



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



Ministero dell'Università
e della Ricerca



PON
RICERCA
E INNOVAZIONE

REACT EU



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Corso di Dottorato in Sistemi Agro-alimentari e Forestali Mediterranei

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali

Settore Scientifico disciplinare AGR/15

EFFETTI DEGLI ULTRASUONI SULLE CARATTERISTICHE DI QUALITÀ' DELLA MELA DI IV GAMMA

La dottoranda:

CATERINA LI CITRA

Il coordinatore:

PROF. VINCENZO BAGARELLO

Il tutor:

PROF. LUCIANO CINQUANTA

Il co-tutor:

PROF. PELLEGRINO CONTE

CICLO XXXVII
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO: 2025



"Sator Arepo Tenet Opera Rotas"

Anonimo

Indice	3
Abstract	4
1. Introduzione	5
1.1 Definizione giuridica e normativa	6
1.2 Processo produttivo	7
1.3 Attributi di qualità e cause di decadimento	10
1.4 Soluzioni tradizionali e innovative per il mantenimento degli attributi di qualità	15
1.4.1 Dipping	15
1.4.2 Ultrasuoni	16
2 Obiettivi del progetto di ricerca	21
3 Esperimento i: effetti degli ultrasuoni e del dipping sugli attributi di qualità di <i>cripps pink cv. di iv gamma</i>	22
3.1 Materiali e metodi	22
3.1.1 Preparazione dei campioni	22
3.1.2 Design sperimentale	23
3.1.3 Determinazione dell'indice di imbrunimento	24
3.1.4 Determinazione della resistenza alla compressione	24
3.1.5 Estrazione della polifenolossidasi e determinazione dell'attività	24
3.1.6 Determinazione del contenuto in acido ascorbico	25
3.1.7 Determinazione della conta microbica totale	25
3.1.8 Analisi statistica	25
3.2 Risultati	26
3.2.1 Indice di imbrunimento	26
3.2.2 Attività della polifenolossidasi	33
3.2.3 Resistenza alla compressione	40
3.2.4 Contenuto di acido ascorbico	47
3.2.5 Conta microbica totale	54
3.3 Conclusioni	60
4 Esperimento ii: effetti degli ultrasuoni e del dipping sulle caratteristiche di qualità di <i>Granny Smith cv di IV gamma</i>	61
4.1 Materiali e metodi	61
4.1.1 Preparazione dei campioni	61
4.1.2 Design sperimentale	62
4.1.3 Determinazione dell'indice di imbrunimento	63
4.1.4 Determinazione della resistenza alla compressione	64
4.1.5 Analisi statistica	64
4.2 Risultati	65
4.2.1 Indice di imbrunimento dopo 14 giorni di conservazione	65
4.2.1.1 Analisi fattoriale a due vie	67
4.2.1.2 Analisi fattoriale a tre vie	68
4.2.1.3 Analisi fattoriale a quattro vie	74
4.2.2 Resistenza alla compressione dopo 14 giorni di conservazione	76
5 Conclusioni	80
RINGRAZIAMENTI	82
BIBLIOGRAFIA	83

ABSTRACT

Il cambiamento dello stile di vita negli ultimi anni e la maggiore attenzione del consumatore verso una dieta sana, ricca di fibre, vitamine e antiossidanti spinge la ricerca a indagare tecnologie sicure, a basso impatto ambientale che garantiscano la sicurezza alimentare e la qualità di frutta e verdura. L'applicazione degli ultrasuoni è una potenziale tecnologia nella conservazione. L'attività di ricerca ha puntato ad approfondire l'impatto degli ultrasuoni da soli o in combinazione con metodi classici di immersione (soluzione di acido ascorbico e cloruro di calcio) sulle principali caratteristiche di qualità delle mele di IV gamma. Sono stati misurati gli effetti sulle mele post-trattamento e dopo 14 giorni di conservazione su colore, texture, contenuto di vitamina C, attività enzimatica e microbica. Gli ultrasuoni in combinazione possono essere un metodo efficace per inattivare i microrganismi (10^2 UFC/g), disattivare gli enzimi responsabili dell'imbrunimento superficiale mantenendo così invariato il colore nel tempo, e restituendo un livello accettabile di consistenza del frutto. Il trattamento combinato, tuttavia, ha mostrato una perdita di Vitamina C, in fase di esecuzione del processo, che richiede ulteriori approfondimenti. È stato, inoltre, approfondito il meccanismo di funzionamento e le relazioni tra i parametri di processo grazie a un'ANOVA fattoriale a due e più vie. È stato misurato l'impatto della potenza, della temperatura, dei tempi di esposizione e dei singoli additivi. I risultati hanno mostrato che mele trattate a 400 w, per 10 o 5 minuti, a una temperatura di 25° C e in presenza di acido ascorbico e cloruro di calcio restituiscono mele con il minore indice di imbrunimento dopo 14 giorni di stoccaggio. Mentre un processo più blando, a 200 W e 5 minuti è più favorevole per il mantenimento della consistenza.

