteriaceae*, comprises Gram-negative, rod shaped, facultative anaerobic bacteria which are ubiquitously found in a wide range of host-associated and environmental niches, including soil, surface waters, plants and intestines of animals and humans. *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* are the most prevalent species of this genus, both acknowledged as opportunistic pathogens associated with hospital and community-acquired infections such as septicemia, pneumonia and urinary tract infections, thus representing a significant threat to public health. The treatment of *Klebsiella* spp. infections has become challenging due to the spread of strains producing extended spectrum β -lactamases (ESBL) and/or carbapenemases and showing additional broad resistance to aminoglycosides, tetracyclines, chloramphenicol, sulfonamides and trimethoprim. Moreover, invasive community-acquired infections are mostly linked to *K. pneumoniae* strains so-called hypervirulent (hvKp), firstly described in Asian countries, which harbor pathogenic features linked to polysaccharide capsule synthesis and hypermucoid phenotypes as well as horizontally-acquired virulence factors encoding for siderophores systems such as yersiniabactin (Ybt), aerobactin (Iuc) and salmochelin (Iro).

Although *Klebsiella* spp. is not generally recognized as a major foodborne pathogen, in recent years the number of reports providing evidence for the detection of *Klebsiella* spp. in several food products categories has increased. Furthermore, the food chain has been showed to potentially become a reservoir of antibiotic resistant and virulence genes, since multidrug-resistant (MDR) and potentially virulent *K. pneumoniae* strains have been isolated. These findings pose a public health hazard concerning the transmission of antimicrobial-resistant bacteria to humans or the acquisition of antibiotic-resistant infections. Likewise, antimicrobial resistance and/or virulence determinants are generally carried by mobile genetic elements (MGEs) including plasmids, transposons and integrative conjugative elements (ICEs), which could be horizontally transferred to other pathogens colonizing the microflora of food and human gut, thus facilitating the spread of multi-drug resistant and/or pathogenic strains. Therefore, an increasing surveillance and monitoring of resistant and/or virulent bacteria in food is needed for setting up targeted intervention strategies as well as selecting last-resort molecules for infections' treatment. In this framework, knowledges are still limited on the prevalence rates of antibiotic resistant and/or virulent profiles of *Klebsiella* spp. isolated from Italian artisanal food chain. Being artisanal Italian food productions widely appreciated among consumers and part of the Italian cultural heritage thanks to their organoleptic and healthier properties, further investigations are needed to assess the potential hazard that foodborne *Klebsiella* spp. isolated from the artisanal food chain might constitute for public health.

2. Bibliografia

- Gelbíčová T, Kořená K, Pospíšilová-Hlucháňová L, Straková N & Karpíšková R (2021) Dissemination and characteristics of *Klebsiella* spp. At the processed cheese plant, Czech Journal of Food Sciences. 39(No. 2): 113–121.
- Hartantyo SHP, Chau ML, Koh TH, Yap M, Yi T, Cao DYH, Gutiérrez RA & Ng LC (2020) Foodborne *Klebsiella pneumoniae*: Virulence Potential, Antibiotic Resistance, and Risks to Food Safety, Journal of Food Protection. 83(7): 1096–1103.
- Hu Y, Anes J, Devineau S & Fanning S (2021) *Klebsiella pneumoniae*: Prevalence, Reservoirs, Antimicrobial Resistance, Pathogenicity, and Infection: A Hitherto Unrecognized Zoonotic Bacterium, Foodborne Pathogens and Disease. 18(2): 63–84.
- Klaper K, Hammerl JA, Rau J, Pfeifer Y, Werner G (2021) Genome-Based Analysis of *Klebsiella* spp. Isolates from Animals and Food Products in Germany, 2013-2017, Pathogens. 10(5): 573.
- Lam MMC, Wick RR, Watts SC, Cerdeira LT, Wyres, KL & Holt KE (2021) A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex, Nature Communications. 12(1): 4188.
- Zhang S, Yang G, Ye Q, Wu Q, Zhang J & Huang Y (2018) Phenotypic and Genotypic Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Retail Foods in China, Frontiers in Microbiology. 9: 289.

3. Sviluppo della ricerca

The aim of the research was to apply a molecular typing approach based on Whole Genome Sequencing (WGS) to characterize the biological hazard of *Klebsiella* spp. strains isolated from 6 batches of two artisanal ready-to-eat (RTE) food productions of dairy (soft cheese) and meat (fermented salami) origin respectively, sampled between January 2020 and May 2021 in two distinct small-scale factories located in northern Italy.

The WGS analyses consisted in a combination of culture-based methods along with advanced bioinformatic genotyping tools and clustering analyses, aimed at:

- 1) assessing the presence of *Klebsiella* spp. within the selected production and improving its taxonomic characterization along the artisanal food chain;
- 2) describing the distribution and mobilization of key features of proven clinical importance, such as antimicrobial resistance and virulence associated loci;
- 3) predicting the source and route of contamination within batch and between batches of each production and assessing the genetic relationship between isolated strains.

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) Bibliographic research		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A2) Samples' collection and strains isolation																				
	1) Collection of samples from food matrices and processing environment																			
	2) Culture-based methods for characterization of <i>Enterobacteriaceae</i>																			
	3) Biochemical and molecular methods for <i>Klebsiella</i> spp. identification																			
A3) Antimicrobial susceptibility testing																				
	1) Broth microdilution assay against 14 antibiotics																			
A4) DNA extraction and whole genome sequencing (WGS)																				
	1) DNA extraction																			
	2) Library preparation and short-read sequencing																			
A5) Bioinformatic analyses																				
	1) Reads processing and de-novo assembly																			
	2) Sequence-based taxonomic assignment confirmation																			
	3) Prediction of resistance and virulence determinants and mobilization																			
	4) Allele calling (core-gene phylogeny, sequence typing and cgMLST including public genomes)																			
	5) Genome annotation and pangenome analysis																			
A6) Scientific communication																				

4. Principali risultati

The PhD research activities (from A1 to A6) were outlined according to the Gantt diagram showed in Table 1. Starting from A1, a constant literature review through the consultation of scientific articles and books from public databases such as Pubmed, Google Scholar, Scopus, etc. was carried out throughout the whole period of the research.

The first part of the activities (A2) was focused on the collection of 420 and 750 total samples from salami and cheese productions respectively, including both food matrices (raw materials and final products) and environmental swabs. Enrichment broth and selective culture media (McConkey) were used for the growth of bacteria belonging to *Enterobacteriaceae*, which allowed to select colonies showing the typical pink mucoid morphology related to *Klebsiella* spp. Preliminary species confirmation based on biochemical and molecular methods assigned a total of 75 strains to the *Klebsiella* genus, identified as *K. oxytoca* (n=52) and *K. pneumoniae* (n=23). The prevalence of *K. oxytoca* resulted higher among the cheese production (75%), whereas *K. pneumoniae* was more prevalent (87%) in salami. Results also reported that the isolation of *Klebsiella* spp. covered 5 and 6 batches of cheese and salami respectively, and for most of the cheese batches and 1 salami batch, strains were detected not only in the final products but also starting from raw materials and/or the processing environment. These preliminary findings confirm the ubiquitous nature of *Klebsiella* spp. which is able to grow and survive in different ecological niches (food and environment) and suggest its persistence in the processing environment for almost the whole sampling period which has potentially led to a transmission along the food chain. Further genomic comparative clustering analyses was performed in A5 activities to confirm this hypothesis by providing a more accurate prediction of the intra and inter-batch strain relatedness.

