



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

INFLUENZA DEI CAMPI ELETTRICI
PULSATI SULLA COMPONENTE LIPIDICA

INFLUENCE OF PULSED ELECTRIC FIELDS
ON THE LIPID COMPONENT

TIPO TESI: Compilativa

Studente:
ALESSIO BONIFAZI

Relatore:
DOTT.SSA ROBERTA FOLIGNI

Correlatore:
DOTT.SSA CINZIA MANNOZZI

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

Alla mia famiglia e a tutti i miei amici.

SOMMARIO

SOMMARIO.....	3
ELENCO DELLE TABELLE.....	6
ELENCO DELLE FIGURE	7
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI.....	8
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI.....	9
CAPITOLO 1 "RICERCA DATI"	10
1.1 Attività volta alla ricerca dati.....	10
CAPITOLO 2 "PULSED ELECTRIC FIELD (PEF)"	11
2.1 Storia del Pulsed Electric Field	11
2.2 Principio di Funzionamento (PEF).....	12
2.2.1 L'elettroporazione.....	12
2.2.2 Elettroporazione Reversibile.....	15
2.2.3 Elettroporazione Irreversibile.....	16
2.2.4 Fasi Elettroporazione.....	17
2.2.5 Potenziale Trasmembrana	17
2.3 Parametri di Elaborazione PEF.....	18
2.3.1 Intensità del Campo Elettrico.....	18
2.3.2 Tempo di Trattamento.....	19
2.3.3 Forma degli Impulsi.....	19
2.3.4 Ampiezza dell'impulso.....	20
2.3.5 Frequenza dell'impulso e Protocolli Impulsi.....	20
2.3.6 Energia dell'impulso.....	21
2.3.7 Differenza di Potenziale Elettrico.....	22
2.3.8 Temperatura.....	22
2.4 Impianto Tipico PEF.....	23
2.4.1 Generatore.....	23
2.4.2 Camera di Trattamento.....	24

2.4.2.1 Camera Statica.....	24
2.4.2.2 Camera a Flusso Continuo.....	26
2.4.3 Sistema Gestione Fluidi.....	27
2.4.4 Sistema di Monitoraggio della Temperatura e degli Impulsi.....	27
2.4.5 Computer Centrale.....	28
2.5 Limiti e Criticità.....	28
2.6 Applicazioni Alimentari.....	30
2.6.1 Inattivazione Microbica.....	31
2.6.1.1 Inattivazione Microbica nel Latte.....	32
2.6.1.2 Inattivazione Microbica nei Succhi.....	33
2.6.2 Inattivazione delle Spore.....	34
2.6.3 Inattivazione Enzimatica.....	34
2.6.4 Estrazione Composti Bioattivi.....	34
2.6.5 Essiccazione.....	36
2.6.6 Congelamento.....	37
2.6.7 Valorizzazione dei Rifiuti nell'Industria Alimentare.....	38
2.6.8 Principali Vantaggi del Trattamento PEF.....	39
CAPITOLO 3 "INFLUENZA PEF SULLA COMPONENTE LIPIDICA DI ALIMENTI".....	40
3.1 Lipidi.....	40
3.1.1 Lipidi negli Alimenti.....	41
3.2 Ossidazione Lipidica.....	41
3.2.1 Misura dell'Ossidazione Lipidica.....	43
3.3 Influenza PEF sulla Frazione Lipidica di diverse Matrici Alimentari.....	44
3.3.1 Olio di Arachidi.....	44
3.3.1.1 Analisi Acidi Grassi.....	44
3.3.1.2 Effetti sulla Composizione degli Acidi Grassi.....	45
3.3.1.3 Effetto del PEF sul Valore di Perossidi.....	47
3.3.2 Latte Capra.....	48
3.3.2.1 Acidi Grassi nel Latte di Capra.....	48
3.3.2.2 Risultati Trattamento PEF.....	49
3.3.3 Abalone.....	50
3.3.3.1 Risultati Trattamento PEF.....	50
3.3.3.2 Analisi Contenuto di Acidi Grassi.....	51

CONCLUSIONI.....53
BIBLIOGRAFIA.....54

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 2-2: Esempi di permeabilizzazione.....	17
Tabella 2-2: Valori di riferimento tipo nel latte.....	32
Tabella 2-3: Applicazioni per l'estrazione assistita da PEF.....	39
Tabella 3-1: Influenza dei trattamenti PEF sugli acidi grassi dell'olio arachidi.....	46

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 2-1: Simulazione di dinamica molecolare di un poro acquoso	14
Figura 2-2: Stati della membrana cellulare.....	15
Figura 2-3: Schema della configurazione a piastre parallele e camera di trattamento co- lineare con distribuzione qualitativa del campo elettrico nella zona di trattamento.....	18
Figura 2-4: Forme d'onda.....	20
Figura 2-5: Tipica unità PEF.....	23
Figura 2-6: Camera trattamento statica PEF progettata da Sale e Hamilton.....	25
Figura 2-7: Camera trattamento statica progettata da Zhang.....	25
Figura 2-8: Camera di trattamento a corrente continua.....	26
Figura 2-9: Profilo temperatura-tempo dei concetti di elaborazione PEF.....	29
Figura 2-10: Resa succo.....	36
Figura 3-1: ROS e radicali liberi.....	42
Figura 3-2: Meccanismo ossidazione lipidi.....	43
Figura 3-3: Cambiamento contenuto acidi grassi nell'olio di arachidi.....	45
Figura 3-4: Cambiamenti dei PV nei campioni di olio di arachidi.....	47
Figura 3-5: Abalone.....	50

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

PEF	Campi Elettrici Pulsati
NA	Sodio
K	Potassio
ATP	Adenosintrifosfato
PI	Ioduro di Propidio
AW	Attività dell'Acqua
Fe	Ferro
Cr	Cromo
MDA	Malondialdeide
TBA	Acido Tiobarbiturico
HPLC	Cromatografia Liquida ad Elevate Prestazioni
PV	Perossido
MUFA	Acidi Grassi Monoinsaturi
PUFA	Acidi Grassi Polinsaturi
SFA	Acidi Grassi Saturi
SCFA	Acidi Grassi a Catena Corta
MCFA	Acidi Grassi a Catena Media
LCFA	Acidi Grassi a Catena Lunga
AG	Acidi Grassi
Ni	Nichel
Mn	Manganese

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato lo studio dei Campi Elettrici Pulsati (Pulsed Electric Fields-PEF) e le molteplici applicazioni in ambito alimentare, in particolare gli effetti sulla frazione lipidica e il suo utilizzo come pretrattamento nelle varie trasformazioni alimentari.

I campi elettrici pulsati rappresentano una tecnologia di trattamento non termico di recente sviluppo, ideata tra il 1950 e il 1960 (Sitzmann et al., 2016). L'uso dei campi elettrici pulsati per la trasformazione e la conservazione di alimenti è stato sempre più approfondito negli ultimi anni da diversi gruppi di ricerca, in quanto ne è stata riscontrata la sua utilità in alternativa ai tradizionali trattamenti termici.

La principale peculiarità è la capacità di preservare le caratteristiche nutrizionali ed organolettiche dei prodotti rispetto agli altri trattamenti, favorendo l'elettroporazione di tessuti e membrane cellulari.

I composti nutrizionali di maggiore interesse trattati fino ad ora sono soprattutto proteine e amminoacidi liberi, lipidi e acidi grassi liberi, e infine vitamine e polifenoli (Silva et al., 2017).

I principali utilizzi di questa nuova tecnologia riguardano soprattutto l'estrazione di proteine e vari componenti come antociani o polifenoli, il recupero di composti ad alto valore alimentare (Koubaa et al., 2015) o l'utilizzo come pretrattamento in vari processi di trasformazione alimentare, quali essiccazione, congelamento, liofilizzazione.

Di notevole rilevanza è l'effetto sulla frazione lipidica degli alimenti, che comporta una riduzione delle reazioni ossidative favorendo il mantenimento delle caratteristiche organolettiche dell'alimento rispetto ai classici trattamenti (Eldevan et al., 2017).

CAPITOLO 1

“RICERCA DATI”

1.1 Attività volta alla ricerca dati

I vari articoli citati sono stati ricercati soprattutto tramite diverse piattaforme scientifiche, come Scopus, Springer Link o IEEE Xplore, inserendo nel database le parole chiavi come campi elettrici pulsati (Pulsed Electric Fields), acidi grassi (Fatty Acids), costituenti alimentari (Food Constituents), o applicazioni (Applications).

In particolare, nella prima ricerca che ho condotto tramite Scopus, ho inserito le parole chiavi Electric Pulsed Fields, e Fatty Acids, in modo tale da circoscrivere lo studio su 88 articoli. In seguito, leggendo gli articoli ho seguito le varie citazioni per approfondire i diversi argomenti.

In modo più specifico, sono stati fatti approfondimenti sulla storia del trattamento, i diversi campi di applicazione, e gli impianti più utilizzati con le relative problematiche annesse e l’influenza sulla frazione lipidica.

CAPITOLO 2

“PULSED ELECTRIC FIELD”

2.1 Storia dei campi elettrici pulsati

L'impatto dell'elettricità sulla trasformazione e lavorazione di matrici biologiche, ha sempre suscitato grande attenzione fin dalle prime applicazioni su diverse matrici.

I primi lavori sull'applicazione dell'elettricità relativi a substrati di origine biologica risalgono alla metà del Settecento. Durante questo periodo sono stati osservati fenomeni interessanti ma poco chiari negli studi sul trattamento di matrici biologiche con applicazione dei diversi tipi di elettricità (elettricità statica, correnti elettriche continue o alternate ed elettricità pulsata). Tra il 1958 e il 1960 iniziò ad essere applicato il trattamento del campo elettrico pulsato (PEF) per la lavorazione di prodotti alimentari e agricoli.

La loro generazione, applicazione e impatto sulle membrane cellulari è stata segnalata per la prima volta dall'ingegnere tedesco Heinz Doevenspeck che quindi può essere dichiarato il padre intellettuale della tecnologia del campo elettrico pulsato.

Doevenspeck sosteneva che il trattamento con campi elettrici pulsati mostrava i seguenti vantaggi rispetto alle tecnologie esistenti; ampia prevenzione dell'aumento della temperatura; alta redditività grazie al basso consumo energetico; trattamento delicato delle materie prime e conservazione dell'attività biologica; uccisione di germi patogeni.

I primi esperimenti con le applicazioni PEF per l'uccisione di microrganismi sono stati segnalati nel (1960). Successivamente, negli anni '70, furono eseguiti gli esperimenti fondamentali sulla rottura elettrica delle membrane biologiche, e quindi stabilito il concetto di elettroporazione di membrana (Koubaa et al., 2016).

Al giorno d'oggi il trattamento del campo elettrico pulsato (PEF) è considerato una tecnologia promettente che negli ultimi anni ha ricevuto notevole attenzione nelle applicazioni legate soprattutto agli alimenti e alla biotecnologia (Raso et al., 2016).

Il vantaggio principale della tecnologia PEF è quello di aumentare la sicurezza dell'alimento senza influire in modo significativo sulle caratteristiche organolettiche e nutrizionali, grazie alle basse temperature sviluppate durante il trattamento (Basso et al., 2021).

2.2 Principio di funzionamento PEF

L'utilizzo della tecnologia del campo elettrico pulsato (PEF) nella produzione alimentare è stata sostenuta dal crescente interesse dei consumatori per alimenti ad alto valore nutritivo, dalla domanda di prodotti freschi e da alimenti prodotti con l'uso di metodi ecocompatibili.

Nonostante la tecnologia PEF sia stata introdotta nell'industria alimentare molti anni fa, viene ancora considerato un trattamento emergente (Nowosad et al., 2020).

L'incremento di utilizzo di questa nuova tecnologia nell'ultimo decennio è dovuto alla sua capacità di operare a basse temperature lasciando inalterate le caratteristiche organolettiche e nutrizionali del prodotto senza un grande dispendio di energia (Morales-de la Peña et al., 2011).

Al contrario, i classici trattamenti termici, tradizionalmente utilizzati per la stabilizzazione biologica, sottopongono il campione alimentare a un intervallo di temperatura da 60 a oltre 100 °C per periodi variabili, e necessitano di un'enorme quantità di energia, dovuta al trasferimento dalla sorgente di calore alla matrice trattata.

Sebbene questi tipi di trattamenti distruggano o inibiscano i microrganismi alteranti e patogeni, che risultano dannosi per la salute e favoriscono il progredire di molte reazioni secondarie indesiderate, essi comportano anche la perdita di qualità nutrizionali e sensoriali degli alimenti (Ricci et al., 2018).

Il principio di base del PEF è l'applicazione di impulsi elettrici estremamente corti (da 1 a 100 μ s) dalla durata di microsecondi, con ampiezza ad alta tensione e intensità del campo elettrico compresa tra 0,1 e 80 kV/cm, che induce le membrane biologiche a possibili cambiamenti strutturali, andando a modificare la permeabilità, mediante formazione di micropori (elettroporazione).

A differenza del riscaldamento ohmico (dovuto ad una trasformazione integrale dell'energia elettrica in calore in qualsiasi circuito), il PEF applica un campo elettrico che, non essendo costante riesce a minimizzare l'effetto Joule (o riscaldamento ohmico) riducendo quindi il riscaldamento indotto nel prodotto (Basso et al., 2021).

2.2.1 Elettroporazione

Elettricamente, la membrana plasmatica cellulare può essere vista come un sottile foglio isolante circondato su entrambi i lati da soluzioni acquose di elettroliti.

I principali costituenti di ogni membrana cellulare sono i lipidi, glicolipidi e colesterolo.

Ognuna di queste tre classi lipidiche ha una parte idrofila (testa polare) e una parte idrofoba (coda non polare).

A causa di queste caratteristiche i lipidi in soluzioni acquose formano spontaneamente un doppio strato con le code non polari orientate verso l'interno e le teste polari rivolte verso l'esterno.

I lipidi sono tenuti insieme solo da interazioni deboli, e a temperature sufficientemente elevate, il doppio strato si comporta come un fluido bidimensionale, con le molecole lipidiche che si muovono facilmente lateralmente all'interno del doppio strato.

Nonostante la relativa debolezza delle interazioni tra i lipidi, la natura cooperativa di queste interazioni rende il doppio strato lipidico una struttura molto stabile. A causa del suo interno non polare, rappresenta una barriera quasi impenetrabile per le molecole polari disciolte nell'elettrolita acquoso su entrambi i lati. Tuttavia, l'acqua e alcuni ioni monoatomici riescono ad attraversare la membrana completamente intatta a velocità elevate.

A causa di questa alta velocità di trasporto molecolare, questo fenomeno non può essere ricondotto ad una diffusione semplice. Difatti in determinate condizioni, ad esempio, temperatura sufficientemente elevata, tensione superficiale o entrambe, questa permeazione può essere attribuita alla formazione e alla rapida richiusura di pori acquosi molto piccoli nel doppio strato lipidico, con raggi inferiori a un nanometro e durata inferiore a un nanosecondo che si formano e si richiudono a causa delle fluttuazioni termiche e meccaniche.

Questa spiegazione è stata comprovata da simulazioni di dinamica molecolare.