1. INTRODUZIONE

La produzione industriale di prodotti minimamente processati, freschi e pronti al consumo inizia negli Stati Uniti negli anni '60, in concomitanza con la ripresa economica. Dopo un primo tentativo infruttuoso negli anni '70, questi prodotti fanno la loro comparsa e si impongono anche sul mercato europeo. Prima in Francia (Colelli & Elia, 2009), nei primi anni '80, e poi in Inghilterra, Germania, Svizzera e Italia, registrando un discreto successo. Da allora, il settore ha avuto una crescita costante in termini di produzione e fatturato. I dati raccolti sul mercato globale della sola frutta fresca confezionata (FactorMR 2024) riferiscono di 13 miliardi di dollari di fatturato nel 2023 con un incremento potenziale che porterà a 22,64 miliardi di dollari entro il 2034. Negli ultimi anni, infatti, i cambiamenti nello stile di vita e un aumento del tempo trascorso fuori casa, per lavoro o studio, hanno favorito il consumo di frutta fresca minimamente lavorata (Pollard J., 2002). Il successo commerciale di questi prodotti è attribuito non solo alla praticità d'uso, ma anche alla qualità, che comprende freschezza, aspetto, sapore e durata di conservazione al momento dell'acquisto (Ragaert P., 2004). C'è, infatti, una maggiore attenzione da parte del consumatore al valore nutrizionale dell'alimento consumato. In quest'ottica la mela, grazie alle sue proprietà nutrizionali e fisiche, si presta ad essere minimamente processata. È il secondo frutto più prodotto al mondo (86 milioni di tonnellate), dopo le banane (120 milioni di tonnellate) secondo FAOSTAT 2020 e possiede notevoli proprietà nutrizionali, tra cui un alto contenuto di fibre alimentari, solidi solubili totali (TSS), acidi, vitamine, polifenoli e antiossidanti (US Department of Agriculture, 2015). Ricerche mediche attestano i benefici del suo consumo a livello di prevenzione delle malattie cardiovascolari e nel regolare le funzioni vascolari, la pressione sanguigna e la glicemia (Bondonno et al., 2017). In linea con questo *trend* anche il colosso *McDonald's* ha optato per inserimento della mela a fette, come *snack* salutare, all'interno degli *Happy Meal* per i più piccoli. La *shelf life* di questo prodotto si aggira tra gli 5 e i 7 giorni (Farris et al., 2012). I consumatori sono sensibili alla data di scadenza dei prodotti alimentari. Essa, infatti, influisce indirettamente sulla commerciabilità dei prodotti (Iqbal et al., 2024). La sfida attuale, pertanto, consiste nel prolungarne la *shelf life* mantenendo elevati gli aspetti nutrizionali e qualitativi e garantendone la sicurezza

dal punto di vista microbiologico attraverso soluzioni, innovative, ecosostenibili e a basso impatto ambientale. Un aumento della *shelf life*, infatti, comporterebbe una crescita della domanda, un potenziale abbassamento dei prezzi, una maggiore accessibilità a fasce di popolazione economicamente più deboli e la conseguente riduzione di spreco alimentare.

1.1 Definizione giuridica e normativa

Lo studio sulla normativa e sulla definizione giuridica e commerciale del prodotto finale è prodromico a qualsiasi nuova formulazione nonché all'introduzione di innovazioni di processo e prodotto. Il rischio, infatti, è quello di introdurre processi o di riformulare prodotti che poi non risultino in linea con le norme. Il *Codex Alimentarius* rappresenta la base di numerose normative nazionali e regola gli scambi commerciali a livello internazionale. Il Codex definisce la frutta *ready to eat*¹:

“Ready-to-eat fresh fruits and vegetables –Any fruit or vegetable that is normally eaten in its raw state, intended for direct human consumption without anyfurther microbiocidal steps. This may include any fruit or vegetable that has been washed, peeled, cut or otherwise physically altered from its original form but remains in the fresh state”.

All'allegato I sono suggerite le buone pratiche di gestione e preparazione. L'assenza di trattamenti microbici comporta, infatti, una maggiore attenzione all'igiene del personale, dei luoghi e delle attrezzature in fase di taglio, l'uso di acqua potabile in fase di prelavaggio e di lavaggio e della refrigerazione a basse temperature pre e post-produzione.

L'Unione europea non norma i prodotti minimamente processati. Essi rientrano piuttosto nella categoria più ampia di “prodotti non trasformati” come definiti dall'art. 2 c.1 lett. (n) del Regolamento europeo 852/2004:

¹ Code of hygienic practice for fresh fruits and vegetables cxc 53-2003 Adopted in 2003. Revised in: 2010 (new Annex III for fresh leafy vegetables), 2012 (new Annex IV for Melons), 2013 (new Annex V for Berries), 2017.

“prodotti alimentari non sottoposti a trattamento, compresi prodotti che siano stati divisi, separati, sezionati, affettati, disossati, tritati, scuoiati, frantumati, tagliati, puliti, rifilati, decorticati, macinati, refrigerati, congelati, surgelati o scongelati”.

È definito "trattamento" ai sensi dell'art. 2 c.1 lett. (m):

“qualsiasi azione che provoca una modificazione sostanziale del prodotto iniziale, compresi trattamento termico, affumicatura, salagione, stagionatura, essiccazione, marinatura, estrazione, estrusione o una combinazione di tali procedimenti”.

L'Italia, infine, ha emanato una legge in cui definisce chiaramente le operazioni unitarie di processo.

“i prodotti ortofrutticoli destinati all'alimentazione umana freschi, confezionati e pronti per il consumo che, dopo la raccolta, sono sottoposti a processi tecnologici di minima entità atti a valorizzarli seguendo le buone pratiche di lavorazione articolate nelle seguenti fasi: selezione, cernita, eventuale monda e taglio, lavaggio, asciugatura e confezionamento in buste o in vaschette sigillate, con eventuale utilizzo di atmosfera protettiva².