73 *Klebsiella* spp. samples, since two strains didn't show plate's growth, were further submitted to phenotype testing for antimicrobial susceptibility (A3 activity), showing that all isolates were resistant to sulfamethoxazole and 72 of 73 (99%) also to ampicillin. Furthermore, one strain collected from the cheese production was found to be multi-drug resistant to five different classes of antibiotics, such as sulfonamides, quinolones, β -lactams, aminoglycosides and polymyxins.

Moving to the A4 activities, after the whole-genomic DNA extraction, all DNA spectrophotometer measures showed 260/280 ratio values ranging from 1.8 to 2.0 suggesting a good quality of DNA extracts. Following extraction, library preparation and sequencing were performed on Illumina platform. Short-read sequences were then processed with dedicated bioinformatic tools (A5 activity). Firstly, raw reads were mapped against public reference databases

(Kraken2) for taxonomic confirmation and further the fq2dna pipeline was applied for reads pre-processing and *de-novo* assembly, obtaining 75 *Klebsiella* spp. draft genomes. The sequence-based taxonomic confirmation carried out from reads (Kraken2) or assembled contigs (ReferenceSeeker and Kleborate) against selected WGS databases reported results highly concordant, which revealed that the 72% of isolates previously identified as *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* belonged to closely related species within relative complexes, such as *K. pneumoniae* species complex (*K.pneSC*), *K. oxytoca* species complex (*K.oxySC*) and *K. ornithinolytica* species complex (*K.ornSC*). Results showed that the *K.pneSC* gathered 17 strains encompassing *K. pneumoniae sensu stricto* (n=16) and *K. variicola* subsp. *variicola* (n=1), whereas the *K.oxySC* comprised 38 genomes with *K. oxytoca sensu stricto* (n=11), *K. michiganensis* (n=15), *K. pasteurii* (n=5) and *K. grimontii* (n=7). The prevalence of *K.pneSC* and *K.oxySC* strains confirmed by WGS tools on the selected productions resulted highly similar to the one previously assigned using phenotypic and molecular testing, confirming the higher identification rate of *K.oxySC* in cheese (68% by WGS vs. 75% by phenotypic and molecular tests) and *K.pneSC* in salami (94% by WGS vs. 87% by phenotypic and molecular tests). Among the 28% of mismatched strains, 18 sequences revealed high similarity to the *Raoultella* genus, taxonomically nested with *Klebsiella* spp. and recognized to be a pathogen of increasingly importance associated as well to AMR and virulence factors. Given the last scientific updates based on the nested taxonomy between the genera *Klebsiella* and *Raoultella*, the *Raoultella* genomes (13 strains of *R. ornithinolytica* and 5 strains of *R. planticola*) have been re-named as *Klebsiella ornithinolytica* and *Klebsiella planticola*, thus belonging to the *K.ornSC*. Among them, all *K. ornithinolytica* strains were isolated from the cheese production and all *K. planticola* strains from salami. Two strains were identified as *Citrobacter* spp. and thus excluded from the dataset. The genotyping of antimicrobial resistance (AMR) loci performed by Kleborate showed an intrinsically resistance to penicillins related to *K.pneSC* strains, due to the presence of the chromosomally encoded β -lactamases SHV (*K. pneumoniae sensu stricto*) and LEN (*K. variicola* subsp. *variicola*). Moreover, the tool predicted ESBL production among all the *K.oxySC* strains due to the presence of the *bla_{OXY1-2,4-5-6}* β -lactamases acquired resistance genes. Thus, a ESBL phenotypic prediction was reported in both artisanal productions with a persistence across time (from January 2020 to May 2021) and in both environmental and stored cheese samples. In salami, ESBL+ genomes were detected with a prevalence (81%) in raw materials. Other acquired resistance patterns were detected among *K.oxySC* genomes as regard to resistance to aminoglycosides (*strAB*, *aph3-Ia*, *aph(3')-Ia*) reported for both productions and resulting in 8 out of 38 isolates, and sulfonamides resistance (*sul2*), associated to one *K. pasteurii* strain isolated from cheese. Regarding the molecular bases of ampicillin resistance, in *K.pneSC* resistance to penicillins is intrinsic due to their ancestral resistome harbouring *bla_{SHV}* or *bla_{LEN}* genes, whereas for *K.oxySC* ampicillin resistance is associated to the plasmid-borne *bla_{OXY}* gene. Similarly to *Klebsiella* species, *Raoultella* spp. (*K. ornithinolytica* and *K. planticola*) showed phenotypic resistance to ampicillin as reported in the literature. However, no ESBL gene patterns were identified by Kleborate. Similarly, the phenotypic resistance to sulfamethoxazole was genotypically confirmed in all SC but one *K.pasteurii* harboring the *sul2* gene. These results suggest that other mechanisms such as the overexpression of multidrug efflux pumps might be associated to ampicillin and sulfamethoxazole resistance in these isolates.

Beside the identification of AMR determinants, Kleborate identified among all *K. pneumoniae sensu stricto* strains genetic features reflecting the accumulation of the acquired siderophores systems aerobactin (*iuc*) alone or in combination with yersiniabactin (*ybt*). The *ybt* locus was found also in 26 out of 38 *K.oxySC* genomes and all *K. ornithinolytica*. Interestingly *K. pneumoniae* strains harboring iron-acquisition systems (*iuc* and/or *ybt*) has been predominantly observed in raw materials and environmental samples taken from first processing steps of salami production. Similarly, one *iuc* positive *K. pneumoniae* strain was also isolated from stored cheese. Interestingly, the aerobactin system was predicted in a single lineage *iuc3* AbST43 found in correlation with the *ybt16* mobilized by ICEKp12, an integrative conjugative element frequently found in clinical *K. pneumoniae* strains. The MOB-suite tool results highlighted that the *iuc3* locus was carried by the conjugative IncFIB/IncFII plasmid resulted in high sequence similarity (>98% of average nucleotide identity) across samples. A comparison of the *iuc3* allele sequence harbored by two *K. pneumoniae* strains selected from our dataset representing the major sequence type detected (ST4242 and ST3254) was performed against the same locus harbored by three public *K. pneumoniae* retrieved from livestock pig samples and hospitalized patients around the city of Pavia (norther Italy) in 2017 and 2018. Public genomes were selected based on plasmid replicon type and pMLST profiles. The gene clustering alignments related to the aerobactin locus *iucABCD-iutA* reflected the high nucleotide identity (>97%) shared by *iuc3* sequences, highlighting the presence of the same allelic profile in *K. pneumoniae* isolated from different settings (food, pig farming and hospitalized patients). Phylogenetic analyses have been further performed to assess sequence types (STs) and DNA relatedness between samples. The Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree inferred on core gene alignments (figure 1) shows three distinct clades representing each species complex. In each clade, clusters gathered genomes belonging to the same species/ST. For *K.pneSC*, two main STs (4242 and 3254) were assigned among different salami batches, whereas ST36 and ST18 were the most frequently identified within *K. oxytoca salami*. Whereas, all *K. oxytoca* isolated from cheese belonged to ST37. Overall, 13 new ST types were assigned to *K.oxySC*. None of the *K.ornSC* genomes were assigned to specific ST-types suggesting that the MLST scheme originally built on *K. pneumoniae* genomes is not suitable for this SC. Clustering analyses and STs assignment confirmed the hypothesis of the spread of *Klebsiella* spp. closely related strains in the same processing environment for several months, which might have been transmitted along the food chain with a persistence from raw materials to the end of the production.