I pori possono formarsi senza un campo elettrico esterno che agisca sulla membrana, ma sono intrinsecamente instabili.

L'esposizione delle membrane biologiche a un campo elettrico esterno sufficientemente elevato può portare ad un rapido e grande aumento della loro conducibilità elettrica e permeabilità. Questo effetto è generalmente indicato come elettroporazione di membrana.

Al giorno d'oggi esiste un ampio consenso sul fatto che l'elettroporazione sia meglio descritta dalla teoria della formazione dei pori acquosi (da cui il nome). Secondo questa teoria, il campo elettrico induce una tensione attraverso il doppio strato aumentando il potenziale transmembrana e riducendo l'energia richiesta per la formazione spontanea di pori acquosi nel doppio strato. In modo da facilitare così la formazione di un numero maggiore di pori e pori più stabili che in assenza di campo elettrico. Formandosi e stabilizzandosi sotto l'influenza del campo elettrico, i pori hanno una durata che va da millisecondi fino a pochi minuti dopo la rimozione del campo.

Come accennato in precedenza, le simulazioni di dinamica molecolare forniscono un supporto per la formazione dei pori in assenza di un campo elettrico. Tuttavia, se in tali simulazioni un campo elettrico sufficientemente forte viene applicato perpendicolarmente al doppio strato, l'aumento della velocità di formazione dei pori e la stabilizzazione dei pori basata sulla transizione dalla forma dei pori idrofobica a quella idrofila, diventano chiaramente distinguibili, come mostra la Figura 2-1; (Kotnik et al., 2012).

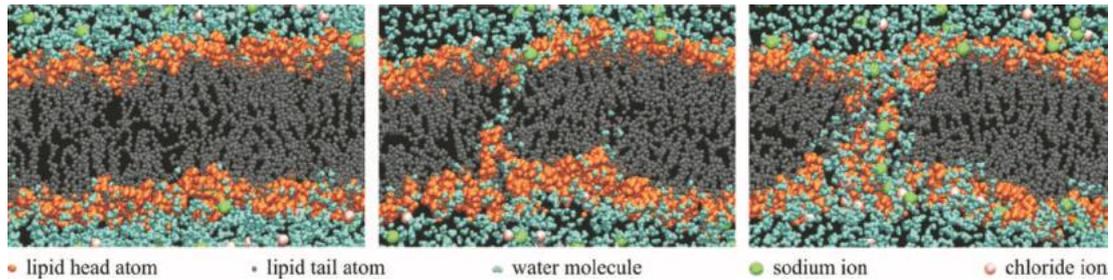


Figura 2-1: Una simulazione di dinamica molecolare di un poro acquoso che si forma in un doppio strato lipidico esposto a un campo elettrico perpendicolare al piano del doppio strato. A sinistra: il doppio strato intatto. Al centro: le molecole d'acqua penetrano nel doppio strato, formando un "filo d'acqua". A destra: i lipidi adiacenti si riorientano con la testa verso le molecole d'acqua nel doppio strato, stabilizzando il poro acquoso e permettendo agli ioni di entrare (Kotnik et al., 2012).

L'aumento del potenziale transmembrana può essere previsto con l'utilizzo dell'equazione di Maxwell (2.1) assumendo che la cellula abbia una conformazione perfettamente sferica e diverse altre semplificazioni come suggerito da Donsì et al., (2010).

$$u_m = 1.5r_{cell} E \cos(\theta) \quad (2.1)$$

Considerando U_m il potenziale transmembrana, r_{cell} il raggio della cellula e θ l'angolo fra il punto sulla cellula in cui si misura U_m e la direzione del vettore E . Questa polarizzazione è resa possibile applicando degli impulsi sufficientemente intensi da produrre un campo elettrico all'interno della cellula che sia abbondantemente più intenso del normale.

Anche in assenza di stimolazione elettrica, c'è un gradiente ionico che attraversa la membrana, risultante dal lavoro delle pompe sodio-potassio che permettono di trasportare contro gradiente di concentrazione tre ioni di sodio (Na^+) verso l'ambiente extracellulare e due

ioni di potassio (K⁺) verso l'ambiente intracellulare sfruttando l'energia derivante dall'idrolisi dell'adenosintrifosfato (ATP), e dei canali di perdita di potassio.

Il valore di tensione transmembrana in condizioni fisiologiche, dipende dal tipo di cellula, e in genere varia da (-80 a -40 mV); l'effetto di elettroporazione che porta alla permeabilizzazione della membrana cellulare è un processo locale, e avviene quando la differenza di potenziale transmembrana indotta dal campo elettrico raggiunge i 250 mV circa, il valore di elettroporazione varia a seconda del tipo di cellula, e dal risultato finale che si vuole ottenere (Nowosad et al., 2020).

A seconda della durata dell'esposizione della cellula al campo elettrico, dell'intensità del campo locale e della velocità di recupero della membrana, ci sono tre possibili risultati dell'applicazione del campo elettrico.

Se l'intensità del campo e il tempo di esposizione sono insufficienti e non raggiungono il valore critico, non c'è elettroporazione e la permeabilità e la vitalità delle cellule rimangono inalterate.

2.2.2 Elettroporazione reversibile

Se l'intensità di campo supera ciò che è noto come soglia reversibile e l'esposizione è di durata sufficiente, abbiamo la cosiddetta elettroporazione reversibile; la membrana è permeabilizzata e rimane in uno stato di maggiore permeabilità per un periodo di tempo, ma alla fine è in grado di ritornare spontaneamente al suo stato originale mediante la richiusura della membrana, processo in cui i pori si chiudono e la cellula ripristina il suo normale potenziale transmembrana, come possiamo vedere in Figura 2-2 (Miklavčič et al., 2014).

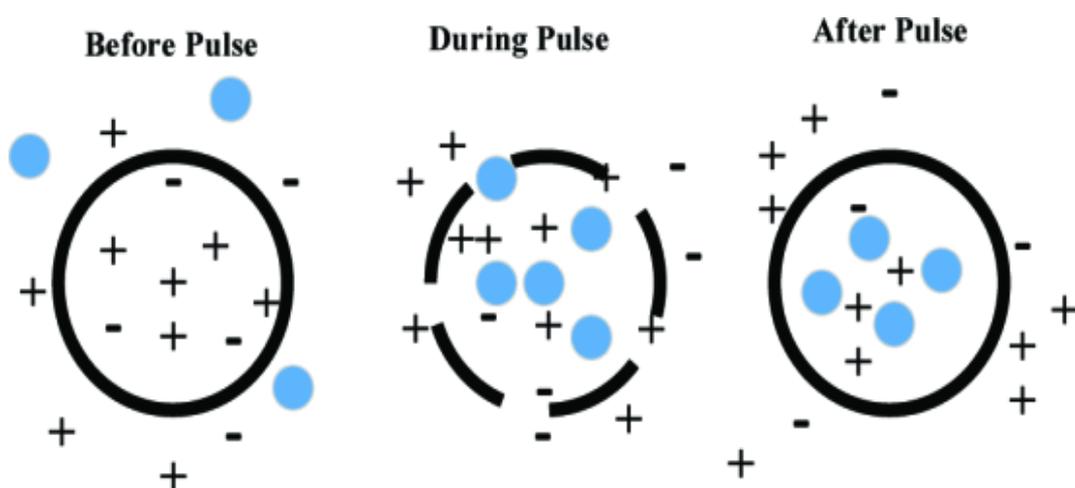


Figura 0-2: Stati della membrana cellulare (Coban et al., 2019).

La sigillatura dipende dal tempo di esposizione e dall'intensità del campo elettrico, può durare da pochi secondi a diverse ore, a seconda della temperatura.

Ad esempio, a 37 ° C i difetti della membrana si chiudono in pochi secondi, a 4 ° C in pochi minuti e quando le cellule vengono mantenute in ghiaccio, sono necessarie diverse ore (Nowosad et al., 2020).

L "'elettroporazione" reversibile è una procedura solitamente utilizzata in biologia molecolare e applicazioni biotecnologiche cliniche in vivo per accedere al citoplasma al fine di introdurre o fornire farmaci in vivo, oligonucleotidi, anticorpi, plasmidi, ecc. (Raso et al., 2016).

La formazione di micropori con l'introduzione di varie molecole può essere verificata grazie all'utilizzo di indicatori fluorescenti come lo ioduro di propidio (PI), una volta assorbito dalla cellula, si lega al DNA intercalando tra le basi con poca o nessuna preferenza di sequenza, ed in seguito in una soluzione acquosa, PI ha un'eccitazione fluorescente e un'emissione massima di 636 nm (rosso), che consente tramite specifica apparecchiatura la prova della permeabilizzazione di membrana.

Quando il funzionamento del campo elettrico si interrompe, i difetti della membrana si sigillano e le cellule trattengono le molecole o gli ioni introdotti come in Figura 2-2; (Nowosad et al., 2020).

2.2.3 *Elettroporazione irreversibile*

Se l'intensità del campo elettrico e la quantità di energia erogata è troppo alta superando abbondantemente un determinato valore soglia, si verificherà un'elettroporazione irreversibile, con conseguente perdita di omeostasi cellulare (e possibilmente una rottura completa della membrana), uccidendo efficacemente la cellula (Miklavčič et al., 2014).

I principali utilizzi che si basano sulla permeabilizzazione irreversibile delle membrane cellulari, interessano applicazioni di PEF legate agli alimenti e alla biotecnologia, tra cui pastorizzazione "a freddo" di alimenti liquidi e disinfezione delle acque reflue mediante inattivazione microbica, o trattamenti assistiti da PEF (come essiccazione, liofilizzazione, congelamento etc.) utilizzati per migliorare la qualità del cibo, accelerare i processi di trasferimento del calore, nonché migliorare l'efficienza del trasferimento di massa di acqua, soluti, succhi o composti ad alto valore aggiunto da matrici di origine biologica (Raso et al., 2016).

2.2.4 Fasi elettroporazione

Nel complesso, il processo di elettroporazione come descrive Donsì et., (2010) consiste in diverse fasi, tra cui:

- carica e polarizzazione delle membrane (tempo di carica di $\approx 1 \mu\text{s}$ circa);
- destabilizzazione temporale e creazione di pori (segnalata come avvenuta su scale temporali di 10 ns);
- espansione dei raggi dei pori e aggregazione di diversi pori (in un intervallo di tempo variabile, che dura per tutta la durata degli impulsi);
- risigillatura dei pori che avviene dopo l'applicazione dell'impulso elettrico (durata da secondi a ore) nel caso di elettroporazione reversibile;

2.2.5 Potenziale transmembrana

Il valore di potenziale transmembrana dipende in particolare, dalle dimensioni e dalla forma delle cellule, nonché dalla concentrazione delle cellule in sospensione o dalla struttura e dalle proprietà del tessuto cellulare. Per le celle sferiche il valore di potenziale transmembrana è direttamente proporzionale alla dimensione.

Alcuni esempi di valori soglia sperimentalmente stimati di intensità di campo elettrico, sono dell'ordine di 100-500 V/cm per i tessuti cellulari con grandi cellule ($\approx 30\text{-}60 \mu\text{m}$) e $> 3\text{-}10$ kV/cm per piccole cellule microbiche ($\approx 1\text{-}10 \mu\text{m}$) (Barba et al., 2015).

Nella tabella sottoindicata, vengono presi come esempi, alcuni intervalli d'intensità del campo elettrico, su diverse matrici biologiche e con diversi risultati di permeabilizzazione, ottenuti da precedenti studi e verifiche in laboratorio (Nowosad et al., 2020).

Tabella 2-1: Esempi di permeabilizzazione

TIPO PERMEABILIZZAZIONE	INTERVALLO DI INTENSITÀ
<i>REVERSIBILE</i>	l'intervallo di intensità del campo elettrico 0,1–1 kV / cm provoca la permeabilizzazione reversibile delle cellule vegetali.
<i>IRREVERSIBILE</i>	l'intervallo di intensità del campo elettrico 0,5–3 kV / cm provoca la permeabilizzazione irreversibile del tessuto vegetale e animale,
<i>IRREVERSIBILE</i>	l'intervallo di intensità del campo elettrico 15–40 kV / cm provoca la permeabilizzazione irreversibile delle cellule microbiche

2.3 Parametri di elaborazione PEF

A seconda delle proprietà del prodotto alimentare trasformato e degli effetti da ottenere, i vari parametri di processo risultano fondamentali per descrivere accuratamente le condizioni di elaborazione.

Di seguito sono brevemente riassunti i principali parametri del processo che permettono il controllo e la gestione del trattamento PEF.

2.3.1 Intensità del campo elettrico

L'intensità del campo elettrico si esprime in (kV cm^{-1}) e si riferisce all'intensità del campo presente localmente nella camera di trattamento durante la lavorazione del campione, dipende dall'ampiezza della tensione applicata tra gli elettrodi, dalla distanza tra gli elettrodi e dalla proprietà dielettrica del materiale tra gli elettrodi. In un sistema di elettrodi a piastre parallele come in (Fig.2-3) con geometria uniforme di camere di trattamento in batch o continue, la correlazione dell'intensità del campo elettrico è mostrata nell'equazione (2.2) se gli effetti sul bordo vengono trascurati (Raso et al., 2016).

$$E = \frac{U}{L} \tag{2.2}$$

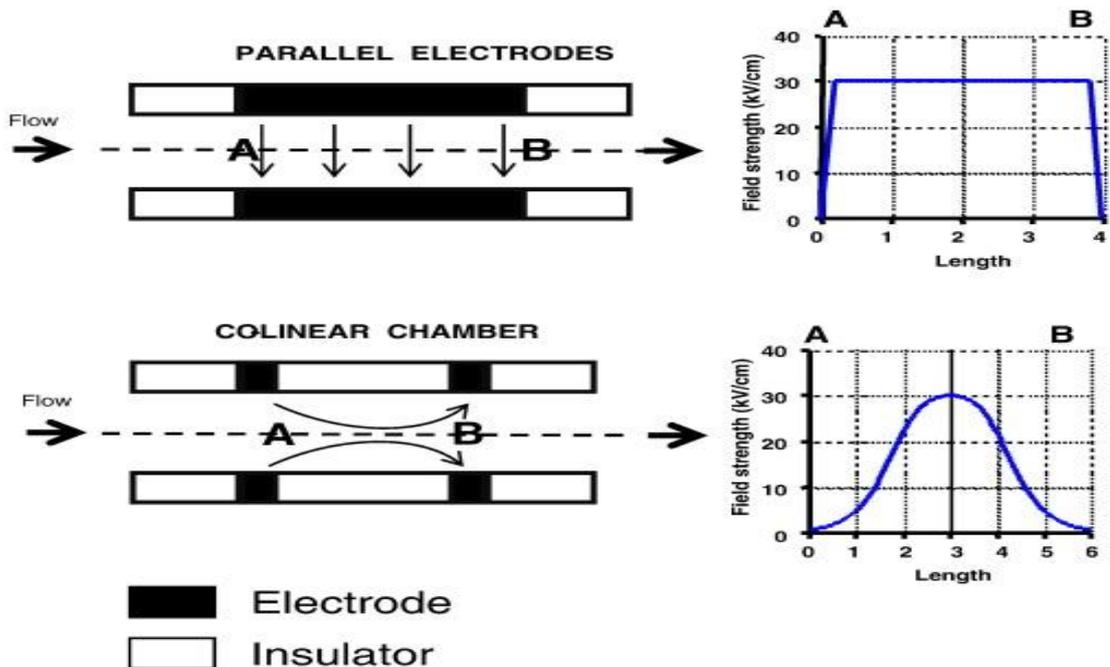


Figura 2-3: Schema della configurazione a piastre parallele e camera di trattamento co-lineare con distribuzione qualitativa del campo elettrico nella zona di trattamento (Raso et al., 2016).