Appare evidente che la freschezza, intesa anche come assenza di trattamenti e di microbici, si conferma come caratteristica obbligatoria *ex lege* dei suddetti prodotti. Qualsiasi tipo, pertanto, di strategia si applichi per preservare la freschezza e migliorare la sicurezza del prodotto, differente da azioni preventive di gestione dell'igiene prima e durante la lavorazione, deve rispettare i dettami del Codex, dei Regolamenti e delle Leggi nazionali e non prevedere trattamenti o l'uso di conservanti alimentari (vedi Reg. CE 1331/2008 e 1333/2008 e relativo elenco), nella fase di stoccaggio finale del prodotto.

1.2 Processo produttivo

In figura 1 sono riportate le principali operazioni unitarie del processo. Tra le attività di natura preventiva sono presenti lo stoccaggio a temperatura refrigerata che varia tra

² Art. 2, L. 77 del 13/05/2011 (GU Serie Generale n.126 del 01-06-2011);

0 e 4° C, spesso abbinato all'uso di atmosfere a basso contenuto di O₂ e/o fino al 10% di CO₂ (Seung & Kader, 2000) per preservare il contenuto di vitamina C. Segue una fase di cernita dei frutti.

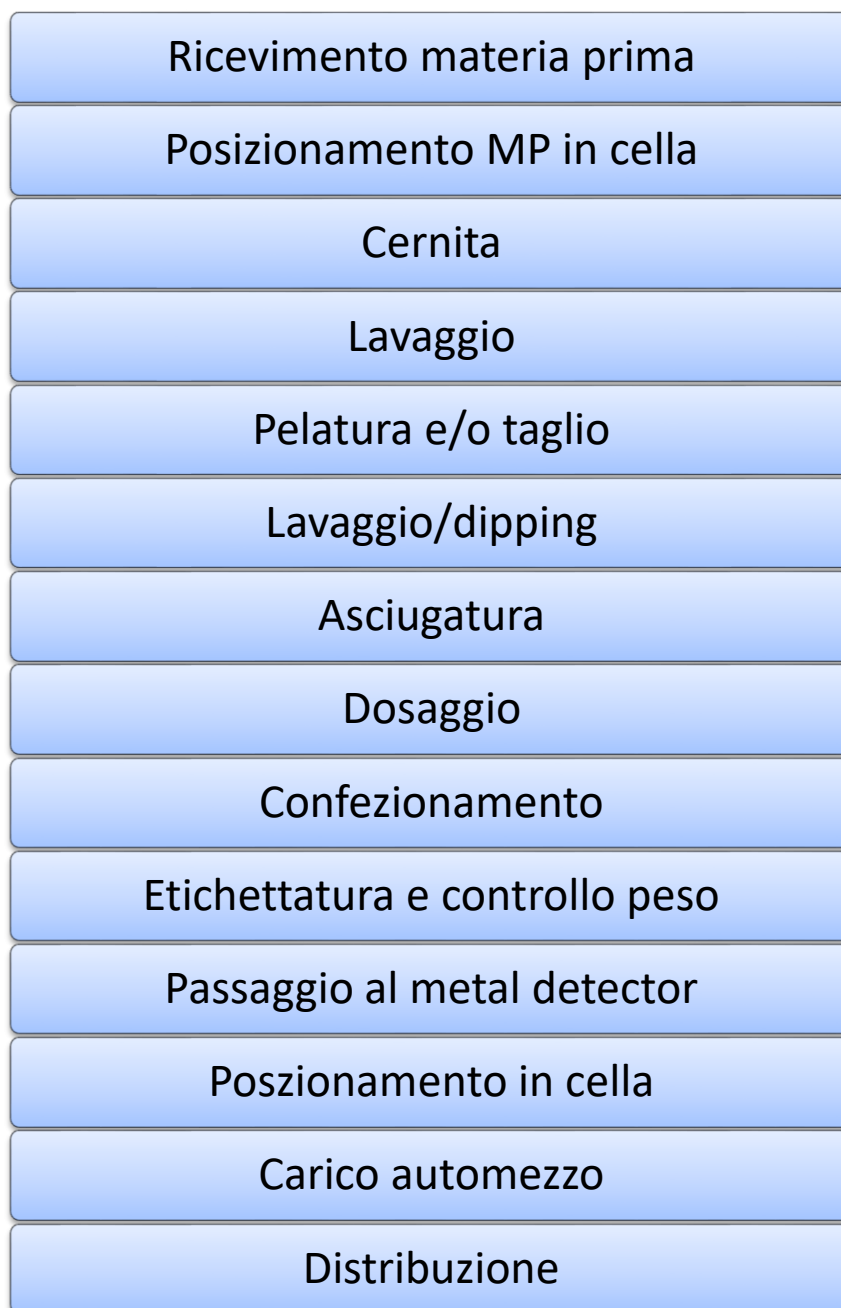


Figura 1: Diagramma di flusso del processo produttivo

È consigliabile, infatti, utilizzare frutti poco maturi perché consentono una minore perdita di succhi cellulari dovuta all'aumentata resistenza dei tessuti, nonché privi di macchie o imperfezioni sulla buccia che potrebbero essere sintomatici di colonizzazione ad opera di muffe e batteri. Il prelavaggio e l'asciugatura sono consigliati sia se si decide di mantenere la buccia esterna sui pezzi di frutta, sia se questa viene rimossa. Il prelavaggio e il risciacquo aiutano a rimuovere i residui di pesticidi (Farris et al., 2012) e sono effettuati con l'aggiunta di ipoclorito di sodio in concentrazioni che variano tra i 50 e i 200 ppm per un tempo di sosta pari a 1-3 minuti (Soliva-Fortuny et al., 2003; Bett et al., 2001; Lanciotti et al., 1999). La temperatura dell'acqua è solitamente mantenuta fra 0 e 1 °C con pH compreso tra 6.5 e 7.5 (Boyette et al., 1993). Le fasi di pelatura e taglio sono quelle più delicate perché espongono il frutto alla contaminazione ambientale ed accelerano i processi di deterioramento. Oltre alla preventiva disinfezione degli strumenti è raccomandato l'uso di lame rotanti, lisce e affilate in acciaio (Gil et al., 2006). La forma del taglio e l'affilatura della lama di taglio influenzano gli attributi di qualità dei prodotti pronti al consumo (Aguayo et al., 2006; Hodges & Toivonen, 2008). Portela e Cantwell hanno dimostrato che i cilindri di melone tagliati con una lama smussata hanno maggiori perdite di elettroliti e un potenziale di secrezione di etilene più elevato rispetto ai prodotti lavorati con una lama affilata (Portela & Cantwell, 2001). Tuttavia, altri fattori possono influenzare la risposta alle ferite dei prodotti appena tagliati. Questi fattori includono stadio di maturazione, cultivar, conservazione, temperatura