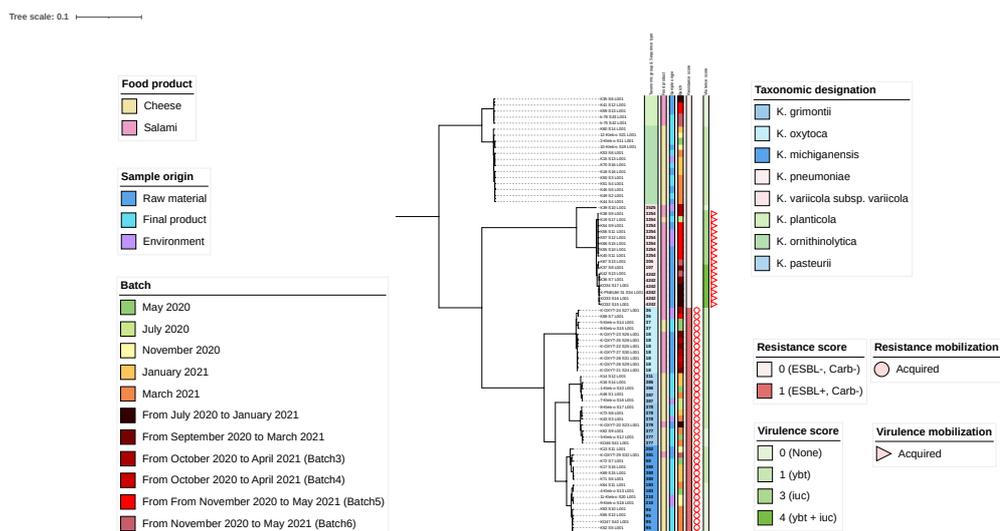


Figure 1: Maximum likelihood phylogenetic tree by core-gene alignment of 73 *Klebsiella* spp. genomes (*K.pneSC*, *K.oxySC* and *K.ornSC*) isolated from the selected Italian meat and dairy artisanal food productions with associated metadata (food product, sample origin and batch), STs and scores given by Kleborate and MOB-suite tools (resistance and virulence loci including their mobilization pattern).

Phylogenetic analyses were also implemented with a cgMLST methodology to assess the population structure of strains isolated from the selected artisanal productions and other *Klebsiella* spp. sequences harboring the same STs retrieved from public repositories such as the National Center for Biotechnology Information (NCBI) for *K.oxySC* and *K.ornSC*, and the BIGSdb platform hosted by the Pasteur Institut for *K.pneSC*. For *K.pneSC*, the cgMLST allele calling was performed based on a curated cgMLST scheme already available on BIGSdb, whereas a new cgMLST scheme was designed with the chewBBACA suite for the remaining two complexes (*K.oxySC* and *K.ornSC*) starting from a selected dataset of public sequences. For *K.pneSC*, the cgMLST comparison, based on a 629 loci scheme identified 8 and 9 loci variant among the salami productions and African human carriage strains of *K. pneumoniae*, all belonging to ST3254. Similarly, for *K.oxySC* the clustering results based on allelic profiles calculated on a 3394 loci cgMLST scheme, identified 50-loci variant within a cluster including the Italian cheese sampled along its shelflife and both human carriage and environmental *K.oxytoca* strains isolated in Europe and sharing the same ST (ST37). A higher genetic distance (450-loci variant on a 2957 loci scheme) was observed within a cluster composed by *K. planticola* strains from salami and Asian human clinical samples. Overall, the cgMLST phylogeny suggested a high relatedness between human and food *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* strains (~1,5% of variant differences) indicating the genetic similarity between human and food isolates. Regarding the pangenome inference, 19365 gene clusters were retrieved among the *Klebsiella* strains, with 2911 of these (15%) representing the core genome and 16454 (85%) the accessory content, highlighting the huge heterogeneity of the *Klebsiella* spp. population.

In conclusion, the scientific research activities have significantly enhanced the understanding of the potential health risk posed by *Klebsiella* spp. strains isolated from the Italian artisanal food chain, highlighting the potential transmission of strains harboring plasmid-encoded ESBL resistance loci or siderophores aerobactin and yersiniabactin virulence systems from the processing environment to ready-to-eat food productions. The harboring of these clinical features along the food chain should not be underestimated due to the potential hazard derived from the transmission of antimicrobial-resistant bacteria to humans or transferring of AMR and/or virulence determinants to other colonizing bacteria. An increasing surveillance of foodborne *Klebsiella* is needed to further characterize its prevalence, AMR and virulence as well as the epidemiological and public health implications of this pathogen.

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

Scientific papers:

Crippa C, Pasquali F, Lucchi A, Gambi L, De Cesare A (2022) Investigation on the microbiological hazards in an artisanal soft cheese produced in northern Italy and its production environment in different seasonal periods. Italian Journal of Food Safety (*in press*).

Congress contributions:

Crippa C, Manfreda G, Gambi L, Lucchi A, Pasquali F, De Cesare A. Enumeration of natural flora and survey of foodborne pathogens in artisanal salami and its production environment. Proceedings of 74nd Convegno Sisvet, 2021, pp. 76 – 76.