2.3.2 Tempo di trattamento

Il tempo di trattamento si riferisce al numero di impulsi applicati (n) moltiplicato per la durata dell'impulso:

$$t = n \cdot \tau \tag{2.3}$$

dove τ dipende dalla forma dell'impulso (Raso et al., 2016).

2.3.3 Forma degli impulsi

Gli impulsi possono differire fra di essi in base al tipo di tecnologia che li produce. Queste differenze consistono nella forma con cui l'impulso viene rappresentato, ovvero nell'evoluzione del voltaggio per tutta la durata dell'impulso. Le forme degli impulsi comunemente usate nei trattamenti PEF sono impulsi esponenziali o ad onda quadra, unipolari o bipolari, ve ne sono poi molte altre e hanno molta importanza in quanto ogni tipo d'impulso può avere effetti leggermente diversi sulla matrice trattata. Le forme d'onda sono mostrate in (Fig.2-4) (Raso et al., 2016).

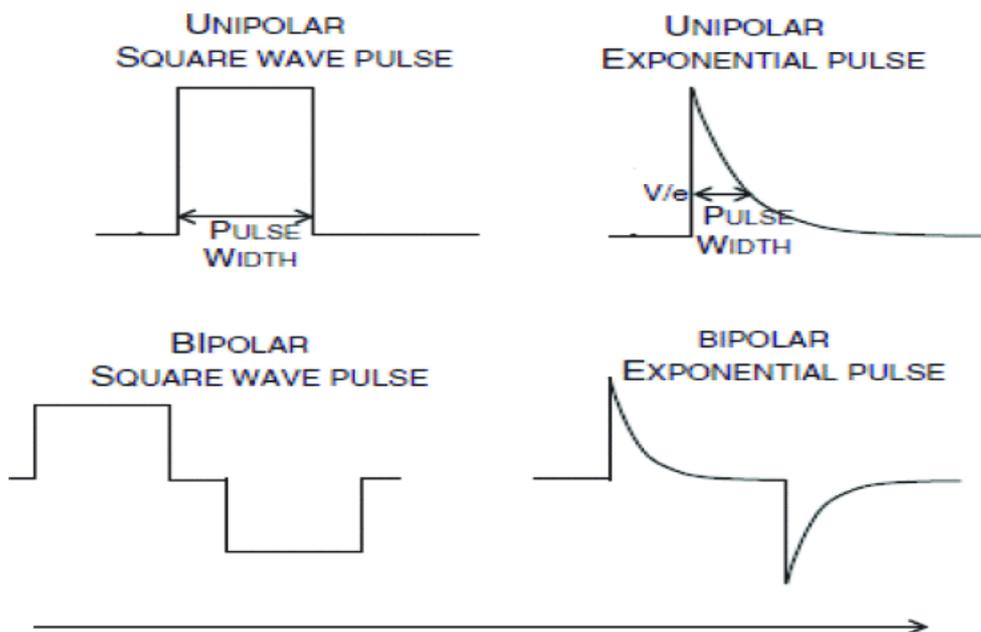


Figura 2-4: Forme d'onda (Raso et al., 2016).

Per definire con precisione l'intensità del trattamento è necessario monitorare con un oscilloscopio di qualità le forme d'onda, le ampiezze e le durate di tensione e corrente applicate durante i test (Coban et al., 2019).

2.3.4 Ampiezza dell'impulso

L'ampiezza dell'impulso o durata dell'impulso, è definita come il tempo durante il quale la tensione applicata per gli impulsi quadrati può essere mantenuta al livello massimo (tensione di picco).

Nel caso di impulsi a decadimento esponenziale, l'ampiezza dell'impulso è definita come il tempo necessario per diminuire la tensione al 37% del suo valore di picco, come in (Fig.2-4).

2.3.5 Frequenza dell'impulso e protocolli impulsivi

La frequenza d'impulso, indica il numero di impulsi applicati per unità di tempo ed è riportata in Hz (numero di impulsi / s), la specifica della frequenza degli impulsi è importante, poiché determina la quantità di energia elettrica erogata per unità di tempo sul prodotto posto nella camera di trattamento, che a sua volta influisce sull'aumento di temperatura del prodotto lavorato per effetto Joule.

Oltre alla frequenza degli impulsi, dovrebbe essere descritto in dettaglio anche il protocollo degli impulsi. Per il trattamento batch, devono essere riportati il numero di impulsi applicati per ciascun periodo e l'intervallo di tempo tra due impulsi consecutivi.

Mentre per il trattamento a flusso continuo, deve essere specificato anche il numero di ricircoli del prodotto trattato attraverso la camera PEF, inoltre, è bene ricordare che, nel trattamento batch, il numero di impulsi elettrici da applicare è impostato direttamente dall'operatore mentre nel processo a flusso continuo, è in funzione della frequenza degli impulsi e del tempo di permanenza (t_r) del prodotto nella camera di trattamento, che dipende dalla portata (F) e dal volume (v) della zona di trattamento, secondo la seguente equazione (Raso et al., 2016):

$$n = t_r \cdot f = \frac{v}{F} \cdot f \quad (2.4)$$

2.3.6 Energia dell'impulso

La densità di energia (W), importante nella determinazione del costo energetico del trattamento, si misura in (kJ/kg / impulso), è l'energia elettrica ricevuta dal prodotto trattato nella camera PEF per ogni impulso. Dipende dalle proprietà elettriche del prodotto trattato e dalla forma dell'impulso (inclusa la tensione di picco e l'ampiezza dell'impulso). A causa delle perdite attraverso le connessioni e i componenti del circuito di scarica, il valore di W è generalmente diverso dall'energia emessa dal generatore di impulsi. Inoltre, le forme d'onda di tensione e corrente possono deviare notevolmente dalle forme quadrate o esponenziali ideali.

Pertanto, secondo l'Equazione (2.5), l'energia specifica in ingresso per impulso (W) deve essere valutata dall'integrale nel tempo delle forme d'onda registrate di tensione e corrente nella camera di trattamento (Raso et al., 2016).

$$W = \frac{1}{m} \int_0^{\infty} \frac{U(t)^2}{R} dt = \frac{1}{m} \int_0^{\infty} U(t) \cdot I(t) dt \quad (2.5)$$

dove m è la massa del campione trattato, $U(t)$ e $I(t)$ sono, rispettivamente, la tensione ai capi e la corrente attraverso il carico della camera di trattamento al tempo t . R (in Ω) è la resistenza elettrica della camera di trattamento.

2.3.7 Differenza di potenziale elettrico

La differenza di potenziale elettrico, detta anche tensione, indica la differenza tra il potenziale elettrico di due punti dello spazio. Coincide con la tensione elettrica (talvolta impropriamente indicata con il termine voltaggio) ed indica l'energia o il lavoro necessari a separare cariche elettriche di segno opposto.

2.3.8 Temperatura

Infine, la temperatura è considerato un parametro critico da controllare, in quanto influenza l'efficacia del trattamento con PEF.

Diversi rapporti hanno descritto una maggiore inattivazione microbica o permeabilizzazione del grado cellulare all'aumentare della temperatura di trattamento PEF; la cellula biologica diventa più fluida e la sua resistenza meccanica diminuisce con l'aumentare della temperatura di lavorazione, rendendo la membrana cellulare più incline all'elettroporazione.

D'altra parte, la dissipazione dell'energia elettrica fornita al prodotto durante il trattamento PEF aumenta la temperatura del prodotto, che a sua volta aumenta la conducibilità elettrica modificando la viscosità del prodotto.

Pertanto, l'incremento della temperatura del prodotto può abbassare la resistenza della camera di trattamento, portando ad una diminuzione dell'intensità del campo applicato, a meno che la tensione esterna non venga aumentata di conseguenza.

Inoltre, l'aumento della temperatura può anche portare a una sovrastima dell'efficacia del trattamento a causa dell'effetto sensibilizzante della temperatura sulla resistenza al PEF delle cellule biologiche.

È stato dimostrato che l'aumento della temperatura, come conseguenza del riscaldamento Joule, è migliorata a campi elettrici più elevati, energia specifica totale, frequenze e ampiezze di impulso. Pertanto, le condizioni di lavorazione ottimali per studiare l'influenza di questi fattori sull'esito del processo PEF dovrebbero essere scelte minimizzando i relativi effetti di riscaldamento, ad esempio utilizzando camere di trattamento in cui è possibile raffreddare gli elettrodi (Raso et al., 2016).

2.4 Impianto tipico (PEF)

Una tipica unità PEF è composta di pochi componenti di base; generatore d'impulsi ad alta tensione, camera di trattamento, sistema di monitoraggio della temperatura e degli impulsi, computer centrale e dispositivi di controllo fluidi (Fig. 2-5).

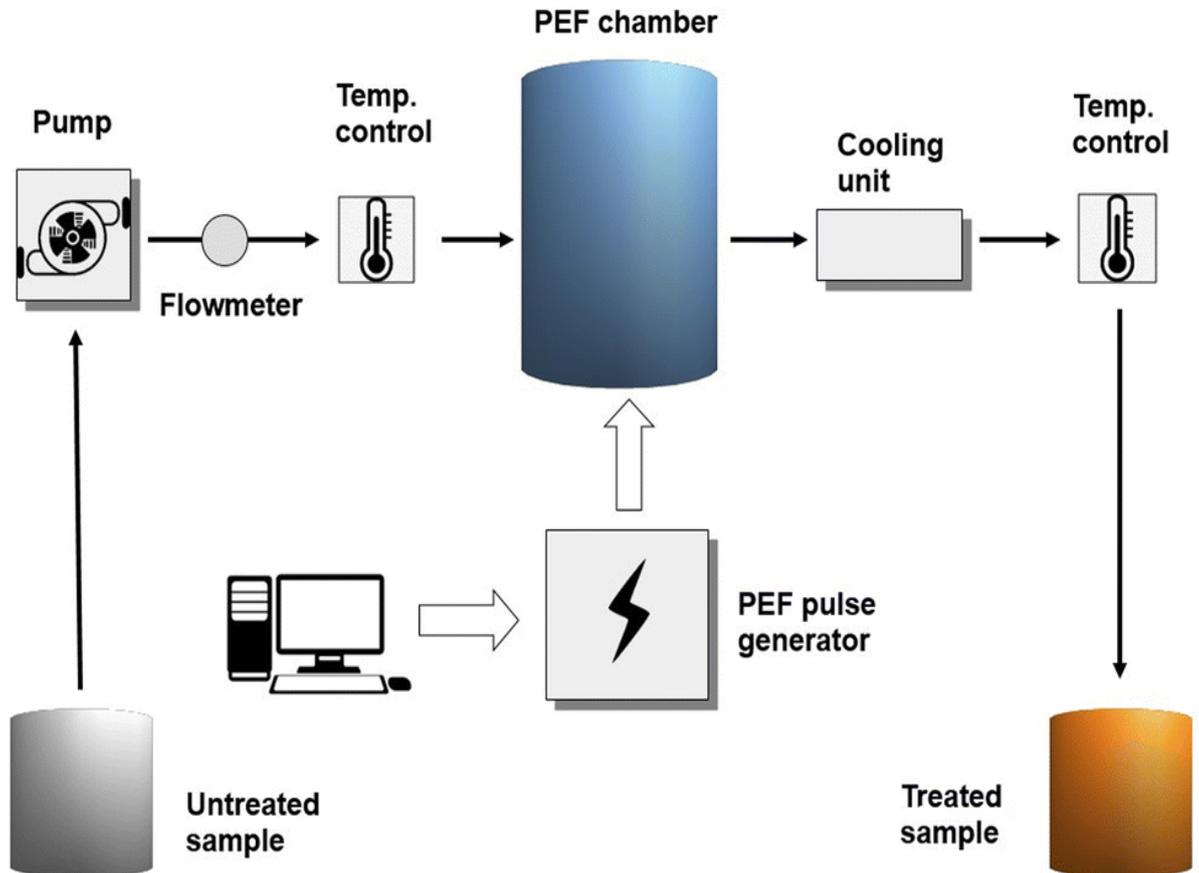


Figura 2-5: Una tipica unità PEF utilizzata nella lavorazione degli alimenti (Nowosad et al., 2020).

2.4.1 Generatore

I generatori di impulsi convertono la bassa tensione in alta tensione, fornendo gli impulsi con la forma, la durata e l'intensità richieste. Generalmente la bassa tensione viene raccolta e immagazzinata in un condensatore, e successivamente viene scaricata istantaneamente sul substrato.

Gli impulsi che vengono generalmente utilizzati per il trattamento PEF sono quelli quadrati, di decadimento esponenziale o oscillatori. Una volta generati, gli impulsi, vengono applicati ad una coppia di elettrodi presenti nella camera di trattamento (Min et al., 2007).

2.4.2 Camera di trattamento

La camera di trattamento è composta da due elettrodi separati da materiali isolanti e uno spazio da riempire con il campione alimentare da trattare; la distanza tra elettrodi, la tensione applicata e la geometria della camera influenzano il trattamento definendo l'intensità del campo elettrico e modulando l'energia fornita per unità di area (Ricci et al., 2018).

I due trattamenti di maggiore rilevanza con utilizzo di PEF sono le camere di trattamento batch e camere di trattamento a flusso continuo.

2.4.2.1 Camera statica

Nella lavorazione statica, porzioni di prodotto alimentare fluido vengono trattate come un'unità, sottoponendo tutto il fluido alla camera di trattamento PEF in cui l'intensità di campo uniforme viene sostanzialmente applicata a tutti gli elementi del prodotto alimentare da trattare.

Esistono diversi modelli di camere di trattamento statico, che sono cambiate nel tempo grazie ad una maggiore comprensione del trattamento.

Le prime camere di trattamento statico furono progettate da Sale e Hamilton per l'inattivazione dei microrganismi negli anni '60, contenevano due elettrodi di carbonio sostenuti da blocchi di ottone scavati per il flusso, provvisti di camicie per il ricircolo dell'acqua e il controllo della temperatura degli alimenti durante il trattamento, e un distanziatore in polietilene a forma di U posto tra gli elettrodi per formare la camera (Fig.2-6).

Grazie a queste camere è possibile applicare un campo elettrico non oltre i 30 kV/cm a causa del guasto elettrico causato da bolle d'aria negli alimenti (Huang et al.,2009).