di lavorazione, metodo di taglio, pressione del vapore acqueo e livelli di O₂ e CO₂ (Hodges & Toivonen, 2008; Portela & Cantwell, 2001). Il lavaggio che segue la pelatura e il taglio ha lo scopo di rimuovere i succhi vacuolari, substrato ottimale per la crescita microbica, e di migliorare gli aspetti qualitativi, quali colore e texture (li vedremo più avanti nel dettaglio). L'asciugatura, invece, è finalizzata alla rimozione dell'acqua superficiale libera. La presenza, infatti, di acqua a contatto con i tessuti potrebbe favorire la contaminazione e la proliferazione batterica. Esistono mezzi di asciugatura ad aria, assorbenti o con centrifuga. La scelta dipende dal tipo di prodotto, per evitare ulteriori danni alle cellule superficiali (Turatti, 2007). Le operazioni unitarie successive sono definite di controllo e consistono nel confezionamento in contenitori di plastica sigillati, con o senza atmosfera modificata, e nel mantenimento della temperatura di refrigerazione fino

all'acquisto. La tecnologia MAP (confezionamento in atmosfera modificata) può essere attiva (aggiunta o sostituzione di gas) o passiva, senza ulteriori modifiche alla composizione iniziale del gas (Caleb et al., 2006).

1.3 Attributi di qualità e cause di decadimento

La *shelf life* di un prodotto altamente deperibile, non sottoposto a trattamento termico o microbica, ed esposto nelle fasi di lavorazione alla contaminazione ambientale, è molto breve e dipende da diversi fattori che condizionano la velocità di crescita microbica. Sebbene la contaminazione avvenga normalmente già nel campo, durante la crescita del frutto, attraverso l'aria, l'acqua (Garrett et al., 2003; Cliver, 1997), il terreno, gli insetti (Iwasa et al., 1999) e gli animali domestici e selvatici (Altekruse et al., 1997; Hosek et al., 1996), un ruolo importante riveste la fase di lavorazione successiva al lavaggio e alla cernita. La gestione del rischio (Reg. CE 852/2004) preveda l'adozione in fase di lavorazione di procedure pre-operative e operative volte al mantenimento dell'igiene dei luoghi, delle attrezzature e delle persone. Tuttavia, la letteratura riporta conteggi di batteri mesofili di 10^3 - 10^6 UFC/g come frequenti nei prodotti IV gamma analizzati immediatamente dopo la lavorazione. Mentre nei punti vendita al dettaglio e negli esercizi di ristorazione, i conteggi di batteri mesofili sono più variabili, e oscillano tra i 10^3 e 10^9 UFC/g (Nguyen & Carlin, 1994). Il Regolamento CE 2073/2005 aggiornato, per valutare la qualità dei processi produttivi ha stabilito come indicatore *l'Escherichia coli* (Limiti: 100 - 1000 unità formanti colonie per grammo (metodo ISO 16649-1 o durante la lavorazione), fino a 2 unità su 5 entro i limiti, con le altre al di sotto del limite inferiore, indicano un processo accettabile; più di 2 unità su 5 entro i limiti o una o più unità al di sopra del limite superiore indicano un processo difettoso che deve essere corretto.