Crippa C, Pasquali F, Lucchi A, Gambi L, De Cesare A. Valutazione del profilo di rischio microbiologico di formaggio artigianale a pasta molle Squacquerone D.O.P. e dell'impianto di produzione in differenti periodi stagionali. XXX Convegno Nazionale Associazione Italiana Veterinari Igienisti, 16th-17th and 23th-24th September 2021

Biotechnological and molecular approaches for the study of GRAS microorganisms to be used in the production of functional dairy foods

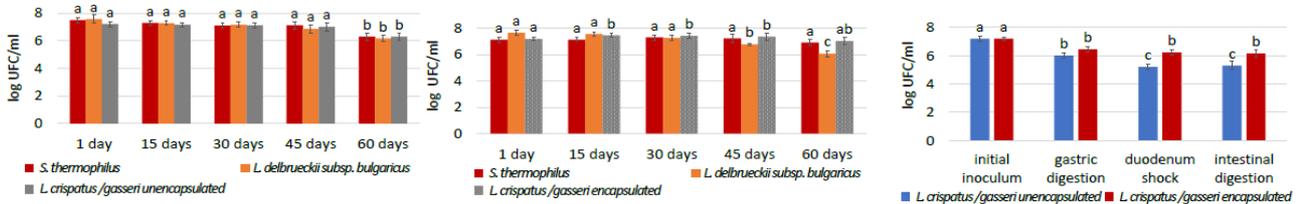
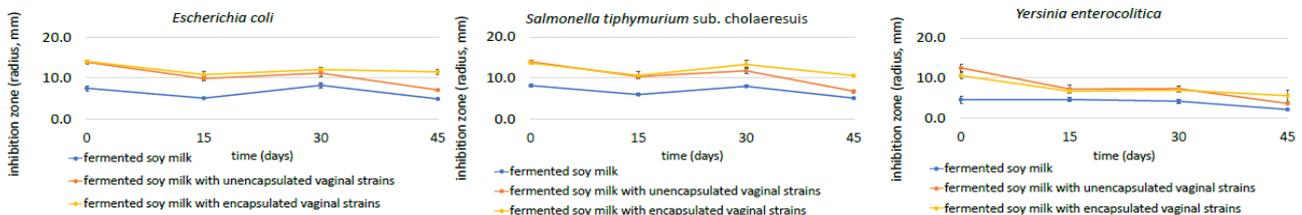
Margherita D'Alessandro (e-mail: margheri.dalessandr3@unibo.it)
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, *Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna
Corso di Dottorato: Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari
Tematica: Scienze e Biotecnologie degli Alimenti; Ciclo di dottorato: XXXV; Anno di frequenza: III
Tutor: Francesca Patrignani ; Co-tutor: Rosalba Lanciotti, Lucia Vannini

1. Stato dell'arte

Traditionally, probiotics, defined as functional microorganisms with a positive impact on human health, have been isolated from the gut. Nevertheless, in recent years, the literature has pointed out the functional role of microorganisms isolated also from other human sources such as the skin, oral cavity, breast milk and genital tract (Petrova et al., 2015). In this context, breast milk, considered as one of the best example of a natural functional food, contains not only nutrients, hormones, growth factors, immunoglobulins, cytokines, and enzymes, which contribute to immune maturation and child well-being, but also a significant number of microorganisms, that are responsible for the gastrointestinal colonization of the newborn and for the adequate maturation of the gut mucosal immune system (Zacarias et al., 2011). Thus, it is not without reason that selected strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. also isolated from human breast milk, are the most studied microorganisms worldwide and the most used in food and pharma as probiotics. In this instance, however, it's important to underline how breast milk can be considered as an important source of potential probiotic bacteria, but the technological aptitude of isolates obtained from this matrix is not always guaranteed and have to be deeply investigated, especially in perspective to include them in food products dedicated to infants, such as infant formulas. In this context, in recent years, probiotics have been also proposed to improve genital health of women, and microbial strains with beneficial properties can be used to prevent or treat vaginal dysbiosis and genital infections. In particular, vaginal *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus gasseri* strains exhibited activity towards several genital pathogens, including *Candida*, *Chlamydia trachomatis* (Parolin et al., 2018) *Neisseria gonorrhoeae* (Foschi et al., 2017) Group-B *Streptococcus* (Marziali et al., 2019) and HIV1. Such beneficial strains can be administered *in situ* or orally, given their capability to pass from the intestine to the vagina because of spatial proximity of the two apparati. Moreover, although already available as oral preparations, it would be very challenging to use them in foods as a dietary strategy to prevent human diseases, after their technological, functional and metabolic characterization. However, it's important to underline how the maintenance of adequate levels of probiotic cultures in food and their functional properties for the full shelf-life of food is highly challenging, also considering their fate during the digestive process. When included in a food product, probiotic strains and their viability are affected by several factors, such as their sensitivity to process conditions (low pH, oxygen, fermentation temperature), the effect of the food matrix (water activity, pH, presence of natural antimicrobials), and storage conditions, which can affect their performance and viability (Patrignani et al., 2017). Moreover, during the digestion, the low pH of the stomach or presence of bile salts in the small intestine can further contribute to the loss of viability of the strains (Barbosa and Teixeira, 2017). Therefore, the development of suitable technologies for the maintenance of an adequate number of viable probiotic bacteria (>7 log colony-forming units [CFU] /g of product) is a key step. In this sense, microencapsulation using a spray-dryer is one of the most promising and widely used techniques, which offers a valuable option for encapsulating heat-sensitive nutrients and probiotic microorganisms. Several studies have demonstrated the potential of this technique in developing probiotic powders with different carriers that can preserve the functionalities (Muzaffar et al., 2016; Paim et al., 2016; Patrignani et al., 2017). In addition, it is important to underline how probiotic delivery to humans has traditionally been associated with fermented dairy foods such as fermented/sour milk, yoghurt and cheese, mostly of bovine origin. However, due to the rising emergence of lactose intolerance, cow's milk protein allergy, problems due to diets rich in cholesterol, changing lifestyles towards veganism and negative environmental impacts of dairy production have created a growing demand for non-dairy-alternatives. At present, also the viability levels of probiotics in plant-based milk substitutes (PBMS), such as soy milk, during product storage have been reported as highly satisfactory (Rasika et al., 2021). However, their functional efficacy in PBMS such as gastrointestinal survival, colonic fermentation and intestinal adhesion has not been thoroughly studied and need to be further assessed. In this context, it could be interesting to evaluate the technological and functional potential of encapsulated and unencapsulated selected vaginal strains for the development of probiotic soy milk yoghurts. Furthermore, it would be also interesting the study of the effects of these probiotic soy milk yoghurts on the vaginal microbiome of different women such as postmenopausal women (potentially more prone to vaginal dysbiosis).

Fig. 2 Cell loads (log UFC/g) of *L. crispatus* BC4 + *L. gasseri* BC9 encapsulated after 7, 14, 30, 90, 365 days of storage (RT, +4 °C and -20 °C) and after simulated stomach-duodenum passage.