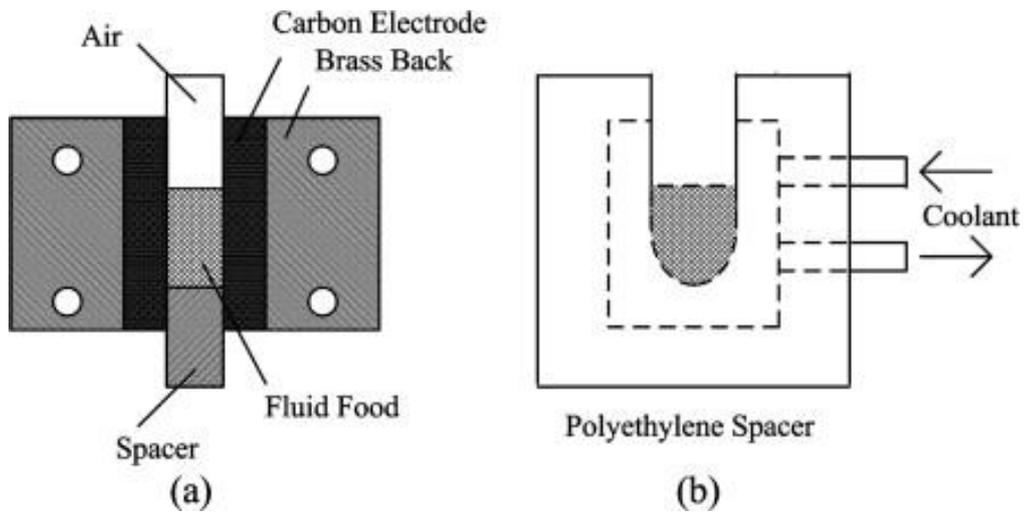


Figura 2-6: Camera di trattamento statica PEF progettata da Sale e Hamilton, 1967(a), Sale e Hamilton, 1967(b). (a) Vista in sezione che mostra l'allineamento di tre parti. (b) Distanziatore a forma di U e collegamento del refrigerante (Huang et al.,2009).

Di origine più recente è la camera di trattamento statica sigillata, progettata nei primi anni 2000 da Zhang (Fig.2-7).

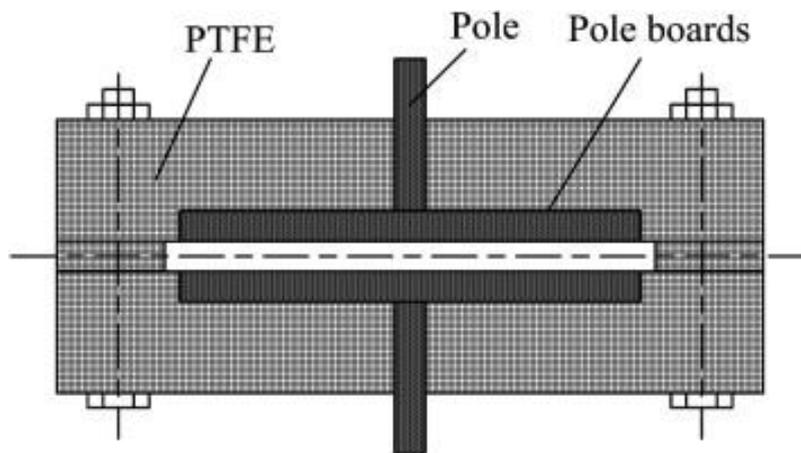


Figura 2-7: Mappa di schizzo della camera di trattamento statico progettata da Zhang (2005) (Huang et al.,2009).

2.4.2.2 Camera a flusso continuo

La camera a flusso continuo (Fig.2-8) è molto conveniente per i processi industriali perché consente il pompaggio di prodotti liquidi e semiliquidi attraverso la camera rispetto al trattamento in batch (Nowosad et al., 2020).

Nella lavorazione a flusso continuo, il prodotto alimentare trattato fluisce e viene emesso dal sistema di trattamento PEF in un flusso costante da una pompa, e il design della camera di trattamento è uno sviluppo graduale dalle camere di trattamento statiche alle camere di trattamento continuo. È importante che la camera di trattamento del PEF sia progettata per fornire un campo elettrico elevato e relativamente uniforme nella zona di trattamento, riducendo al minimo la capacità o le condizioni di guasto elettrico (Huang et al., 2009).

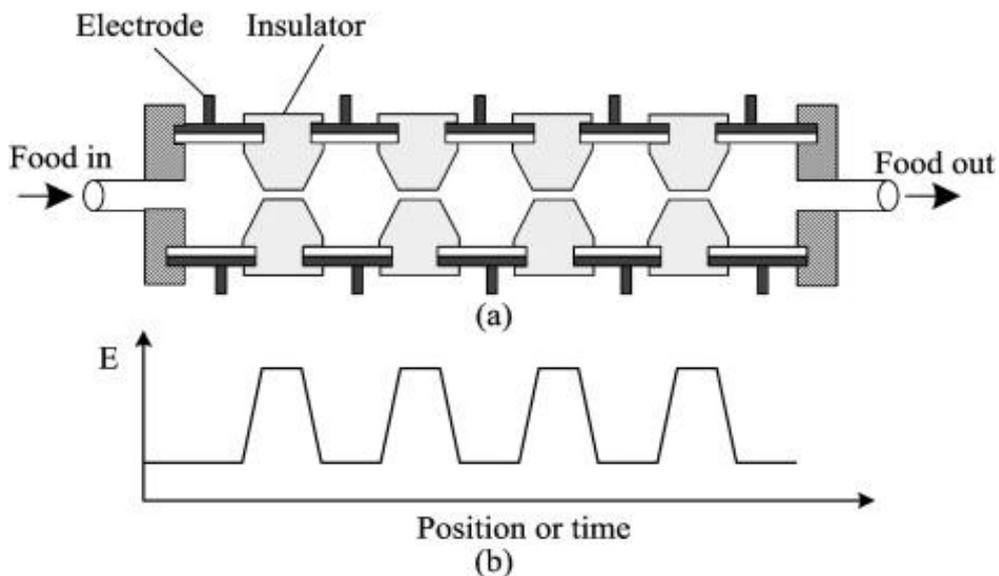


Figura 2-8: Una camera di trattamento a corrente continua ad alto campo elettrico. (a) Camera e (b) campo elettrico in funzione del tempo o posizione come commutazione del fluido (Huang et al., 2009).

I due modelli di camere di trattamento più utilizzati considerati per l'applicazione di PEF a flusso continuo sono gli elettrodi a piastre parallele e le configurazioni co-lineari (Fig.2-3).

La configurazione dell'elettrodo a piastra parallela è la più semplice nel design e consiste in un canale di materiale isolante di forma parallelepipedica rettangolare con due elettrodi sui lati opposti. Come riportato in precedenza, questa configurazione fornisce tipicamente un

campo elettrico uniforme nella zona di trattamento, con il campo elettrico applicato perpendicolare al flusso del prodotto. Tuttavia, poiché è caratterizzato da un'ampia superficie dell'elettrodo e da una bassa resistenza elettrica intrinseca, generalmente funziona a correnti elevate, il che può anche facilitare l'attivazione di fenomeni elettrochimici indesiderati all'interfaccia elettrodo-liquido alimentare della camera PEF (corrosione dell'elettrodo).

Nella configurazione co-lineare, le coppie di elettrodi tubolari sono distanziate da tubi distanziatori isolanti. Il prodotto viene trattato mentre scorre da un elettrodo all'altro, parallelo al campo elettrico. Tale configurazione presenta una vantaggiosa fluidodinamica, altamente richiesta per la lavorazione degli alimenti e conveniente per la pulizia in loco, nonché un'elevata resistenza intrinseca dovuta alla bassa area effettiva della sezione trasversale degli elettrodi tubolari. Pertanto, questo dispositivo funziona tipicamente a una corrente inferiore rispetto alla configurazione a piastre parallele, il che lo rende adatto per limitare il verificarsi di reazioni degli elettrodi, nonché per il collegamento di più unità co-lineari in parallelo dal punto di vista elettrico. Il problema principale di questa configurazione è la disomogeneità nell'intensità del campo elettrico e nella distribuzione della temperatura nella zona di trattamento durante i processi industriali (Raso et al., 2016).

2.4.3 Sistema gestione fluidi

I sistemi di gestione fluidi si occupano del trasferimento dei prodotti per la lavorazione e il confezionamento, monitorando e controllando anche la portata, la temperatura e la pressione durante la lavorazione. Per le unità PEF da banco, il sistema di gestione dei fluidi è generalmente formato da tubi in acciaio inossidabile e una pompa, fornendo un flusso continuo di un prodotto da trattare. Per impianti pilota o sistemi PEF su scala commerciale integrati con il sistema di confezionamento asettico, il sistema di gestione dei fluidi deve avere mobilità e flessibilità della sequenza di elaborazione e consentire la pulizia e la sterilizzazione dell'impianto (Min et al., 2007).

2.4.4 Sistema di monitoraggio della temperatura e degli impulsi

Nei sistemi PEF da banco in genere ci sono delle termocoppie collegate a tubi di acciaio inossidabile, in cui scorre il prodotto alimentare, per monitorare le variazioni di temperatura durante i trattamenti PEF. Le temperature dei prodotti prima e dopo il trattamento vengono controllate immettendo i tubi in bagnomaria impostati a temperature target. I sistemi PEF su scala commerciale o su impianto pilota utilizzano una serie di scambiatori di calore tubolari per il controllo della temperatura prima e dopo i trattamenti PEF. Una serie di sonde in grado

di rilevare sia la temperatura che la resistenza viene collocata all'ingresso e all'uscita delle camere di trattamento del PEF e alle uscite degli scambiatori di calore per monitorare le temperature del sistema. Gli impulsi vengono monitorati con sonde ad alta tensione, monitor di corrente e oscilloscopi (Min et al., 2007).

2.4.5 *Computer centrale*

Infine, abbiamo un computer centrale che controlla il processo, utilizzato soprattutto per impostare i vari parametri, controllare il funzionamento di pompa e la raccolta dei dati provenienti dalle sonde poste all'interno della camera.

Di conseguenza, al fine di descrivere accuratamente le condizioni di elaborazione, è necessario riportare le varie caratteristiche dell'impianto e conoscere accuratamente tutti i parametri riportati in precedenza (Raso et al. 2016).

2.5 **Limiti e criticità**

Nei diversi tipi di trattamento sono state riscontrate varie problematiche e limiti tecnici che hanno impedito lo sfruttamento della PEF a livello industriale per molti anni.

Ad esempio, in prodotti liquidi trasformati con PEF il problema di maggiore rilevanza è una non uniformità di distribuzione di campo elettrico all'interno della camera di trattamento, causato dalla sua configurazione, dalla presenza di bolle e impurità, e dalle proprietà termofisiche del prodotto stesso. Di conseguenza, alcune parti del volume del liquido possono essere sotto trattate (spesso in spazi centrali o morti) o eccessivamente trattate (spesso nelle regioni di confine), ovviamente questa problematica diventa rilevante quando si parla ad esempio di pastorizzazione a freddo, in quanto tutti i microrganismi devono subire la stessa intensità di trattamento, in modo da non avere problemi legati alla salubrità del prodotto (Nowosad et al., 2020).

Inoltre, la dimensione massima delle particelle dell'alimento liquido in modalità di trattamento sia statica che a flusso continuo, deve essere inferiore allo spazio della regione di trattamento nella camera al fine di mantenere una corretta condizione di trattamento.

Un'altra possibile problematica legata all'utilizzo dei campi elettrici pulsati riguarda la temperatura e il consumo energetico.

Come abbiamo già accennato i meccanismi con campi elettrici pulsati si basano su un meccanismo di trattamento non termico, nonostante ciò, si verifica un aumento della temperatura del prodotto a causa della dissipazione dell'energia elettrica (effetto joule). Un

apporto energetico specifico di, ad esempio, 220 kJ/kg provocherà un aumento della temperatura da 20 ° C a 72 ° C, utilizzando come esempio l'acqua con una capacità termica specifica di 4,19 kJ/kg K.

Nei trattamenti per l'inattivazione microbica, a seconda del prodotto e dell'organismo bersaglio questo apporto energetico specifico potrebbe ancora non essere sufficiente per una riduzione desiderata della popolazione microbica, portando a un aumento della temperatura ancora più elevato.

Un concetto per prevenire l'innalzamento della temperatura oltre un certo livello è quello di dividere l'apporto energetico totale necessario per l'inattivazione microbica in più parti. Pertanto, l'allineamento seriale di più camere di trattamento con sezioni di raffreddamento intermedie è un'opzione per mantenere la temperatura al di sotto dei livelli critici, come in Fig. 2-9.

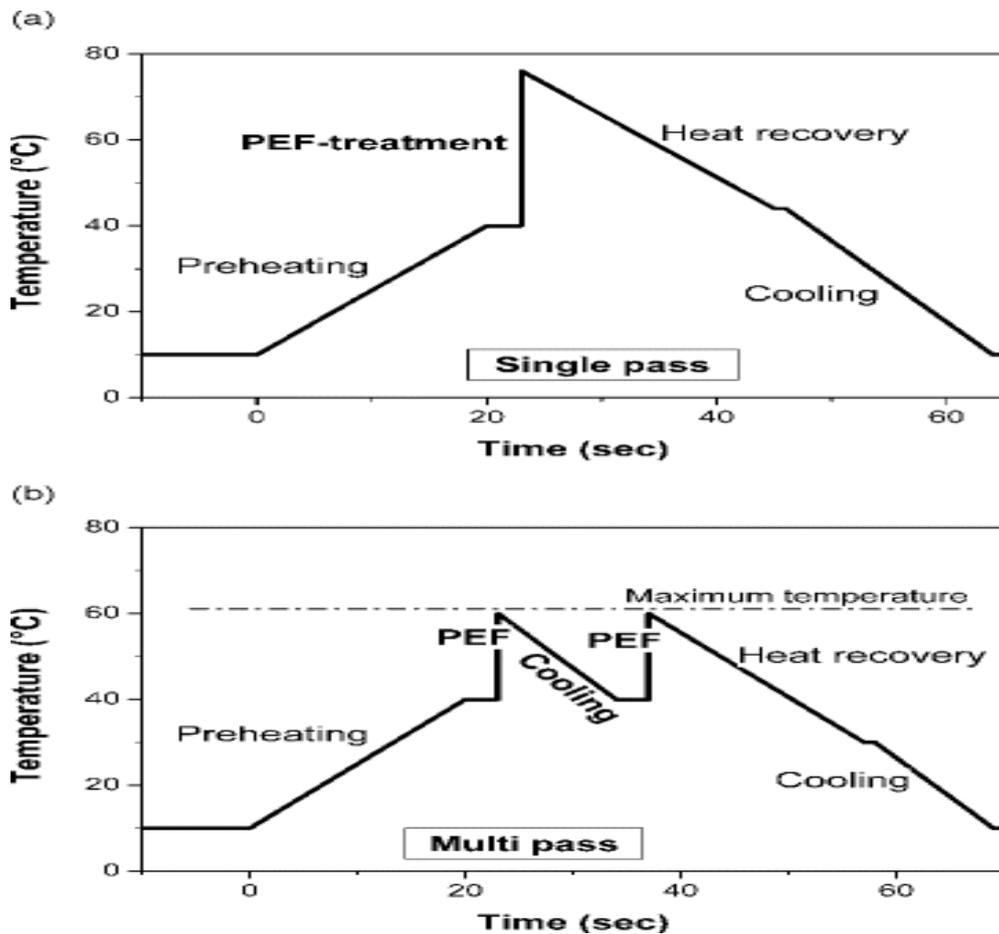


Figura 2-9: Profilo temperatura-tempo dei concetti di elaborazione PEF a passaggio singolo e multipass (Jaeger et al., 2009).