Ci sono, però, altri attributi qualitativi, non strettamente connessi alla sicurezza alimentare, che rivestono importanza in fase di acquisto e consumo e che indirizzano la scelta del consumatore di acquistare o di riacquistare il prodotto. Essi sono: colore e aspetto, consistenza al morso, valore nutrizionale. Il consumatore valuta prima l'aspetto visivo e il colore, poi la consistenza (Beaulieu, 2006; Waldron et al., 2003). È l'aspetto a determinare il rifiuto o l'accettazione del prodotto (Hutchings, 1977); se l'aspetto non è accettato dal consumatore, non seguirà alcuna esperienza di assaggio

per valutare sapore e consistenza. Pertanto, questo è uno degli attributi più critici dal punto di vista della qualità. Sappiamo che ogni pigmento nella frutta e nella verdura corrisponde a una tonalità primaria: rosso, blu e verde (Gross, 1987). Il colore può essere ulteriormente caratterizzato determinando la luminosità o il grado in cui un oggetto riflette la luce e la cromaticità o saturazione, che è l'intensità del colore o la differenza dal grigio della stessa luminosità. Frutta e verdura sono spesso descritte in base ai loro valori L, a e b. Per la frutta, il rapporto a/b è molto utile, poiché il rapporto è negativo per la frutta immatura, circa 0 per la frutta gialla e positivo per la frutta imbrunita (Gross, 1987). Nelle mele (e nella frutta in generale) l'imbrunimento enzimatico inizia pochi minuti dopo il taglio, a contatto con l'ossigeno atmosferico. L'esposizione del tessuto della mela all'aria porta all'ossidazione dei polifenoli che si trovano naturalmente nel frutto e alla graduale formazione di melanina di colore rosso-marrone. Il percorso biochimico della formazione della melanina è illustrato nella figura 2. I passaggi iniziali della formazione della melanina sono catalizzati dalle polifenolossidasi (di seguito PPO, EC 1.14.18.1), una grande famiglia di enzimi contenenti rame che sono anche chiamati tirosinasi, monofenolmonossidasi o catecolossidasi a seconda della loro fonte e specificità del substrato (Kaintz et al., 2014).

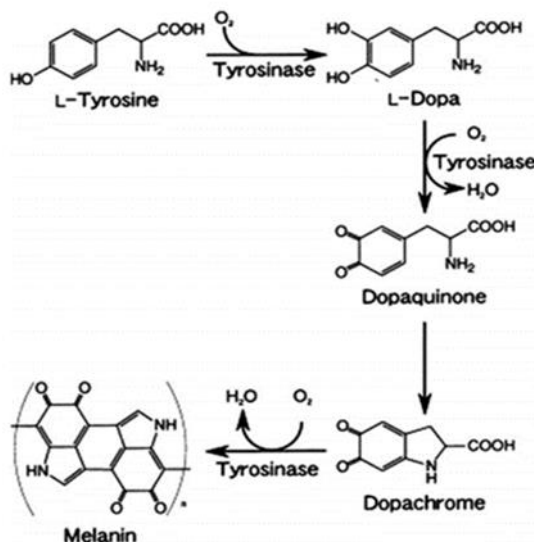


Figura 2: Percorso metabolico per la formazione della melanina dalla L-tirosina.

I primi due passaggi sono catalizzati dalla polifenolossidasi, che è anche detta tirosinasi (Deutch, 2018). Gli enzimi operano su diversi composti correlati che hanno uno o più gruppi idrossilici attaccati a un anello benzenico: composti fenolici che determinano le caratteristiche del frutto come colore, astringenza e sapore. In particolare, la PPO catalizza due reazioni di: (1) idrossilazione dei monofenoli a difenoli e (2) ossidazione dei difenoli a chinoni. La reazione di idrossilazione è relativamente lenta e dà origine a prodotti incolori, mentre la reazione di ossidazione è relativamente rapida. Successivamente, l'aggregazione dei chinoni porta all'accumulo di melanina associata all'imbrunimento dei tessuti dei frutti (Yildiz et al., 2020). Nelle stesse condizioni ambientali e atmosferiche, la concentrazione di substrati polifenolici, il pH e l'attività della PPO determineranno il grado di imbrunimento (Amiot et al., 1992; Holderbaum et al., 2010; Kolodziejczyk et al., 2010). Nella figura seguente (Toivonen & Brumell, 2008) possiamo osservare la posizione della

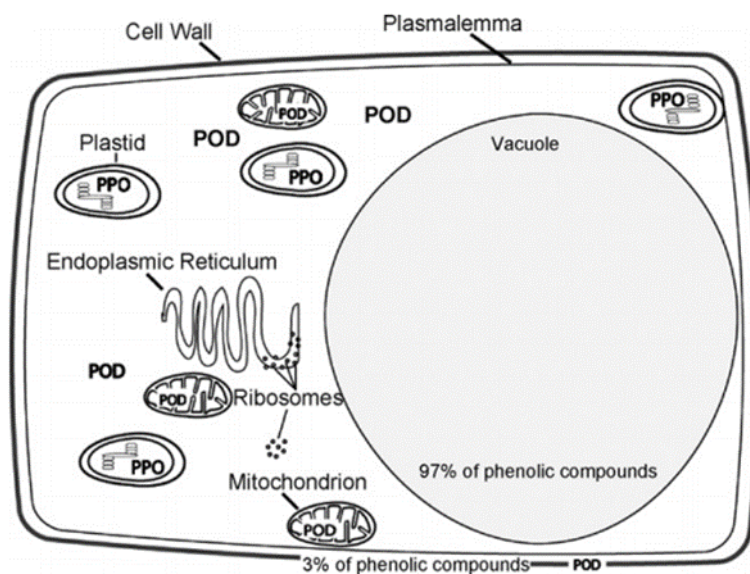


Figura 3: La localizzazione interna ed esterna dei composti fenolici e degli enzimi ossidanti fenolici (polifenolossidasi e perossidasi) in una tipica cellula vegetale (Toivonen et Brumell, 2008).