Consequently, with the perspective of use encapsulated powders in food formulations to obtain novel functional foods, the encapsulated lactobacilli were then inoculated as adjuncts to produce soy milk yoghurts. During the manufacturing of the food products, all the samples, containing the starter cultures (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) and the probiotic adjuncts (encapsulated or not), reached the pH 4.5 in 7 h at 42 °C. The data (Fig.3) showed a small decrease in starter cultures cell loads, also considering the progress of the storage. However, after 60 d of refrigerated storage, the cell load of *L. crispatus* + *L. gasseri* was higher in soy milk yoghurt where the probiotic strains were added in encapsulated form. The performances of microencapsulation in maintaining strain viability are also demonstrated during the simulated digestive passage performed after 30 d of product storage. Moreover, especially the product with the encapsulated strains showed a remarkable antagonistic activity vs gastrointestinal pathogens (Fig.4). Further investigations are also ongoing in order to evaluate the sensory properties and the texture parameters of the products. (A5-A6) Finally, later analyses are underway to fully understand the effect of these formulated soy milk products on the vaginal microbiome of post-menopausal women and to select the best probiotic candidates, previously deeply characterized, for the formulation of a functional infant product.

Fig. 3 Cell viability of fermentation starter (*S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) and encapsulated or not probiotic lactobacilli (co-starters) in fermented soy-milks during 60 d of storage and after simulated digestion.**Fig. 4.** Antagonistic activity of fermented soy-milk products against gastrointestinal pathogens

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

- Patrignani, F., D'Alessandro, M., Vannini, L., & Lanciotti, R. (2020). Use of functional microbial starters and probiotics to improve functional compound availability in fermented dairy products and beverages. In *Sustainability of the Food System* (pp. 167-180). Academic Press.
- Patrignani F., Parolin C., D'Alessandro M., Siroli L., Vitali B., & Lanciotti R. (2020). Evaluation of the fate of *Lactobacillus crispatus* BC4, carried in Squacquerone cheese, throughout the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME). *Food Research International*, 137, 109580.
- Siroli L., Patrignani F., D'Alessandro M., Salvetti E., Torriani S., & Lanciotti R. (2020). Suitability of the Nisin Z-producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CBM 21 to be Used as an Adjunct Culture for Squacquerone Cheese Production. *Animals*, 10(5), 782.
- Bukvicki, D., Siroli, L., D'Alessandro, M., Cosentino, S., Fliss, I., Said, L. B., Hassan, H., Lanciotti R. & Patrignani, F. (2020). Unravelling the potential of *Lactococcus lactis* strains to be used in Cheesemaking production as biocontrol agents. *Foods*, 9(12), 1815.
- D'Alessandro M.; Parolin C.; Bukvicki D.; Siroli L.; Vitali B.; De Angelis M.; Lanciotti R.; Patrignani F., Probiotic and metabolic characterization of vaginal lactobacilli for a potential use in functional foods, *Microorganisms*, 2021, 9, pp. 833 – 846.
- Braschi, G., D'Alessandro, M., Gottardi, D., Siroli, L., Patrignani, F., & Lanciotti, R. (2021). Effects of Sub-Lethal High Pressure Homogenization Treatment on the Adhesion Mechanisms and Stress Response Genes in *Lactobacillus acidophilus* 08. *Frontiers in Microbiology*, 12.
- D'Alessandro, M., Pisanu, F., Baldo, D., Parolin, C., Filippini, G., Vitali, B., Lanciotti, R. & Patrignani, F. (2021). Unravelling the functional and technological potential of soy milk based microencapsulated *L. crispatus* and *L. gasseri*. *Journal of Functional Foods*, 87, 104745.

Approcci biotecnologici per la valorizzazione di fonti proteiche alternative, scarti e sottoprodotti dell'industria alimentare

Samantha Rossi (email: samantha.rossi2@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: XXXV; Anno di frequenza: III

Tutor: Rosalba Lanciotti ; Co-tutor: Francesca Patrignani

1. Stato dell'arte

L'aumento demografico, associato alla crescente difficoltà nel reperire materie prime di fondamentale importanza per il sostentamento, unitamente alla necessità di ridurre l'impatto ambientale dovuto all'eccessiva industrializzazione, ha spinto il mondo della ricerca verso l'individuazione e l'utilizzazione di risorse alternative e sostenibili. Ogni anno, in Europa, vengono sprecati circa 88 milioni di tonnellate di cibo, con una perdita stimata di 143 miliardi di euro (in accordo con il progetto FP7 FUSIONS, 2016). Questi scarti, pur rappresentando una valida fonte di composti ad alto valore aggiunto, d'altra parte, sono scarsamente impiegati e rappresentano un costo per le industrie. Il loro utilizzo potrebbe costituire un approccio innovativo e sostenibile anche per la produzione di ingredienti da re-impiegare in diversi settori del panorama industriale, apportando, pertanto, una riduzione della quantità di rifiuti, maggiori benefici economici, creando interconnessioni tra diversi settori e un miglioramento della sostenibilità ambientale (Pleissner et al., 2016). Sebbene questi scarti presentino un alto potenziale applicativo, il loro utilizzo nelle formulazioni alimentari è estremamente limitato, se non assente, a causa di una serie di ostacoli economici, sociali, e normativi, nonché per la mancanza di approcci biotecnologici sostenibili che permettano un completo sfruttamento di queste risorse. Per questi motivi, attualmente, la valorizzazione di sottoprodotti è ancora limitata e confinata alla produzione di composti a basso valore aggiunto destinati principalmente al consumo animale e alla produzione di biogas. La necessità di individuare fonti di sostentamento alternative ha portato, inoltre, all'individuazione di fonti proteiche innovative che vadano a sopperire la carenza delle fonti proteiche di origine animale non più in grado di soddisfare la richiesta globale. Differenti studi suggeriscono come il consumo di insetti edibili (entomofagia) possa rappresentare una valida alternativa al consumo delle usuali proteine animali (Stoops et al., 2016). Infatti, tra i potenziali benefici del consumo di insetti si evidenzia un'alta concentrazione di proteine e lipidi ad alto valore nutrizionale, vitamine, fibre nonché la presenza di microelementi minerali biodisponibili quali calcio, ferro e zinco (Belluco et al., 2013; van Huis et al., 2013; Rumpold and Schlüter, 2013). Ai benefici nutrizionali descritti dai diversi autori, si aggiungono quelli ecologici, economici e sociali (Belluco et al., 2013; van Huis et al., 2013). Infatti, in confronto al bestiame, gli insetti da allevamento si moltiplicano molto più rapidamente e con un coefficiente di conversione alimento/proteine più alto, richiedono poco spazio per la riproduzione e producono minori emissioni di gas a effetto serra ed ammoniacca (Klunder et al., 2012; van Huis et al., 2013). L'incremento di consumo di insetti edibili può rappresentare, inoltre, una soluzione valida e sostenibile ai problemi nutrizionali nei paesi in via di sviluppo (Klunder et al., 2012). Grazie ai numerosi fattori positivi associati all'utilizzo degli insetti commestibili come fonte di cibo, negli ultimi anni, l'idea di sfruttarli per la loro produzione industriale ha attirato l'attenzione dei media, degli istituti di ricerca e degli operatori dell'industria alimentare. D'altra parte, la valutazione microbiologica degli alimenti a base di farine di insetti rappresenta un'attività fondamentale per verificare la loro idoneità per un consumo umano sicuro. Inoltre, per consumatori aventi una ricca e peculiare tradizione culinaria, come quelli europei, il consumo di insetti può risultare possibile solo nel caso in cui questi facciano parte delle formulazioni come ingredienti di preparazioni alimentari usuali e tipiche del patrimonio culturale.