Per il raffreddamento, sarà necessaria una quantità aggiuntiva di energia, portando a un bilancio energetico sfavorevole e a costi operativi elevati.

Utilizzando una combinazione di trattamento termico e PEF, il consumo di energia e la temperatura massima possono essere ridotti; una determinata inattivazione può essere ottenuta a temperature inferiori senza alcun tempo di permanenza con conseguente minor carico termico. Pertanto, dal punto di vista dell'elaborazione, suddividere l'energia totale richiesta in energia termica, che rende i microbi più suscettibili al PEF, e l'energia degli impulsi elettrici, che provoca l'elettroporazione, è una possibilità per l'ottimizzazione dell'inattivazione e del consumo di energia (Jaeger et al., 2009).

Un'ulteriore possibile problematica riguarda la sicurezza del processo.

La stessa tecnologia del campo elettrico pulsato è generalmente considerata sicura per l'uomo, perché non sono state rilevate reazioni chimiche pericolose; tuttavia, i risultati di alcuni studi indicano che i componenti del materiale degli elettrodi (ad esempio Fe, Cr, Ni, Mn) vengono rilasciati nei campioni di alimenti liquidi a causa della corrosione.

Questo problema può essere superato mediante l'applicazione di elettrodi di carbonio, indubbiamente, sono necessarie ulteriori ricerche per determinare le condizioni ottimali per il trattamento del PEF su scala industriale, nonché il materiale e la geometria degli elettrodi, in modo da eliminare o almeno ridurre al minimo le reazioni indesiderate degli elettrodi.

Altri elementi che hanno contribuito ad attenuare la diffusione della tecnologia PEF, sono la scarsa descrizione dei protocolli operativi, il controllo e monitoraggio dei parametri del campo elettrico e la mancanza di un modo standardizzato di riportare le condizioni di trattamento; questi tipi di trattamenti sono ancora circoscritti a limitati prodotti alimentari in grado di resistere ai campi elettrici elevati, come liquidi omogenei con bassa conduttività elettrica (cioè basso contenuto salino) che forniscono le condizioni ideali per un trattamento con il metodo PEF; infine la mancanza di apparecchiature industriali affidabili e praticabili ha rappresentato un'ulteriore fattore critico per supportare l'aumento di scala dei volumi da trattare (da mL a m³) (Nowosad et al., 2020).

2.6 Applicazioni alimentari

I campi elettrici pulsati, come già accennato vengono impiegati per diversi scopi, sia nel campo alimentare che in quello biotecnologico; in particolare, verranno descritte le applicazioni attinenti ai trattamenti su matrici alimentari.

2.6.1 *Inattivazione microbica*

Una delle più importanti applicazioni dei PEF è l'inattivazione microbica, come alternativa ai tradizionali trattamenti termici. Già a partire dai primi anni '90, sono state testate molte nuove tecniche pratiche assistite da PEF e la loro fattibilità per l'uccisione microbica.

Il trattamento con PEF comporta la distruzione della membrana cellulare rendendola permeabile a piccole molecole, il che fa sì che le cellule iniziano a gonfiarsi e rompersi, oltretutto comporta anche effetti secondari come reazioni di ossidazione e riduzione all'interno della struttura cellulare che interrompono i processi metabolici e cambiamenti strutturali (Barba et al., 2015).

Utilizzato per rendere sicuri e stabili con il vantaggio di mantenere o modificare in minima parte le caratteristiche sensoriali, nutrizionali e salutistiche di prodotti come latte, latticini e alimenti ortofruitticoli, è stata dimostrata un'efficace inattivazione per la maggior parte dei microrganismi deterioranti e patogeni, ma rispetto al trattamento di tessuti vegetali o animali l'intensità del trattamento deve essere molto più elevata (Jaeger et al., 2009).

Le cellule microbiche che sono fra le 100 e le 10 volte più piccole rispetto a quelle vegetali, necessitano di campi elettrici molto maggiori, da 20 fino a 80 kV/cm.

In generale l'efficienza dell'inattivazione microbica da parte della PEF è determinata da tre fattori, i parametri di trattamento, (temperatura, energia del campo applicato, forma dell'impulso, tempo di trattamento, etc.) i parametri del prodotto (pH del mezzo, attività dell'acqua (AW), composizione etc.) e le caratteristiche dei microrganismi (specie, ceppo, condizioni di recupero etc.).

Di questi fattori, solo i parametri di trattamento possono essere modulati nelle camere di trattamento, mentre per gli altri fattori vengano fatte considerazioni a parte (Haung et al., 2009).

Per esempio, a seconda del tipo di microrganismo, avremo una diversa tolleranza del trattamento. Tra i batteri, i gram-positivi sono più resistenti alla PEF rispetto ai gram-negativi e in generale, i lieviti sono più sensibili ai campi elettrici rispetto ai batteri.

Diversi studi indicano inoltre, che i microrganismi nella fase esponenziale di crescita sono più sensibili alla PEF di quelli nella fase stazionaria.

Questa maggiore sensibilità microbica potrebbe essere correlata alla maggiore dimensione delle cellule in fase esponenziale o alla manifestazione di un fattore sigma alternativo quando i microrganismi entrano nella fase stazionaria determinando l'espressione di un numero di geni che conferiscono resistenza allo stress, cambiamenti strutturali e morfologici (Raso et al., 2016).

Un aspetto fondamentale che riguarda le caratteristiche del prodotto è rappresentato dalla conduttività degli alimenti; gli alimenti con conduttività elettriche elevate generano campi elettrici meno intensi attraverso la camera di trattamento e quindi non sono adatti per il trattamento con PEF.

2.6.1.1 Inattivazione microbica nel latte

Uno studio di Barba et al., (2015) riporta un esempio di una possibile applicazione di campi elettrici pulsati nel latte intero.

Nel latte intero l'inattivazione microbica è stata indotta dal trattamento PEF in combinazione con preriscaldamento controllato (55 ° C per 24 s) e raffreddamento intermedio graduale. I trattamenti con PEF a 22–28 kV/cm, impulso di 20 µs a 10–60 Hz, per 17–101 µs, hanno portato a una riduzione del ciclo di 5–6 logaritmi di *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* etc, a livelli inferiori al limite di rilevamento.

Questi livelli di inattivazione microbica erano simili a quelli raggiunti con la pastorizzazione termica (63 ° C per 30 min. o 73 ° C per 15 s).

Nella tabella (2-2) possiamo vedere alcuni valori di riferimento per diverse matrici e alimentari e M.O (Barba et al., 2015).

Microrganismo	Cibo fluido	E (kV / cm)	n	τ (µ s)	t (µ s)	Tipo di impulso	f (Hz)	T max. (° C)	Log₁₀ riduzione
<i>Bacillus cereus</i>	Latte scremato	31	20	2.0	16,6	Bipolar e/quadrat	-	-	1.3
<i>Escherichia Coli</i>	Latte intero	30	300	2.0	600	-/Quadrat	200	35	5.0
<i>Enterobactersaka zakii</i>	Latte artificiale per lattanti	40	144	2.5	360	-	-	40	1.2

Tabella 2-2: Riepilogo delle condizioni di lavorazione utilizzate per l'inattivazione di microrganismi negli alimenti fluidi mediante trattamento a campo elettrico pulsato (PEF). Qui n è il numero di impulsi, τ, è l'ampiezza dell'impulso e, t, è il tempo totale di trattamento (Barba et al., 2015).

Inoltre, il PEF non ha alcun impatto sulle proteine del siero di latte e sul pH del latte ed evita gli effetti sgradevoli ottenuti con i trattamenti termici come danni alle proprietà di scrematura, imbrunimento non enzimatico, la degradazione del lattosio, denaturazione delle proteine del siero. Tuttavia, può influenzare la viscosità e la dimensione delle particelle quando il latte viene trattato con intensità di campo elevate (Nowosad et al., 2020).

2.6.1.2 Inattivazione microbica nei succhi

I campi elettrici pulsati vengono applicati anche per l'inattivazione batterica nei succhi. Utilizzata come tecnologia per la conservazione, il potenziale del PEF viene valutato dalla sua capacità di ridurre la carica microbica di 100.000 volte (unità di 5 log) come richiesto dal regolamento FDA (FDA, 2001). Lo "standard di riduzione di 5 log" è stato stabilito sulla base delle raccomandazioni del Comitato consultivo nazionale sui criteri microbiologici per gli alimenti, dopo aver riscontrato numerosi focolai microbiologici di agenti patogeni nel succo (Barba et al., 2015).

McDonald, (2000) ha dimostrato gli effetti del PEF (100 L/h) nel succo d'arancia applicando un'intensità di campo elettrico di 30 e 50 kV/cm, per 1 o 2 μ s, a 50 e 55 °C (temperatura in uscita). In queste condizioni, *Leuconostoc mesenteroides*, *E. coli* e *L. innocua* sono stati inattivati fino a cicli di 5 log.

Oltre alla riduzione della carica microbica è stata valutata la qualità del succo post trattamento PEF, e non sono stati trovati cambiamenti apparenti nelle proprietà fisiche o chimiche causate dall'esposizione a campi elettrici.

Rispetto ai campioni trattati termicamente, è possibile osservare una maggiore quantità di vitamina C trattenuta, e una perdita del 5–9% di composti aromatici rispetto a una perdita fino al 25% dopo un trattamento termico. In uno studio sull'impatto della PEF su quattro varietà di succhi di agrumi, non è stata trovata alcuna differenza reale per ° Brix, pH, conducibilità, viscosità, indice di imbrunimento non enzimatico e formazione di idrossimetilfurfurolo dopo un trattamento a 28 kV/cm e 50 impulsi (Jaeger et al., 2009).

L'unica problematica associata ai trattamenti con campi elettrici pulsati è rappresentata dal costo elevato di capitali, infatti come dimostrano recenti studi è stato stimato il costo della pastorizzazione del succo d'arancia con PEF. Il costo totale della pastorizzazione è stato stimato in 0,037 \$/L di succo, di cui i costi di capitale rappresentavano il 54% (0,02 \$/L), i costi del lavoro rappresentavano il 35% (0,013 \$/L) e le spese per le utenze, principalmente elettricità, rappresentavano il 11% (0,004 \$/L). L'elevato costo del capitale ha portato ad un costo totale del 147% (0,022 \$/L) superiore a quello ottenuto per i trattamenti termici convenzionali (0,015 \$/L) (Barba et al., 2015).

2.6.2 *Inattivazione delle spore*

L'elaborazione del PEF sembra non avere alcun effetto sulle endospore, sebbene alcune pubblicazioni descrivano un certo livello di inattivazione delle spore raggiunto, se vengono applicate delle condizioni estreme necessarie. Le spore presentano una maggiore resistenza alla PEF rispetto alle cellule vegetative a causa delle loro piccole dimensioni, bassa permeabilità, disidratazione e mineralizzazione. Pertanto, attualmente, il trattamento PEF può essere applicato solo per la pastorizzazione ma non per scopi di sterilizzazione (Nowosad et al., 2020).

2.6.3 *Inattivazione enzimatica*

È probabile che l'inattivazione enzimatica dopo il trattamento con PEF sia correlata ad effetti secondari come distribuzioni locali della temperatura, reazioni elettrochimiche o formazione di radicali liberi invece che effetti primari del campo elettrico. A meno che non si utilizzino gli effetti termici, la maggiore resistività degli enzimi potrebbe essere una restrizione per la conservazione del cibo liquido mediante PEF poiché la riduzione dell'attività enzimatica è spesso fondamentale nella lavorazione e conservazione degli alimenti (Jaeger et al., 2009).

2.6.4 *Estrazione composti bioattivi*

L'estrazione è uno dei processi più comunemente utilizzati nell'industria per ottenere composti preziosi, di solito comporta il trattamento chimico, enzimatico, termico o le classiche tecniche di disintegrazioni convenzionali come la macinazione o la pressatura.

Queste sono alcune delle molte operazioni applicate nell'industria alimentare per la distruzione meccanica del materiale cellulare prima del recupero dei composti intracellulari o dell'estrazione di succo e/o olio (Nowosad et al., 2020).

L'obiettivo principale delle suddette tecniche è la permeabilizzazione di una membrana cellulare per promuovere l'estrazione di componenti intracellulari e/o l'accessibilità ai liquidi. Tuttavia, queste tecniche possono distruggere i tessuti e possono deteriorare le proprietà tessiturali di un prodotto provocando la perdita di componenti nutrizionalmente e tecnologicamente preziosi, e di fatto, limitando il potenziale del prodotto per l'ulteriore utilizzo della materia prima.

La permeabilizzazione della membrana cellulare indotta da PEF viene utilizzata per aumentare la permeabilità della membrana cellulare e, migliorare il trasporto di massa fuori dalle cellule.

Numerosi studi riportano che l'applicazione del campo elettrico pulsato per l'estrazione può migliorarne l'efficienza, ridurre il tempo di estrazione e minimizzare qualsiasi danno ai nutrienti estratti.

La distruzione delle cellule può essere ottenuta applicando PEF di diversa intensità attraverso il mezzo cellulare o il tessuto vegetale. Le cellule più grandi richiedono intensità di campo elettrico inferiori per ottenere una distruzione cellulare sufficiente, mentre le cellule più piccole richiedono intensità di trattamento molto più elevate per lo stesso grado di permeabilizzazione della membrana cellulare. Il principale utilizzo della tecnologia PEF riguarda la produzione di succhi di frutta e verdura, non solo come un metodo di conservazione ma soprattutto come pretrattamento di materia prima per aumentare la permeabilità delle cellule migliorando estrazione del succo e estrazione di componenti intracellulari.

Uno studio con l'obiettivo di migliorare l'estrazione solido-liquido del succo dalla purea di mele ha mostrato un aumento significativo della resa totale del succo dopo il trattamento intermedio con PEF (tra due pressature).

Sebbene l'efficacia di un processo relativo alla resa in succo variasse leggermente nei rapporti, è stato per lo più concordato che non è stato raggiunto alcun cambiamento apparente nel valore del pH, negli zuccheri totali e nell'acidità totale. Inoltre, il contenuto di molti composti nutrizionalmente preziosi è stato mantenuto o addirittura migliorato.