perossidasi (di seguito POD) e della PPO all'interno dei plastidi e nel citoplasma. I composti fenolici, d'altro canto, si trovano per il 97% all'interno dei vacuoli e per il 3% sulla membrana cellulare, nei cromoplasti, nel citoplasma e nei mitocondri, associati a specifiche funzioni metaboliche. I composti fenolici sono sintetizzati da proteine situate sul reticolo endoplasmatico. Una volta formati, vengono glicosilati ed

espulsi per essere trasportati nel vacuolo mediante apposite vescicole (Hrazdina & Wagner, 1985). Pertanto, la rottura della membrana cellulare ad opera di un evento traumatico, o per senescenza, determina la miscelazione di substrati polifenolici (ad esempio, catechina, polifenoli) con PPO e/o fenolo POD (Degl'Innocenti et al., 2005), avviando così le reazioni biochimiche alla base del processo di imbrunimento.

Dopo il colore e l'aspetto, il consumatore è fortemente influenzato dalle sensazioni percepite in bocca: consistenza e succosità. Per descrivere la consistenza vengono utilizzati diversi descrittori: croccantezza, durezza al morso, farinosità, granulosità, ecc. (Harker et al., 1997a; Harker et al., 1997b). La percezione è condizionata dall'anatomia fisica del tessuto. Dimensioni delle cellule, spessore e resistenza della parete cellulare, entità dell'adesione cellula-cellula e turgore cellulare. Molti di questi fattori sono correlati, ad esempio, i tessuti costituiti da piccole cellule tendono ad avere un contenuto di parete cellulare più elevato, una quantità relativa inferiore di citoplasma e succo vacuolare, un'area di contatto cellula-cellula più ampia e quantità inferiori di spazio intercellulare, rendendo il tessuto più compatto e apparentemente meno succoso. Man mano che il frutto matura, le cellule si degradano lentamente, con conseguente riduzione della compattezza della parete cellulare e dell'adesione intercellulare. Oltre alla resistenza e alle proprietà della parete cellulare, la consistenza è correlata alle proprietà di turgore. La turgidità è l'effetto della pressione esercitata dal succo vacuolare sulla parete cellulare. Durante la maturazione del frutto, la turgidità diminuisce (Shackel et al., 1991; Harker & Sutherland, 1993), probabilmente a causa di fenomeni osmotici causati dall'accumulo di soluti nell'apoplasto (Almeida & Huber, 1999). Un frutto turgido sarà croccante al morso e durante la masticazione. Nei frutti croccanti, ad esempio, come la mela e l'anguria, il tessuto della parete primaria si rompe bruscamente. (Glenn & Poovaiah, 1990; Harker et al., 1997b). Il taglio attiva non solo la 1-amminociclopropano-1-carbossilato sintasi (ACC sintasi EC 4.4.1.14) con il conseguente aumento di etilene (Yu & Yang, 1980), ma genera anche una serie di segnali ormonali e di altro tipo (idraulici, elettrici) che mediano le risposte di difesa e stress (Leon et al., 2001). Questi segnali inducono l'attivazione dei geni di difesa e stress e portano a un'espressione alterata di mRNA e proteine (Mehta et al., 1991). Nei frutti climaterici, l'etilene indotto dalla ferita avrebbe lo stesso effetto del trattamento con etilene esogeno, causando una maturazione e un ammorbidimento

accelerati. Sia per la frutta che per la verdura, la produzione di etilene può promuovere la senescenza e la sua rimozione, o l'antagonismo con l'1-metilciclopropene estenderebbe la durata di conservazione del prodotto (Abe & Watada, 1991; Jeong et al., 2004). Nella papaya pronta al consumo, è stato dimostrato che la quantità di etilene prodotta è correlata all'entità del danno inflitto e la compattezza del tessuto affettato diminuisce rapidamente durante le 48 ore, rispetto al lento declino della compattezza del frutto intatto (Paul & Chen, 1997).

Il consumatore in fase di acquisto attribuisce valore alla presenza nel frutto della vitamina C in quanto marker di valore nutrizionale. La vitamina C di solito si degrada più rapidamente e può essere utilizzata come indice di freschezza. Durante la conservazione, infatti, indipendentemente dalla temperatura di stoccaggio, tende a diminuire in diverse specie ortofrutticole (pomodoro, mela, patata, fragola), fungendo così da indicatore del deterioramento della frutta (Lee & Kader, 2000) e rendendo necessaria l'applicazione di metodi di gestione post-raccolta adeguati a ridurre al minimo le perdite (Mellidou et al., 2017). Questa perdita si evidenzia nei frutti interi ma anche in quelli sottoposti a processo. Sono state, infatti, rilevate lievi perdite di vitamina C anche nei meloni minimamente processati conservati (Beaulieu & Lea, 2007; Gil et al., 2006). La sintesi dell'acido ascorbico avviene all'interno dei mitocondri attraverso diverse vie biochimiche, di cui la principale è la via dell'L-galattosio, chiamata anche via di Smirnoff-Wheeler (Wheeler et al., 1998). La formazione, tuttavia, può avvenire anche tramite rigenerazione attraverso il ciclo di Foyer-Halliwell-Asada (Foyer & Halliwell, 1976), Tale meccanismo di rigenerazione, è spesso associato all'esposizione del frutto a stress ambientali. L'acido monodeidroascorbico (MDHA), poi convertito in acido deidroascorbico (DHA) si forma da acido ascorbico tramite l'ascorbato perossidasi (APX) per mezzo di una disproporzione non enzimatica o attraverso la catalisi dell'ascorbato ossidasi (AO). Sia MDHA che DHA possono essere convertiti nuovamente in acido ascorbico rispettivamente dalla monodeidroascorbato riduttasi (MDHAR) e dalla deidroascorbato riduttasi (DHAR) (Smirnoff, 2018). La rigenerazione, invece, non può avvenire quando l'acido deidroascorbico è ossidato e la degradazione risulta irreversibile (Truffault et al., 2017). L'acido ascorbico svolge un ruolo importante nella resistenza allo stress abiotico (Akram et al, 2017; Mellidou et al., 2021). Elimina