Il mio progetto di dottorato ha lo scopo di portare ad un avanzamento nella conoscenza di processi biotecnologici tailor-made per lo sfruttamento di scarti, sottoprodotti e fonti proteiche alternative per la produzione di prodotti innovativi da fonti sostenibili e rinnovabili.

2. Bibliografia

- Belluco, S., Losasso, C., Maggioletti, M., Alonzi, C.C., Paoletti, M.G., Ricci, A., (2013). Edible insects in a food safety and nutritional perspective: a critical review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 12 (3), 296-313.
- Klunder, H. C., Wolkers-Rooijackers, J., Korpela, J. M., & Nout, M. J. R. (2012). Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food Control*, 26(2), 628-631.
- Pleissner, D., Qi, Q., Gao, C., Rivero, C. P., Webb, C., Lin, C. S. K., & Venus, J. (2016). Valorization of organic residues for the production of added value chemicals: a contribution to the bio-based economy. *Biochemical Engineering Journal*, 116, 3-16.
- Rumpold, B. A., & Schlüter, O. K. (2013). Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular nutrition & food research*, 57(5), 802-823.
- Stoops, J., Crauwels, S., Waud, M., Claes, J., Lievens, B., Van Campenhout, L., (2016). Microbial community assessment of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and grasshoppers (*Locusta migratoria migratorioides*) sold for human consumption. *Food Microbiology* 53, 122-127.

van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Vantomme, P., (2013). Edible insects: Future prospects for food and feed security. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Forestry Paper, FAO, 187 p. Rumpold and Schlüter, 2013.

3. Sviluppo della ricerca

La ricerca è stata sviluppata secondo i seguenti punti principali:

- 1) Ricerca bibliografica destinata all'individuazione di metodi per la valorizzazione di sottoprodotti dell'industria molitoria e della farina di grillo come fonte proteica alternativa utile produzione di alimenti innovativi e ad alto valore nutrizionale.
- 2) Isolamento di microrganismi provenienti da differenti matrici alimentari di origine animale o vegetale e da sottoprodotti dell'industria molitoria. Identificazione dei microrganismi individuati e selezione di questi ultimi sulla base delle loro caratteristiche di sicurezza, tecnologiche e funzionali.
- 3) Messa a punto delle formulazioni e processi biotecnologici per l'ottenimento di ingredienti innovativi da impiegare successivamente per la produzione di alimenti innovativi oggetto di studio di questo progetto.
- 4) Caratterizzazione dei prodotti innovati ottenuti, da un punto di vista microbiologico, tecnologico e funzionale.
- 5) 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																			
A2)	Selezione di ceppi microbici																			
	1) Isolamento di microrganismi da diverse matrici alimentari e sottoprodotti																			
	2) Selezione dei ceppi microbici sulla base di caratteri di sicurezza, tecnologici e funzionali																			
A3)	Ottimizzazione delle performance microbiche																			
	1) Allestimento di piani sperimentali (CCD) per l'ottimizzazione delle performance dei ceppi selezionati																			
	2) Ottimizzazione dei processi produttivi per l'ottenimento di ingredienti innovativi da fonti rinnovabili e proteine alternative																			
A4)	Prodotti innovativi																			
	1) Formulazione di prodotti innovativi mediante processi biotecnologici tailor made																			
	2) Caratterizzazione microbiologica, tecnologica e funzionale dei prodotti innovativi ottenuti																			
A5)	Preparazione della tesi e di articoli																			

4. Principali risultati

Allo scopo di fornire una descrizione più chiara delle attività svolte e dei principali risultati raggiunti, i due macro-argomenti relativi alle attività di ricerca svolte durante i primi 2 anni e parte del terzo anno, verranno trattate separatamente.

1. Produzione di alimenti innovativi ad alto valore nutrizionale

Il primo macro-argomento consiste nella produzione e caratterizzazione di idrolizzati a partire da farina di grillo allo scopo di ottenere ingredienti ad alto contenuto proteico per la formulazione di alimenti innovativi, in particolare prodotti da forno.

A tal fine, sono state valutate le potenzialità tecnologiche di due ceppi di *Yarrowia lipolytica* (PO11, RO24) e due di *Debaryomyces hansenii* (DB e SP6L12) a sviluppare in una matrice composta da farina di grillo e acqua. I risultati ottenuti hanno evidenziato che tutti e 4 i ceppi sono stati in grado di sviluppare nella matrice di partenza considerata. Il ceppo di *Y. lipolytica* PO11 è stato quello che ha aumentato maggiormente il suo carico cellulare fino al raggiungimento di valori oltre a 7 log ufc/g di prodotto. Inoltre, i dati ottenuti hanno evidenziato che, dopo 72 ore dall'inoculo, il contenuto di chitina nei campioni idrolizzati con i ceppi di *Y. lipolytica* erano inferiori rispetto al controllo non inoculato e ai campioni idrolizzati con i ceppi di *D. hansenii*. In particolare, la maggiore riduzione della chitina, pari al 28%, è stata rilevata nel campione idrolizzato da *Y. lipolytica* RO25 (Tabella1). Attraverso un'analisi condotta mediante GC/MS sono anche stati evidenziati peculiari profili in acidi grassi negli idrolizzati ottenuti, in relazione al ceppo utilizzato. Di grande importanza la presenza di acidi grassi essenziali omega 3 e 6. Anche i profili in aminoacidi hanno evidenziato l'importanza del ceppo di partenza. Sono stati infatti rilevati, soprattutto negli idrolizzati da *Y. lipolytica* aminoacidi quali Istidina, Treonina, Leucina e Omitina.

La liberazione di composti aromatici gradevoli, l'aumento degli acidi grassi insaturi e la riduzione del chitinizzato sono stati

un ottimo punto di partenza per l'ottenimento di prodotti innovativi a base di farina di grillo. La scelta di uno specifico ceppo in campo alimentare è stata legata alle caratteristiche sensoriali, qualitative e nutrizionali che si volevano impartire al prodotto finale, tenendo anche conto del processo produttivo adottato.

Tabella 1. Contenuto di chitina (g/g farina) determinato in farina di grillo non idrolizzata e nei campioni di idrolizzato dopo 72 h dall'inoculo di *Y. lipolytica* PO11, RO25 e *D. hansenii* DB e SP6L12.

72h	Chitina (g) /g farina di grillo
No hydrolysed cricket	0.823±0.010
PO 11 cricket hydrolysate	0.617±0.008
RO 25 cricket hydrolysate	0.590±0.009
SP6L12 cricket hydrolysate	0.793±0.009
DB cricket hydrolysate	0.693±0.010

“Cricket sourdough”. I risultati ottenuti hanno dimostrato che “RO25 sourdough” era caratterizzato, in confronto ai due campioni di controllo, da un marcato e peculiare profilo in proteine totali dovuto alle ben note capacità idrolitiche di *Y. lipolytica* (Figura 1).