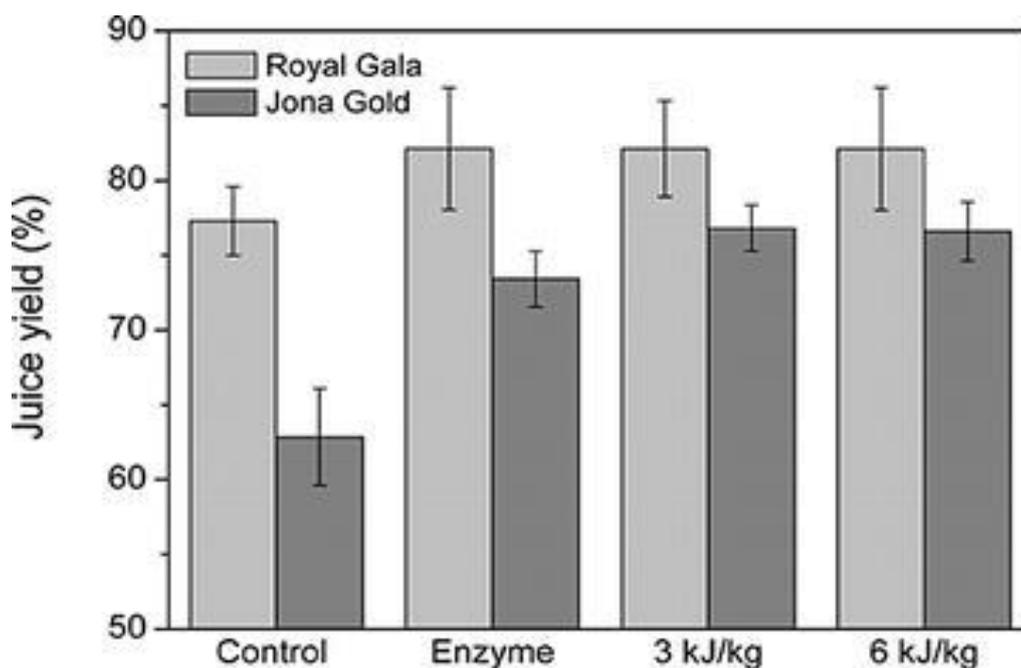


Figura 2-10: Resa in succo ottenuta in pressa per balle da due varietà di mele dopo il trattamento PEF a 2 kV/cm e diverso apporto energetico specifico rispetto al trattamento enzimatico e al campione non trattato (Jaeger et al., 2009).

Migliorare la diffusione di sostanze solubili attraverso la membrana per ottenere sostanze bioattive come diverse macromolecole, aromi, pigmenti e altri metaboliti cellulari è di notevole interesse non solo per l'industria alimentare ma anche nella produzione cosmetica o anche nella biotecnologia.

2.6.5 Essiccazione

L'essiccazione è uno dei metodi più antichi utilizzati per rimuovere acqua dagli alimenti favorendone la migliore conservabilità. Oggigiorno le industrie alimentari utilizzano principalmente trattamenti ad alta temperatura (disidratazione termica e/o essiccazione a caldo) per produrre alimenti disidratati.

I metodi di disidratazione convenzionali influenzano lo stato fisico e biochimico degli alimenti, contribuendo a modificare il colore, la consistenza e il gusto dei prodotti trattati termicamente, e provocando anche la perdita di componenti sensibili al calore (Jaeger et al., 2009).

Il pretrattamento del campione con PEF per distruggere la struttura cellulare riduce la sua resistenza alla diffusione e aumenta la velocità di trasferimento di massa e calore tra le cellule e l'ambiente circostante, permettendo una temperatura di trattamento più bassa.

Sono state condotte ricerche sull'impatto del trattamento iniziale con PEF sulla cinetica di essiccazione, nonché sui cambiamenti di colore e consistenza nella pastinaca e nella carota affettate.

Il tempo di essiccazione è stato ridotto al 28% a 70 ° C e al 21% a 60 ° C rispetto ai campioni non trattati. In più è stato osservato che il tempo di essiccazione dei campioni di carota trattati con PEF è stato ridotto fino all'8,2%, il coefficiente di diffusione dell'acqua è aumentato fino al 16,7% e i campioni dopo l'essiccazione hanno mostrato maggiore leggerezza e arrossamento rispetto al tessuto intatto. In un altro studio sull'effetto di un pretrattamento con PEF sull'essiccazione delle cipolle condotte da Ostermeier (2018), si è osservato che un aumento dell'intensità del campo elettrico fino a 1,07 kV/cm ha causato un aumento della disintegrazione cellulare che ha facilitato il rilascio di umidità sulla superficie del prodotto. La maggiore diffusione ha portato a una riduzione del 30% del tempo di essiccazione per i campioni di cipolla pretrattati con PEF essiccati a 45 ° C (Nowosad et al., 2020).

2.6.6 Congelamento

Uno dei principali svantaggi della conservazione tramite congelamento è la formazione di cristalli di ghiaccio, che possono distruggere il tessuto in modo che, dopo lo scongelamento, i prodotti perdano di principi nutritivi e caratteristiche organolettiche.

È stato dimostrato che i campi elettrici pulsati possono essere utilizzati per migliorare la tolleranza al congelamento delle foglie di spinaci. Il PEF è stato applicato con impregnazione sottovuoto in presenza di crioprotettori come trealosio, saccarosio, glucosio e fruttosio. La combinazione di questi metodi ha fatto sì che le cellule fogliari rimanessero vitali e le foglie conservassero il turgore dopo il ciclo di congelamento e scongelamento.

Inoltre, l'utilizzo della tecnologia PEF come pretrattamento prima del congelamento influisce sul tempo e sulla velocità di congelamento. In una ricerca sull'influenza della PEF sul congelamento e lo scongelamento del tessuto di mela, hanno osservato che il tempo di congelamento totale e il tempo di scongelamento totale erano ridotti, rispettivamente, del 3,5-17,2% e del 71,5%.

Abbreviando il tempo di congelamento, è stata anche favorita un maggiore nucleazione e propagazione del ghiaccio, aumentando le qualità organolettiche dei prodotti trattati (Nowosad et al., 2020).

2.6.7 Valorizzazione dei rifiuti nell'industria alimentare

L'industria alimentare genera enormi quantità di sottoprodotti e rifiuti, che sono problematici perché il loro smaltimento è associato a problemi ambientali e sanitari. Per risolvere questo problema, cresce l'interesse per lo sviluppo di procedure pratiche che possano ridurre i problemi di smaltimento dei rifiuti e allo stesso tempo aumentare le risorse limitate. In questa linea, l'applicazione di diversi metodi assistiti da PEF può costituire una promettente alternativa per recuperare composti ad alto valore aggiunto da sottoprodotti e scarti alimentari, che possono essere utilizzati per diversi scopi (es. Additivi alimentari e/o nutraceutici) (Barba et al., 2015).

Ad esempio, la barbabietola rossa è una delle principali fonti di betanine, coloranti naturali utilizzati per aumentare il rossore di diversi prodotti alimentari. Le betanine vengono solitamente recuperate attraverso l'estrazione acquosa, estrazione solido-liquido o tramite frammentazione meccanica. Tuttavia, questi processi possono influenzare la stabilità del colore delle betanine, che sono sensibili a pH, temperatura, luce e ossigeno. Al contrario, l'uso del PEF consente un alto grado di permeabilizzazione cellulare con stress termici minimi, che migliorano il rilascio del 90% della colorazione rossa (Donsi et al., 2010).

In un altro studio condotto sulla valorizzazione degli scarti di pomodoro, si è riscontrato un aumento della resa di estrazione del carotenoide fino al 56,4%. Anche l'estrazione del licopene è aumentata (da 9,84 mg di licopene/100 g a 14,31 mg/100 g di residuo di pomodoro) per un trattamento PEF a 1,0 kV/cm per 7,5 ms (Nowosad et al., 2020).

Nella tabella (2-3) sono riassunte diverse applicazioni proposte da Donsi et al., (2010) per l'estrazione assistita da PEF.

Tessuto	Composto estratto	E (kV / cm)	Energia (kJ / k)	Metodo di estrazione	Principali effetti del trattamento con PEF
<i>Mela</i>	Sostanze solubili	<1	10–70	T Acqua: 20–75 ° C Forte eccesso	Significativo aumento del coefficiente di diffusione
<i>Carota</i>	Sostanze solubili	0.67	-	T Acqua: 18–35 ° C L: S = 3 Centrifuga	Resa massima ottenuta con il preriscaldamento del tessuto a 50 ° C e con un leggero trattamento PEF (300 V / cm – 30 impulsi)
<i>Colza</i>	Olio	5–7	42–84	T Acqua: 20, 60–90 ° C. L: S = 2	Leggero aumento del recupero dell'olio, ma aumento degli ingredienti alimentari funzionali
<i>Finocchio</i>	Antiossidanti	0.6	5-40	Camera esano T L: S = 20	Aumento della resa dal 60 al 98% per i grigliati grossolani

Tabella 2-3: Proposte di diverse applicazioni per l'estrazione assistita da PEF e il recupero di composti preziosi.

2.6.8 Principali vantaggi del trattamento PEF

I principali vantaggi della lavorazione assistita da PEF rispetto a quelli convenzionali sono:

- aumento del trasferimento di massa;
- resa di estrazione migliorata;
- diminuzione del tempo di elaborazione;
- diminuzione dell'intensità dei parametri di estrazione convenzionali (es. temperatura di estrazione, concentrazione del solvente);
- riduzione della degradazione dei composti termosensibili (es. aromi, proteine);
- facilitazione dell'estratto purificato (cioè riduzione della macinazione);
- riduzione dei costi energetici e dell'impatto ambientale.

CAPITOLO 3

“INFLUENZA PEF SULLA COMPONENTE LIPIDICA DI ALIMENTI”

3.1 Lipidi

Il termine lipide è utilizzato nel senso più ampio del termine per descrivere composti biologici solubili in solventi organici come cloroformio, benzene, etere e alcool e insolubili in acqua. Essi comprendono un vasto gruppo di biomolecole, come acidi grassi e loro derivati, carotenoidi, terpeni, steroidi, etc.; con le proteine ed i carboidrati costituiscono la frazione nutrizionale prevalente degli alimenti.

Le principali funzioni sono:

- energetica, permettendo la costituzione di riserve in poco volume (9 Kcal di energia lorda/g);
- plastica, sono componenti fondamentali delle membrane cellulari in tutti i tessuti;
- di isolamento termico per il mantenimento della temperatura corporea;
- di protezione e sostegno delle strutture anatomiche;
- veicolante vitamine e altre sostanze liposolubili;
- di appetibilità degli alimenti;

I grassi e gli oli sono le principali forme di riserva di energia in molti organismi, mentre i fosfolipidi e gli steroli, gli elementi strutturali e principali delle membrane biologiche.

I grassi e gli oli sono composti derivati degli acidi grassi.

Gli acidi grassi sono acidi carbossilici con una catena idrocarburica contenente da 4 a 36 atomi di carbonio, si distinguono in saturi, quando la catena non contiene doppi legami e non è ramificata, mentre sono definiti mono o polinsaturi quando sono presenti uno o più doppi legami. Gli acidi grassi più comuni sono quelli a catena non ramificata con numero di atomi di carboni compresi tra 12 e 24.

I doppi legami di quasi tutti gli acidi grassi presenti in natura sono nella configurazione cis. Gli acidi grassi trans sono prodotti dalla fermentazione nel rumine di animali da latte e sono ottenuti dai prodotti del latte e della carne.

La classe più comune di lipidi in natura è composta da acidi grassi uniti mediante legami esteri a gruppi idrossilici del glicerolo. Tuttavia, vi sono lipidi che possono contenere diversi composti chimici che determinano la loro insolubilità in acqua e la solubilità in solventi organici (Nelson et al., 2014).

3.1.1 *Lipidi negli alimenti*

I lipidi contribuiscono in maniera decisiva all'accettabilità sensoriale di un prodotto, donano infatti aroma, sapore e morbidezza. Da un punto di vista nutrizionale sono non solo una fonte energetica rilevante, ma anche il veicolo di micronutrienti essenziali come le vitamine liposolubili e gli acidi grassi polinsaturi a lunga catena.

Negli alimenti, il grasso si trova quasi esclusivamente sotto forma di trigliceridi o triacilgliceroli (> 95%). I trigliceridi sono costituiti da tre molecole di acidi grassi che sono esterificati con il gruppo idrossile (-OH) di una molecola di glicerolo.

Spesso i trigliceridi sono identificati come "grasso" e "oli" di origine animale o vegetale. Altri lipidi alimentari sono quelli complessi (glicerofosfolipidi e sfingolipidi), molecole con funzione strutturale, in quanto fanno parte delle membrane biologiche e modulano la loro attività. Tuttavia, i lipidi complessi hanno poca importanza quantitativa e qualitativa in termini di apporto alimentare.

3.2 **Ossidazione lipidica**

L'ossidazione dei lipidi è un processo chimico che ha ricevuto molta attenzione a causa del suo contributo alla diminuzione delle qualità sensoriali e nutrizionali degli alimenti. Il colesterolo, gli acidi grassi dei triacilgliceroli, i gliceridi parziali e gli acidi grassi liberi, in particolare gli acidi grassi insaturi, sono vulnerabili all'ossidazione e danno origine inizialmente a idroperossidi instabili (prodotti di ossidazione primaria), che si decompongono in un'ampia gamma di composti carbonilici, come aldeidi, seguite da quantità di chetoni insaturi, idrocarburi saturi e insaturi, semialdeidi e alcoli saturi e insaturi.

La reazione di ossidazione dei grassi è una reazione che avviene in più steps che porta alla formazione nella matrice alimentare di prodotti sgradevoli che rendono inaccettabile la qualità (comunemente conosciuta come "irrancimento").

Questa reazione è, dal punto di vista chimico, un'ossidazione e/o idrolisi di acidi grassi o altri lipidi negli alimenti ad opera di specie reattive dell'ossigeno (ROS) Fig. 3-1.

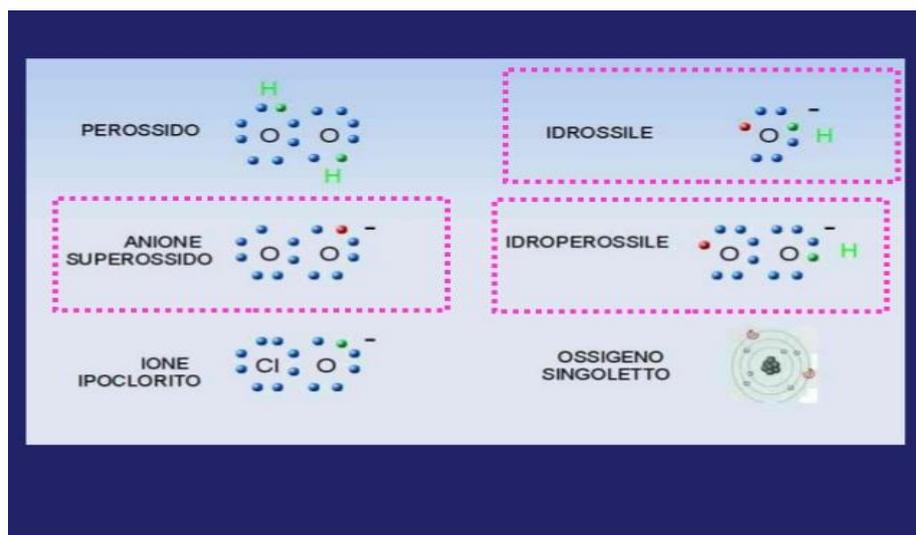


Figura 3-1: ROS e radicali liberi (Pereda et al., 2008).