le specie reattive dell'ossigeno prodotte da siccità, salinità, gelo e da altri stress abiotici, proteggendo le cellule da potenziali danni (Li et al., 2018; Bath et al., 2017; Min et al., 2020). È stato dimostrato che una lieve siccità e lo stress salino possono aumentare il contenuto di antocianine e acido ascorbico nel frutto della fragola (Perin et al., 2019).

1.4 Soluzioni tradizionali e innovative per il mantenimento degli attributi di qualità

1.4.1 Dipping

Per limitare la variazione di colore, tipica dell'imbrunimento, la frutta viene solitamente immersa subito dopo il lavaggio e l'asciugatura. Le soluzioni più utilizzate sono quelle a base di acido ascorbico (AsA) semplice o sotto forma di sale, ad esempio ascorbato di calcio (Rupasinghe et al., 2005). L'acido ascorbico ha mostrato un forte impatto sulla PPO, causando la completa inibizione dell'enzima, anche a basse concentrazioni (Queiroz et al., 2011). Esso è stato spesso applicato in combinazione con acidi organici e sali di calcio per prevenire l'imbrunimento enzimatico della frutta (Pizzocaro et al., 1993; Soliva-Fortuny et al., 2001, 2002 a&b). Nella formulazione con calcio agisce anche in parte per prevenire la rottura delle cellule e delle membrane e modula l'attività della PPO nelle cellule danneggiate (Toivonen & Brummell, 2008). Tuttavia, questo trattamento non è completamente efficace nel controllare l'imbrunimento enzimatico della frutta pronta al consumo, poiché una volta che l'AsA è completamente ossidato ad acido deidroascorbico ed è avvenuta l'aggregazione degli o-chinoni l'imbrunimento può verificarsi comunque (Nicolas et al., 1994). Gli acidi sono spesso utilizzati in combinazione con un agente riducente chimico per ottenere un effetto maggiore. In letteratura è riportata un'inibizione di oltre il 90% dell'attività PPO nei cubetti di mela utilizzando una miscela di 1% AsA + 0,2% acido citrico o 1% AsA + 0,5% cloruro di sodio in fette di pera (Pizzocaro et al., 1993). Al contrario, il colore è stato sostanzialmente migliorato durante la conservazione refrigerata quando immerso in una soluzione di CaCl_2 all'1% (Rosen & Kader, 1989). Per rallentare l'effetto di rammollimento della texture, vengono utilizzati trattamenti post e pre-raccolta con diversi sali di calcio. Il calcio, infatti, può interagire con i gruppi carbossilici rilasciati dalla de-esterificazione della pectina da parte della PME per formare pectati di calcio insolubili, che rafforzano la struttura della parete cellulare. Il

prelavaggio con NaCl, infatti, è solitamente seguito da un'immersione con acido ascorbico per limitare l'azione del PPO rimuovendo l'O₂ a cui si lega (El-Shimi, 1993) e da un'immersione in cloruro di calcio, che si è rivelato efficace nel mantenere la consistenza e ridurre gli effetti di imbrunimento (Giacalone & Chiabrandò, 2018).

1.4.2 Gli ultrasuoni

Le recenti tecniche alternative e più sostenibili per migliorare la frutta fresca tagliata includono il confezionamento in atmosfera modificata, gas inerti pressurizzati, irradiazione con fascio di elettroni, luce pulsata, luce ultravioletta, plasma freddo e alta pressione (Arnold & Gramza-Michałowska, 2022; Gomes et al., 2023). Tra i vari metodi di lavorazione non termica, la tecnologia a ultrasuoni si è dimostrata molto utile, sia da sola che in combinazione. La sua applicazione nell'industria alimentare è stata ampiamente studiata per migliorare le prestazioni di alcune operazioni unitarie, come congelamento, emulsione, estrazione (Riera et al., 2004), essiccazione (Rodríguez et al., 2014; Azoubel et al., 2010; Cárcel et al., 2011). Gli ultrasuoni sono definiti come la trasmissione di energia sonora sotto forma di onda di pressione e a frequenze superiori al limite uditivo umano (circa 16 kHz). È una forma di energia vibrazionale prodotta da un trasduttore ultrasonico che converte l'energia elettrica in energia acustica. Possono essere classificati in tre categorie in base alla frequenza: ultrasuoni di potenza (20-100 kHz), ultrasuoni ad alta frequenza (100 kHz-1 MHz) e ultrasuoni diagnostici (1-500 MHz). Il flusso di potenza (P_s) degli ultrasuoni su una data area (A) è chiamato "intensità acustica degli ultrasuoni" (I). Per un'onda piana non divergente, se l'intensità raddoppia, l'ampiezza della variazione di pressione (p) aumenta di un fattore quattro. Questa relazione è mostrata dalla seguente equazione:

$$I = \frac{P_s}{A} = \frac{p^2}{\rho c} = \frac{p^2}{Z} = \varepsilon^2 \omega^2 Z \quad (1)$$