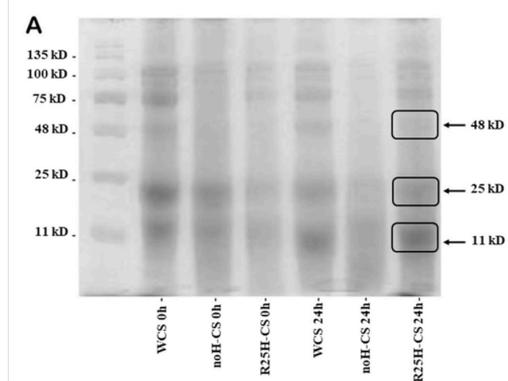


Figura 1. Coomassie coloured SDS-PAGE contenente proteine estratte in condizioni riducenti di “Wheat sourdough” (WCS), “Cricket Sourdough” (noH-CS) e “RO25 sourdough” (RO25HCS), subito dopo il secondo rinfresco (0 h) e dopo 24 h di fermentazione (24 h) a 25 °C. Marker dei pesi molecolari nella prima colonna e loro valori in kDa a sinistra.

nutrizionale e funzionale.

A questo scopo, sulla base delle informazioni descritte precedentemente, il 75% di ogni sourdough ottenuto è stato impiegato per la produzione di un impasto ed infine di pane. In particolare, il pane ottenuto da sourdough contenente il 30% di farina di grillo idrolizzata con *Y. lipolytica* RO25 “RO25 bread” è stato messo a confronto con il controllo ottenuto da sourdough contenete solamente farina di fumento “Wheat bread” e un secondo controllo ottenuto da sourdough composto da farina di grillo non idrolizzata con lieviti “Cricket bread”. I dati ottenuti hanno sottolineato le buone caratteristiche del pane a base di farina di grillo ottenuto dal da parte di *Y. lipolytica* RO25. Infatti, questo pane, come anche l'idrolizzato di partenza ed il sourdough successivamente, era caratterizzato da un'alta concentrazione di acidi grassi liberi polinsaturi, di frazioni proteiche (albumine/globulina, prolamine e gluteline) e un basso livello di ammine biogene quando comparato con “Cricket bread”.

Tabella 2. Contenuto di ammine biogene in “Wheat bread” (WCB), “RO25 bread” (RO25H-CB) e “Cricket bread” (noH-CB).

Ammine Biogene	WCB	RO25H-CB	noH-CB
Cadaverina (mg/kg)	7.0 ± 0.1 ^c	8.0 ± 0.4 ^b	20 ± 1.00 ^a
Istamina (mg/kg)	< 1 ¹	< 1 ¹	< 1 ¹
Putrescina (mg/kg)	11.0 ± 0.2 ^b	15.0 ± 0.8 ^a	15.0 ± 1.8 ^a
Spermidina (mg/kg)	3.0 ± 0.1 ^b	4.0 ± 0.2 ^a	4.0 ± 0.2 ^a
Spermina (mg/kg)	2.7 ± 0.1 ^b	3.0 ± 0.1 ^a	2.0 ± 0.1 ^c
Tiramina (mg/kg)	30.0 ± 0.2 ^a	17.0 ± 0.9 ^b	28.0 ± 1.4 ^c
B.A.I. Index (mg/kg)	2.7 ± 0.2 ^b	2.9 ± 0.1 ^b	5.0 ± 0.3 ^a

Per ogni linea considerate, le ammine biogene indicate con una lettera differente sono significativamente diverse.

¹Sotto al limite di determinazione

Per questo motivo, in base alle informazioni ottenute dalle prove precedentemente citate, l'idrolizzato ottenuto da *Y. lipolytica* RO25, avente le migliori caratteristiche, è stato utilizzato per produrre un sourdough destinato alla produzione di pane. Nello specifico, il sourdough ottenuto con l'aggiunta del 30% di idrolizzato di farina di grillo da *Y. lipolytica* RO25, denominato “RO25 sourdough”, è stato confrontato con un sourdough tradizionale, ottenuto con sola farina di frumento “Wheat sourdough” e un ulteriore controllo contenente il 30% di farina di grillo non idrolizzata, ottenuta con lo stesso metodo ma senza inoculo di lieviti

“RO25 sourdough” era anche composto da uno specifico profilo in acidi grassi liberi, tra cui l'acido arachidonico e linolenico aventi caratteristiche funzionali. Inoltre, era anche costituito da un'alta concentrazione di C18:2, C18:1 e C16:1 che vengono considerati precursori di aroma. Infatti, la presenza di un'alta attività proteolitica e un'elevata concentrazione di acidi grassi liberi ha dato origine a uno specifico profilo in molecole volatili. Attraverso l'analisi GC/MS/SPME è stato possibile identificare più di 60 molecole appartenenti alle classi di alcoli, aldeidi, chetoni, acidi, lattoni e furanoni che differenziano il campione ottenuto da *Y. lipolytica* RO25 rispetto ai campioni di controllo (Figura 2).

Pertanto, i risultati ottenuti hanno mostrato le buone potenzialità di *Y. lipolytica* RO25 per la produzione di sourdough destinati alla produzione di prodotti da forno innovativi e con un altro valore

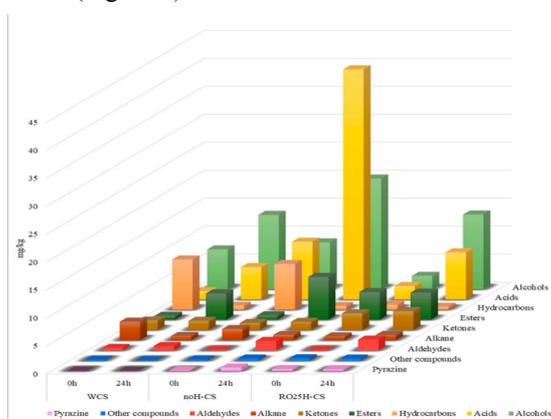


Figura 2. Principali classi di composti (espressi in mg/kg) rilevati in “Wheat sourdough” (WCS), “Cricket Sourdough” (noH-CS) e “RO25 sourdough” (RO25HCS), subito dopo il secondo rinfresco (0 h) e dopo 24 h di fermentazione (24 h) a 25 °C.

sourdough contenete idrolizzato di partenza ed il sourdough successivamente, era caratterizzato dalla presenza di ammine biogene (Tabella 2). Tuttavia, il campione “RO25 Bread” mostrava un contenuto di cadaverina e tiramina a livelli inferiori rispetto al “Cricket Bread”, infine, il B.A.I. (biogenic amine index) era di 2.9 e 5 rispettivamente per “RO25

Bread” e “Cricket bread”.