L'ossidazione porta alla formazione di radicali liberi da acidi grassi e quindi innesca un'ossidazione a catena dei restanti acidi grassi ancora non ossidati, provocando un'autossidazione. Questo processo può dare luogo a molecole molto reattive chimicamente (radicali liberi a loro volta) che possono generare odori e sapori alterati e sgradevoli comunemente associati ad alimenti rancidi.

La reazione può essere favorita da fattori pro-ossidativi come calore, ossigeno, luce, metalli, alcune azioni enzimatiche o alcune modifiche da parte dei microrganismi (Pereda et al., 2008). Questa reazione, il cui iniziatore principale è il radicale idrossilico OH^\bullet , è di tipo auto catalitico, ovvero si autoalimenta e la suscettibilità all'ossidazione aumenta in funzione dell'insaturazione dei grassi.

C'è inoltre da sottolineare che i prodotti secondari della perossidazione lipidica (aldeidi e chetoni) non causano solo odori sgradevoli, ma in molti casi risultano anche tossici e cancerogeni.

Il meccanismo di ossidazione dei lipidi (Fig.3-2) è diviso in 3 fasi:

- Inizio: Formazione dei radicali liberi da acidi grassi insaturi;
- Propagazione: In questa fase i radicali liberi formati (che sono molto reattivi in quanto instabili) tendono a sottrarre elettroni ad altre molecole di acidi grassi per stabilizzarsi. In questo modo però creano nuovi radicali liberi che si comportano allo stesso modo;

- Fine: Quando due molecole radicali si incontrano danno luogo a prodotti non radicalici che quindi smettono di reagire. Questi prodotti molto spesso responsabili degli off-flavour tipici negli alimenti;

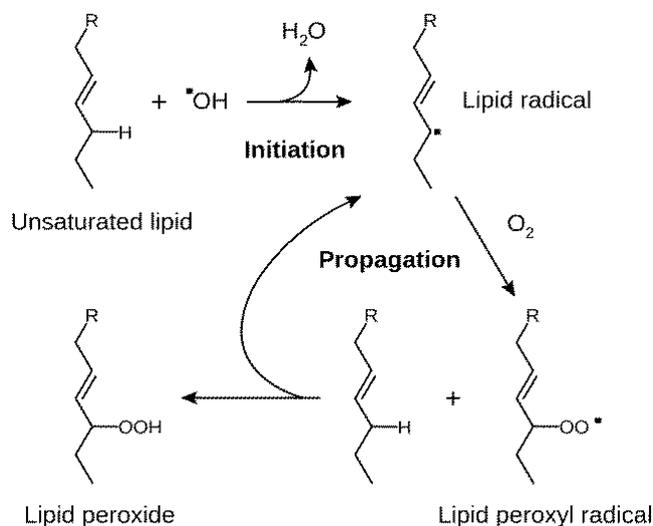


Figura 3-2: Meccanismo ossidazione lipidi (Nelson et al., 2014).

3.2.1 Misura dell'ossidazione lipidica

La misura dell'ossidazione lipidica si basa sull'analisi della MDA (malondialdeide), la principale aldeide che si forma dai processi ossidativi a carico degli acidi grassi polinsaturi, tramite la reazione con il TBA (acido tiobarbiturico). Il principio di questo metodo è la reazione di una molecola di MDA con due molecole di TBA a formare un complesso colorato di rosso che è quantificabile con uno spettrofotometro.

Questo metodo è però stato criticato in quanto aspecifico. Infatti, altre molecole reattive al TBA (dette molecole TBARS), tra cui gli zuccheri ed altre aldeidi, possono interferire con la reazione TBA-MDA. Ad esempio, dei valori anormalmente bassi possono essere rilevati se parte del TBA reagisce con le proteine di un sistema ossidante. In molti casi, comunque, questo test è anche usato per comparare campioni di una stessa matrice a differenti stadi di ossidazione. Negli ultimi anni, per risolvere il problema del test TBA, è stato sviluppato un metodo per la rilevazione della MDA tramite HPLC (Pereda et al., 2008).

3.3 Influenza PEF sulla frazione lipidica di diverse matrici alimentari

I lipidi sono considerati uno dei nutrimenti essenziali, svolgono un ruolo importante sulla funzione fisiologica degli esseri umani. Tuttavia, la qualità dei lipidi è influenzata anche da diversi fattori fisici e chimici come ossigeno, luce, ioni metallici etc. L'ossidazione, la saponificazione e l'irrancidimento sono i principali deterioramenti degli alimenti ad alto contenuto di lipidi, che provocano la perdita di sapore, colore e valore nutritivo e accorciano la durata di conservazione dei prodotti lipidici. Pertanto, i cambiamenti delle proprietà fisico-chimiche dei lipidi in vari processi e condizioni di conservazione sono di grande importanza per lo studio della qualità del cibo e delle sue proprietà di conservazione (Zeng et al., 2010).

Esistono vari studi condotti sull'influenza del trattamento PEF sulla frazione lipidica di diverse matrici alimentari.

3.3.1 *Olio di arachidi*

In una ricerca condotta da Zeng et al., (2010) sull'effetto dei campi elettrici pulsati nell'olio di arachidi, sono stati valutati gli effetti sui vari acidi grassi contenuti nell'alimento.

L'olio di arachidi è stato trattato in un sistema PEF continuo mediante un impulso a onda quadra con durata dell'impulso (τ) di 40 μ s e frequenza dell'impulso (f) di 1008 Hz.

I campioni di olio di arachidi sono stati pompati nella camera di trattamento per ricevere il trattamento PEF a 20 kV cm⁻¹, 30 kV cm⁻¹, 40 kV cm⁻¹ e 50 kV cm⁻¹.

Dopo il trattamento PEF, i campioni trattati sono stati raffreddati spontaneamente a temperatura ambiente, sigillati in bottiglie di vetro e conservati in camera oscura a 40 ° C per 0, 1, 15, 30, 45, 60, 80, 100 giorni.

3.3.1.1 Analisi acidi grassi

Successivamente i vari campioni di olio sono stati esterificati secondo il metodo standard AOAC, il metodo prevedeva l'idrolisi dei lipidi, l'esterificazione metilica degli acidi grassi (AG) con un'estrazione tramite esano, e l'analisi mediante gascromatografia accoppiata ad uno spettrofotometro di massa.

L'identificazione dei componenti è stata ottenuta dai loro indici di ritenzione, determinati con riferimento ad una serie omologa di alcani, e dal confronto dei loro schemi di frammentazione spettrale di massa con quelli memorizzati nella banca dati (libreria Wiley / NBS) e nei dati di letteratura (Zeng et al., 2010).

3.3.1.2 Effetti sulla composizione degli acidi grassi

È stato dimostrato che il contenuto di acidi grassi insaturi è diminuito da 70,3 mg/100 mg nell'olio non trattato, a 68,6 mg/100 mg nell'olio trattato con PEF (50 kV cm⁻¹).

Mentre nei campioni conservati per 100 giorni a 40°C (Fig. 3-3), la composizione e il contenuto di acidi grassi saturi e insaturi in vari campioni di olio di arachidi hanno mostrato una leggera differenza.

Il contenuto di acidi grassi insaturi e saturi del campione non trattato è diminuito rispettivamente di 8,6 mg e 1,7 mg. Per il campione conservato per 100 giorni trattato con PEF, è stato mostrato che durante il periodo di conservazione, il grado di diminuzione degli acidi grassi sia insaturi che saturi è stato inferiore rispetto al campione che non ha subito il trattamento (Zeng et al., 2010).

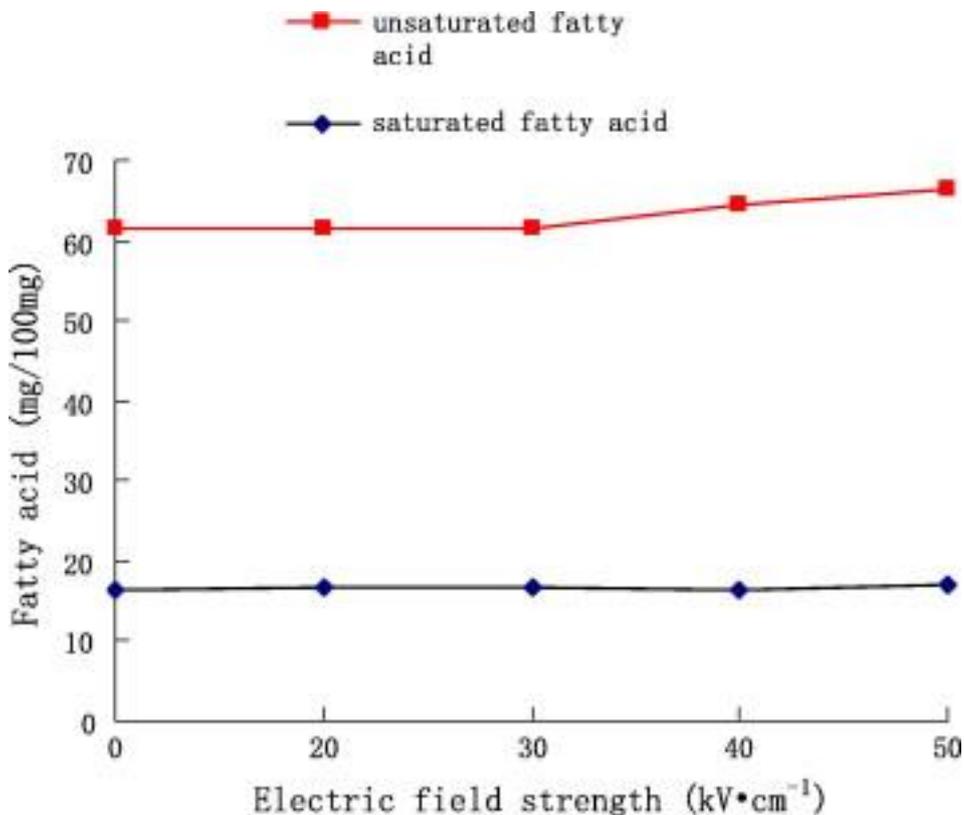


Figura 3-3: Cambiamenti del contenuto di acidi grassi dell'olio di arachidi dopo 100 giorni di conservazione in funzione dell'intensità del campo elettrico (Zeng et al., 2010).

D'altra parte, è stato anche dimostrato che maggiore è l'intensità del PEF applicato, minore è la diminuzione del contenuto di entrambi gli acidi grassi.

Secondo Pereda et., (2008) la degradazione degli acidi grassi è correlata all'ossidazione e all'acidificazione (dovuta alla liberazione di acidi grassi liberi) degli acidi grassi. Pertanto, si può dedurre da questo risultato che il tasso di ossidazione e la velocità di acidificazione degli acidi grassi potrebbero essere frenati dal trattamento con PEF.

La tabella mostra l'influenza dei trattamenti PEF su alcuni acidi grassi presenti nell'olio di arachidi.

Tabella 3-1: Influenza dei trattamenti PEF sulla composizione in acidi grassi dell'olio di arachidi (mg/100 mg) (Zeng et al., 2010).

Acidi Grassi	0 kV	50 kV	0 kV	20 kV	30 kV	40 kV	50 kV
	cm ⁻¹ 40 ° C, 0 d	cm ⁻¹ 40 ° C, 0 d	cm ⁻¹ 40 ° C, 100 d				
<i>C16: 0</i>	10,0 ± 0,5	10,3 ± 0,6	9,1 ± 0,5	9,2 ± 0,5	9,2 ± 0,5	9,6 ± 0,5	9,7 ± 0,6
<i>C18: 0</i>	2,6 ± 0,3	2,8 ± 0,2	2,6 ± 0,2	2,6 ± 0,2	2,5 ± 0,1	2,7 ± 0,2	2,8 ± 0,2
<i>C18: 1</i>	39,5 ± 2,1	38,4 ± 2,0	34,7 ± 2,4	34,7 ± 1,8	34,6 ± 2,0	36,7 ± 1,9	37,7 ± 2,0
<i>C18: 2</i>	30,0 ± 1,5	29,4 ± 1,6	26,1 ± 1,5	26,1 ± 1,9	26,0 ± 1,5	27,0 ± 1,5	27,9 ± 1,5
<i>C20: 0</i>	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,1
<i>C20: 1</i>	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1

3.3.1.3 Effetti del PEF sul valore di perossidi

La variazione del valore di perossidi (PV) dell'olio di arachidi non trattato e dei campioni trattati con PEF è stata mostrata in (Fig.3-4). È stato dimostrato che dopo essere stato trattato con PEF a diverse intensità e analizzato immediatamente il valore del perossido dell'olio di arachidi è stato significativamente aumentato da 4,8 meq kg⁻¹ (non trattato) a 6,2 meq kg⁻¹, 18,4 meq kg⁻¹, 10,1 meq kg⁻¹ e 11,5 meq kg⁻¹ a seconda dell'intensità.

Anche qui si è notato che nel campione conservato per 100, la pendenza della curva di regressione tra PV e tempo di conservazione, che riflette il tasso di ossidazione degli acidi grassi, apparentemente diminuiva con l'aumento del campo elettrico. Quando l'intensità del PEF è stata gradualmente aumentata da non trattata fino a 50 kV cm⁻¹, la pendenza della curva è stata corrispondentemente ridotta, riflettendo che il tasso di ossidazione degli acidi grassi diminuisce con l'aumentare della forza del PEF. I meccanismi dettagliati che si concentrano su questo fenomeno necessitano di ulteriori ricerche più approfondite per una migliore comprensione.

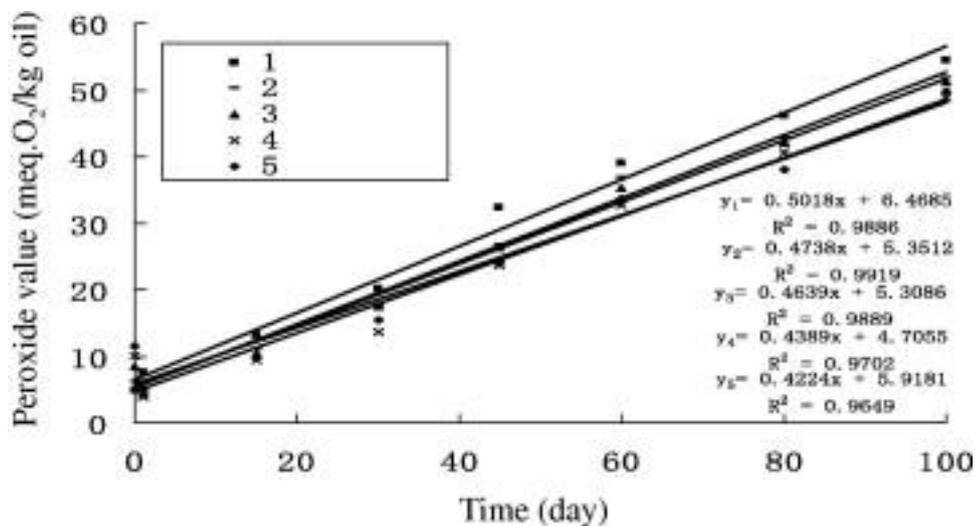


Figura 3-4: Cambiamenti del PV di vari campioni di olio di arachidi trattati con PEF durante il periodo di conservazione: (1) riferimento; (2) 20 kV cm⁻¹; (3) 30 kV cm⁻¹; (4) 40 kV cm⁻¹; (5) 50 kV cm⁻¹ (Zeng et al., 2010).

I risultati hanno rivelato che nonostante un aumento iniziale di ossidazione lipidica probabilmente attribuita alla reazione elettrochimica indotta dal trattamento PEF che ha influenzato i componenti strutturali e funzionali fino al punto di ossidazione e deterioramento dei lipidi, il trattamento con PEF potrebbe frenare la velocità della reazione di ossidazione dei lipidi, estendendo così la durata di conservazione dei prodotti che ne contengono una grande quantità (Zeng et al., 2010).

3.3.2 *Latte di capra*

Il latte di capra è un'alternativa di spicco al latte bovino, in quanto presenta positive caratteristiche dietetiche e nutrizionali, in particolare tra le madri che allattano e i bambini per alleviare l'allergia al latte e altri problemi gastrointestinali. La maggior parte dei produttori di latte artificiale per lattanti utilizza latte di capra in polvere a causa del suo basso effetto allergenico.

Il latte fresco di capra pastorizzato è difficilmente disponibile al supermercato locale. Quindi, c'è un disperato bisogno di un ulteriore progresso della lavorazione del latte di capra per l'industria locale del latte di capra con l'obiettivo finale di produrre latte di capra stabile con effetti minimi sulla sua qualità nutritiva che utilizza una tecnologia di pastorizzazione alternativa. La pastorizzazione è fondamentale per garantire che la carica microbica del latte di capra sia significativamente ridotta, con conseguente prolungamento della sua durata di conservazione. Tuttavia, la tradizionale pastorizzazione a caldo influisce sulle proprietà organolettiche del latte. Pertanto, il trattamento non termico come il campo elettrico pulsato (PEF) ha acquisito maggiore attenzione come sostituto della pastorizzazione termica a causa della crescente domanda di alto valore nutritivo e caratteristiche di freschezza degli alimenti trasformati (Mohamad et al., 2020).

3.3.2.1 *Acidi grassi nel latte di capra*

Il latte di capra crudo è stato trattato a 20, 30, e 40 kV/cm di intensità del campo elettrico (per un tempo di trattamento di 5 e 10 μ s).

In questo studio, è stato analizzato il profilo degli acidi grassi di campioni non trattati e trattati con PEF, inclusi gli acidi grassi a catena corta (SCFA) (C4, C6 e C8), gli acidi grassi a catena media (MCFA) (C10, C12, C14, C15 e C16) e acidi grassi a catena lunga (LCFA) (C18). Questi acidi grassi sono stati classificati in acidi grassi saturi (SFA), acidi grassi

monoinsaturi (MUFA) e acidi grassi polinsaturi (PUFA). I risultati hanno rivelato che Σ SFA mostra la più alta proporzione di acidi grassi nei campioni non trattati che rappresentavano circa il 60,30% della composizione totale di acidi grassi. Successivamente, Σ MUFA e Σ PUFA sono presenti rispettivamente al 34,06% e al 5,65%. Tra questi acidi grassi, l'acido oleico (C18: 1) era l'acido grasso più abbondante nei campioni non trattati, seguito da acido palmitico (C16: 0) e acido stearico (C18: 0). Il contenuto prominente di acido oleico (C18: 1) era in parte correlato al processo di bioidrogenazione nell'acido grasso del latte di capra come l'acido linoleico (Mohamad et al., 2020).

3.3.2.2 Risultati trattamento PEF

Gli acidi grassi sono inclini all'ossidazione e la temperatura è il fattore critico che influenza il tasso di ossidazione dei lipidi. Sebbene il PEF sia considerato un trattamento non termico, la temperatura può aumentare a causa del riscaldamento ohmico. I risultati hanno indicato che il trattamento con PEF ha avuto effetti minori su SCFA e MCFA del latte di capra rispetto a PUFA.

In particolare, il valore Σ PUFA è diminuito significativamente con l'aumento del tempo di trattamento, essendo particolarmente sensibili all'ossidazione.

In conclusione, è stato osservato che il valore Σ SFA e Σ PUFA del latte di capra trattato con PEF ha mostrato una considerevole diminuzione, mentre che la Σ MUFA è aumentato in modo significativo in tutti i campioni di latte di capra trattati con PEF.

Ciò potrebbe essere dovuto alla desaturazione dell'acido stearico in posizione $\Delta 9$ in MUFA, in particolare acido oleico.

Per concludere, questo studio ha dimostrato che nonostante i risultati siano ancora poco chiari, il PEF ha un enorme potenziale per l'utilizzo nel trattamento di pastorizzazione del latte a causa di cambiamenti marginali nelle proprietà fisico-chimiche e organolettiche durante la lavorazione del latte di capra trattato. Tuttavia, si raccomandano ulteriori indagini (Mohamad et al., 2020).

3.3.3 Abalone



Figura 3-5: Abalone (Mineralartgallery et al., 2021).

L'abalone è un genere di mollusco costoso, che non è solo una prelibatezza molto ricercata con un gusto e una consistenza unici, ma ha anche molti benefici per la salute umana.

L'abalone fresco ha una durata di conservazione di 2-3 giorni in frigorifero. Sono comunemente trasformati in forme congelate, refrigerate o confezionate sottovuoto per l'esportazione. Tuttavia, questi metodi di lavorazione possono influire negativamente sulla qualità della carne e, in alcuni casi, comportare costi elevati. Pertanto, le nuove tecnologie per aumentare la durata di conservazione e mantenere la qualità dell'alimento sono sempre più importanti.

Per questa ricerca sono stati selezionati campioni di carne di abalone ($n = 144$) di peso compreso tra 20,0 e 34,0 g. I campioni sono stati quindi divisi in tre gruppi in base al peso: 1) 20,0–22,0 g ($n = 34$); 2) 22,0–28,0 g ($n = 78$); 3) superiore a 28,0 g ($n = 39$) per ulteriori trattamenti (Luo et al., 2019).

3.3.3.1 Risultati trattamento PEF

Successivamente i tre gruppi di campioni divisi in base al peso in ciascuna camera di trattamento batch sono stati immersi in acqua fredda (utilizzata come mezzo di trasmissione elettrica) e quindi sottoposti a tre livelli di trattamento PEF (0,66 kV/cm, 1,38 kV/cm e 2,00

kV/cm) con larghezza di impulso costante di 20 μ s e frequenza di 50 Hz. Anche qui come nei precedenti esempi l'ossidazione dei lipidi è stata valutata utilizzando il test delle sostanze reattive dell'acido 2-tiobarbiturico (TBAR). In seguito, i valori TBAR del muscolo abalone sono stati analizzati utilizzando ANOVA, per confrontare le differenze tra i campioni trattati con PEF e i controlli non trattati.

Non sono state trovate differenze significative tra campioni non trattati e campioni trattati con campi elettrici pulsati. Inoltre, i diversi livelli di applicazione PEF non hanno mostrato differenze significative nei valori TBARS. Teoricamente, il PEF può accelerare l'ossidazione dei lipidi a causa della rottura della membrana cellulare che facilita la migrazione di sostanze ossidanti e acidi grassi insaturi nei tessuti muscolari. Tuttavia, in diversi studi, come quello muscolo del petto di tacchino fresco e congelato trattato, hanno dimostrato minime variazioni nel valore di TBAR. Anche questa ricerca ha confermato che i trattamenti PEF da 0,66 kV/cm, 1,38 kV/cm e 2,00 kV/cm non hanno avuto alcun effetto significativo sul valore TBAR del muscolo abalone. Ciò suggerisce che l'applicazione del PEF potrebbe non causare una rottura della membrana cellulare che può determinare l'accelerazione dell'ossidazione dei lipidi (Luo et al., 2019).

3.3.3.2 Analisi contenuto di acidi grassi

La carne di abalone contiene una concentrazione di AG (acidi grassi) relativamente bassa e ciò può derivare dalla piccola quantità di lipidi compresa tra lo 0,2 e il 2,5% nei tessuti muscolari. Diversi studi hanno dimostrato che i principali AG nel muscolo abalone erano C 16: 0, C 18: 0, C 18: 1 n-7, C 18: 1 n-9, C 20: 4 n-6 (ARA), C 20: 5 n-3 (EPA) e C 22: 5 n-3 (DPA) acidi grassi.

La composizione di SFA, MUFA e PUFA è stata segnalata intorno al 40%, 20% e 40%, rispettivamente. Nel presente studio, sono stati identificati 17 (AG). I principali AG erano acidi grassi C 12: 0, C 16: 0 e C 18: 0 che erano presenti a 88,17 mg / 100 g, 127,52 mg / 100 g 72,26 mg / 100 g nel controllo non trattato con PEF senza trattamenti termici. I principali MUFA e PUFA erano C 18: 1 n-9 e C 20: 2 n-6 acidi grassi con le quantità di 24,48 mg / 100 g 26,81 mg / 100 g rispettivamente.

Confrontando il contenuto di AG in campioni di abalone con e senza trattamenti PEF sono stati descritti i seguenti risultati.

Lo studio ha mostrato che il trattamento con PEF ha avuto un effetto marginale significativo su C16: 0 ($F(7,88) = 9,508$; $p = 0,02$), C18: 1n-9 ($F(7,88) = 4,682$; $p = 0,03$), C20: 0 (F

(7,88) = 4.422; $p = 0,04$) e MUFA ($F(7,88) = 4.088$; $p = 0,05$) contenuto. Ciò suggerisce che l'applicazione del PEF ha provocato pochi danni alle cellule muscolari. La piccola quantità di lipidi nel muscolo abalone può anche essere responsabile di cambiamenti insignificanti nel contenuto di AG (Luo et al., 2019).

CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha discusso le applicazioni attuali e potenziali dei campi elettrici pulsati nell'industria alimentare. Con il crescente interesse dei consumatori per i prodotti freschi e ad alto valore nutritivo unitamente alla crescente domanda di alimenti prodotti con l'uso di metodi ecocompatibili, il PEF potrebbe risultare un'ottima alternativa sia per l'ottimizzazione del processo produttivo che per il miglioramento della qualità alimentare.

In particolare, l'effetto del PEF, sulla frazione lipidica degli alimenti ha mostrato risultati positivi (lieve danneggiamento dei MUFA e PUFA), ma non concordanti e ancora poco chiari, che necessitano di ulteriori approfondimenti per una maggiore comprensione.

Nonostante le numerose applicazioni su diverse matrici, la maggior parte dei risultati ottenuti si riferisce ancora ad esperimenti condotti su scala di laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

Barba J.F., Parniakov O., Pereira A.S., Wiktor A., Nabil G., Bousseta N., Saraiva A.J., Raso J., Martin-Belloso O., Witrowa-Raichert D., Lebovka N., Vorobiev E.,
Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry. Food Research International. 77, 4 ,773-798. 2015

Basso Pinton M., Dos Santos B.A., Lorenzo J.M., Cichoski A.J., Pagnossim Boeira C., Bastianello Campagnol P.C.,
Green technologies as a strategy to reduce NaCl and phosphate in meat products: an overview. Food Science. 40, 1-5. 2021

Coban M., Fidan M.,
High Voltage Pulse Generator for Pulsed Electric Field Treatments. 3rd International Symposium on Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies (ISMSIT). 2019

Donsì F., Ferrari G., Pataro G.,
Applications of Pulsed Electric Field Treatments for the Enhancement of Mass Transfer from Vegetable Tissue. Food Engineering Reviews. 2, 109-130. 2010

Eldevan S., Silva E., Roohinejad S., Koubaa M., Barba F.J., Rezek A., Tomislava J., Vukušić M., Santos Rui D., Queirós J.A., Saraiva A.,
Effect of Pulsed Electric Fields on Food Constituents. Handbook of Elettroporation. 2115-2133. 2017

Huang K., Wang J.,
Designs of pulsed electric fields treatment chambers for liquid foods pasteurization process: A review. Journal of Food Engineering. 95, 2, 227-239. 2009

Jaeger H., Balasa A., Knorr D.,

Food Industry Applications for Pulsed Electric Fields. In: Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials. Food Engineering Serie. 2009

Kalamiza M., Vorobiev S. Miklavčič D.,

Electroporation in food processing and biorefinery. J Membrane Biol. 247, 1279–1304. 2014

Kotnik T., Kramar P., Pucihar G., Miklavcic D., Tarek M.,

“Cell membrane electroporation- part 1: The Phenomenon,” IEEE Electrical Insulation Magazine. 28, 5, 14-23. 2012

Koubaa M., Houcine M., Vorobiev E.,

Seed oil polyphenols: Rapid and sensitive extraction method and high resolution–mass spectrometry identification. Analytical Biochemistry. 476, 91-93. 2015

Luo Q., Hamid N., Oey I., Ying Leong S., Kantono K., Alfaro A., Lu J.,

*Physicochemical changes in New Zealand abalone (*Haliotis iris*) with pulsed electric field (PEF) processing and heat treatments. LWT, 115, 2019*

Min.,S Evrendilek G. A., Zhang H. Q.,

Pulsed Electric Fields: Processing System, Microbial and Enzyme Inhibition, and Shelf-Life Extension of Foods. IEEE Transactions on Plasma Science. 35, 1, 59-73. 2007

Mineralartgallery.com/haliotis-iris-nuova-zelanda.

Mohamad A., Nadiah N., Shah A. K., Sulaiman A., Mohd N., Rana A., Aadil M.,

Impact of the pulsed electric field on physicochemical properties, fatty acid profiling, and metal migration of goat milk. Food Processing Preservation. 2020

Morales-de la Peña M., Salvia-Trujillo L., Rojas Graü M.A., Belloso M.,

Impact of high intensity pulsed electric fields or heat treatments on the fatty acid and mineral profiles of a fruit juice–soymilk beverage during storage. Food Control. 22 (12), 1975-1983. 2011

Nelson L., Cox M.M.,

Introduzione alla biochimica di Lehninger. 5, 153-162. 2014

Nowosad K., Sujka M., Pankiewicz U., Kowalski R.,
The application of PEF technology in food processing and human nutrition. Journal of Food Science and Technology. 58, 397–411. 2020

Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B., Trujillo, A.J.,
Effects of ultra-high-pressure homogenization treatment on the lipolysis and lipid oxidation of milk during refrigerated storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56, 16, 7125-7130. 2008

Raso J., Frey W., Ferrari G., Pataro G., Knorr D., Tessie J., Miklavčič D., *Recommendation's guidelines on the key information to be reported in studies of application of PEF technology in food and biotechnological processes*, Innovative Food Science & Emerging Technologies. 37 ,312-321. 2016

Ricci A., Parpinello G., Versari A.,
Recent Advances and Applications of Pulsed Electric Fields (PEF) to Improve Polyphenol Extraction and Color Release during Red Winemaking. Department of Agricultural and Food Sciences. Alma Mater Studiorum- University of Bologna. 2018

Sitzmann W., Vorobiev E., Lebovka Nikolai
Applications of electricity and specifically pulsed electric fields in food processing: Historical backgrounds. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 37, 302-311. 2016

Zeng X., Han Z., Hong-ZI Z.,
Effects of pulsed electric field treatments on quality of peanut oil. Food Control. 21, 5, 611-614. 2010