Inoltre, i dati di texture dimostrano che i valori di durezza del campione ottenuto da *Y. lipolytica* RO25 non sono significativamente diversi da quelli di “Wheat bread”. Infine, i risultati ottenuti dall’analisi sensoriale sottolineano la buona opportunità di applicazione del sourdough ottenuto da farina di grillo idrolizzata con *Y. lipolytica* RO25, come ingrediente per la panificazione. Infatti, il “RO25 bread” ha ricevuto valutazioni positive per quasi tutti i parametri considerati. I risultati dimostrano che l’idrolizzato da *Y. lipolytica* RO25, comparato con la farina di grillo non idrolizzata, è in grado di impartire specifiche caratteristiche sensoriali e qualitative al prodotto finale.

Infine, durante il periodo all’estero svolto in Germania presso Leibniz Institute for Agricultural Engineering and Bioeconomy (ATB) fra Gennaio e Giugno 2022 è stato allestito un processo avente l’obiettivo di sviluppare un prodotto da forno, a base di farina di grillo, arricchito di zinco, un oligoelemento la cui carenza nell’organismo può provocare la compromissione del sistema immunitario. Il processo di arricchimento è stato svolto impiegando microorganismi adattati ad un ambiente ad alta concentrazione di solfato di zinco e contenenti all’interno delle proprie membrane cellulari questo micronutriente. I microorganismi così arricchiti sono stati destinati alla produzione di sourdough e di idrolizzati di farina di grillo per la produzione di un prodotto da forno funzionale e ad alto valore nutrizionale.

Inoltre, un ulteriore importante aspetto preso in considerazione riguarda il potenziale allergenico della farina di grillo e l’eventuale effetto che le successive fasi di lavorazione, tra cui la fermentazione e l’idrolisi, possono avere sull’allergenicità del prodotto da forno finale.

2. Valorizzazione di sottoprodotti dell’industria molitoria

Il secondo macro-argomento è concentrato sulla valorizzazione, per via microbica, dei sottoprodotti dell’industria molitoria attraverso l’impiego di processi biotecnologici atti all’ottenimento di prefermenti destinati ad essere riutilizzati come ingredienti in formulazioni alimentari innovative.

A tal proposito, sono stati isolati ceppi microbici da numerosi impasti ottenuti a partire da sottoprodotti della lavorazione di segale, grano duro e tenero attraverso fermentazioni spontanee. I pre-fermenti sono stati rinfrescati giornalmente sino a stabilizzazione del pH, dopodiché è stato valutato il pH finale, il carico di lieviti e batteri lattici ed infine sono stati eseguiti gli isolamenti microbiologici. L’identificazione dei ceppi di lieviti e batteri è avvenuta attraverso metodi molecolari. I dati di sequenziamento microbico hanno evidenziato per i lieviti la presenza, nei prefermenti, di *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii* e *Kazachstania unispora*. Nel caso dei batteri lattici le specie maggiormente identificate sono state: *Pediococcus pentosaceus* (15 ceppi), *Leuconostoc mesenteroides* (4 ceppi), *Lactobacillus curvatus* (5 ceppi), *Lactobacillus brevis* (4 ceppi), *Lactobacillus plantarum* (7 ceppi), *Lactobacillus fermentum* (2 ceppi), *Lactobacillus paralimentarius* (4 ceppi), *Lactobacillus pentosus* (2 ceppi) e *Lactobacillus songhuajiangensis* (3 ceppi). I ceppi microbici identificati sono stati caratterizzati, in vitro, per la cinetica di fermentazione e la capacità di produrre molecole volatili, acidi grassi a catena corta (SCFA) e altri antimicrobici naturali e composti bioattivi. Sono stati selezionati i ceppi di lievito e batteri lattici (LAB) con le migliori caratteristiche, al fine di ottenere consorzi microbici ottimali per la produzione di pre-fermenti da utilizzare nella formulazione di prodotti da forno. Il passo successivo è stato quello di selezionare le migliori formulazioni per la preparazione prefermenti. Inizialmente sono stati prodotti diversi pre-fermenti utilizzando singolarmente crusca di segale e sottoprodotti di frumento tenero e duro, fermentati da un consorzio microbico composto da *L. curvatus*, *L. mesenteroides* e *P. pentosaceus* come LAB e *S. cerevisiae* come lievito. I risultati ottenuti hanno consentito di selezionare diverse formulazioni di sottoprodotti dell’industria molitoria da utilizzare per l’ottimizzazione e la messa a punto dei prefermenti finali da utilizzare come ingredienti nella panificazione. Le formulazioni, e il loro contenuto d’acqua, sono state basate sulla cinetica di fermentazione (le migliori prestazioni in termini di velocità di acidificazione e rapporto tra lieviti e LAB “ottimale 1:100”), la coesione del pre-fermento (che rappresentano un parametro importante), l’accettabilità organolettica (caratteristiche sensoriali), e i dati relativi alla composizione di ciascun ingrediente utilizzato in termini di composti funzionali (contenuto di fibre, composizione di acidi grassi, capacità antiossidanti ecc...). I consorzi selezionati, come riportato in precedenza, sono stati testati su differenti miscele di crusca e il loro metabolismo è stato valutato in termini di acidificazione, cinetica di crescita, profili di molecole volatili, SCFA e accettabilità organolettica. Tutti i risultati ottenuti hanno permesso di definire le formulazioni ottimali dei pre-fermenti ed i consorzi microbici più idonei. Nello specifico, 4 miscele di prefermenti e 2 consorzi microbici sono risultati i più interessanti per produrre pre-fermenti come ingredienti per la panificazione. Inoltre, i dati ottenuti hanno permesso di definire il livello ottimale di inoculo (6 e 4 log UFC/g rispettivamente per LAB e lieviti) di ciascun consorzio microbico testato. Le miscele e i consorzi microbici selezionati sono stati utilizzati al 20 e 30% per la produzione di pani innovativi. I risultati ottenuti hanno sottolineato che tutti i prefermenti testati conferivano buone prestazioni al prodotto finale. Infatti, all’aumentare della % di prefermento nella composizione del pane, si è verificato anche un aumento delle attività antiossidanti e dei fenoli totali, inoltre, non sono stati osservati effetti negativi sui parametri reologici e, per quanto riguarda l’aspetto sensoriale, i pani contenenti prefermento hanno evidenziato un aumento e dell’intensità gustativa e dell’accettazione complessiva.

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

- Rossi, S., Parrotta, L., Del Duca, S., Dalla Rosa, M., Patrignani, F., Schluter, O., & Lanciotti, R. (2021). Effect of *Yarrowia lipolytica* RO25 cricket-based hydrolysates on sourdough quality parameters. *LWT*, 148, 111760.
- Rossi, S., Parrotta, L., Gottardi D., Glicerina, V.T., Del Duca, S., Dalla Rosa, M., Patrignani, F., Schluter, O., & Lanciotti, R. Unravelling the potential of cricket-based hydrolysed sourdough on the quality of an innovative bakery product. *Journal of Insects as Food and Feed* (In Press).