Dove " ρ " è la densità del liquido, " p " è l'ampiezza degli ultrasuoni, " ω " è la velocità angolare ($\omega = 2\pi f$ dove f è la frequenza), " c " è la velocità del suono e " Z " è l'impedenza acustica. Questa equazione viene utilizzata per calcolare la capacità di diversi materiali di riflettere, attenuare e diffondere il suono, a 20 kHz, il coefficiente di attenuazione dell'acqua è di circa $2.0 \times 10^{-7} \text{ cm}^{-1}$. Ciò significa che solo il 2% dell'energia ultrasonica viene attenuata lungo un percorso di 1 km nell'acqua. Tuttavia, la presenza di bolle di

gas nell'acqua attenua l'energia ultrasonica a causa della differenza di impedenza Z tra aria/gas e acqua. La differenza di impedenza, d'altra parte, tra acqua e tessuto biologico è molto piccola nella misura in cui l'energia viene facilmente trasmessa dall'acqua alle cellule e, quindi, tra le cellule in un tessuto biologico. Infatti, il riscaldamento ultrasonico di una cellula sferica di due micron produrrà un aumento di temperatura di solo pochi millesimi di grado rispetto all'acqua (Cavicchi, 1985). Data la minima variazione di temperatura, sia nell'acqua che nei tessuti biologici, gli effetti principali degli ultrasuoni devono essere ricondotti a un altro fenomeno associato: la cavitazione ultrasonica. La cavitazione consiste nella formazione, crescita e violento collasso di bolle in un mezzo liquido. Infatti, durante la trasmissione di onde ultrasoniche nel liquido, l'energia si accumula in un certo punto e, rilasciata all'improvviso, genera temperature localizzate tra 2.000 e 5.000 K e pressioni da 1.800 a 3.000 atm (Brennen, 1995). Le condizioni all'interno della bolla sono sufficienti per produrre radicali idrossilici nell'acqua (sonochimica) o emettere luce (sonoluminescenza) all'interno della bolla. Un oggetto solido situato nelle vicinanze della bolla viene colpito da energia che viaggia fino a 300 m/s (Lauterborn & Bubbles, 1975). I fenomeni di sonochimica e sonoluminescenza rappresentano solo una piccola parte dell'energia potenziale di una bolla. Il 99,9% dell'energia si manifesta sotto forma di energia meccanica o calore. (Didenko & Suslick, 2002). Gli ultrasuoni sono quindi responsabili di effetti chimici, meccanici e biologici. Gli effetti chimici includono la degradazione di contaminanti organici come clorobenzene, *p*-etilfenolo (Seymour & Gupta, 1997). Questi effetti aumentano con l'aumento della concentrazione del gas, aggiungendo sale o aumentando la frequenza. Tra gli effetti meccanici, d'altra parte, abbiamo la distruzione delle catene laterali del polimero (Portenlänger & Heusinger, 1997), con una velocità dipendente dal peso molecolare. Infine, la distruzione delle particelle avviene a una frequenza inferiore (Tiehm et al. 2001; Wang & Wang, 2005). Oltre a questi effetti, ci sono effetti secondari o derivati sulla materia: l'effetto diretto "spugna" o flusso inerziale, e l'effetto indiretto "microcanale". Nel primo caso, quando le onde ultrasoniche attraversano il prodotto, provocano una rapida compressione ed espansione alternata del tessuto della matrice, paragonabile all'effetto di una spugna strizzata e rilasciata a una certa frequenza nel tempo (Fuente-Blanco et al., 2006; Mulet et al., 2009). Questo fenomeno promuove il flusso di massa pompando e mantenendo

la pervietà dei micropori. Nel secondo caso, invece, abbiamo la formazione di microcanali come effetto secondario della cavitazione che favorisce la rottura dei tessuti e delle cellule vegetali. Questo fenomeno è stato dimostrato in vari alimenti umidi, come meloni, patate, fragole, mele e merluzzo (Karizaki et al., 2013; Gamboa-Santos et al., 2014). Uno studio ha dimostrato che l'effetto indiretto della formazione di microcanali si verifica in alimenti con elevata attività dell'acqua. L'effetto spugna sia negli alimenti a bassa che ad alta aW. Inoltre, la forma dei microcanali è completamente casuale e irregolare (Miano et al., 2016). Certamente, di notevole importanza, per quanto riguarda la sicurezza alimentare, sono gli effetti biologici degli ultrasuoni. Gli ultrasuoni ad alta intensità causano l'inattivazione dei batteri. È stato dimostrato che più di 30 minuti di sonicazione con una potenza di uscita di 350 W/L hanno causato l'inattivazione di *Escherichia coli* O157 (Dehghani, 2005). Sembra che gli ultrasuoni inducano stress nei batteri, il che si traduce in diversi tipi di risposte. Ad esempio, Vollmer et al. hanno scoperto che l'*Escherichia coli* ha mostrato diversi tipi di risposta allo stress, tra cui danni alla membrana, carenza di ammoniaca, shock termico e danni ossidativi dopo cinque minuti di sonicazione con ultrasuoni da 1 MHz (Vollmer et al., 1998). Probabilmente, danni alla membrana da microstreaming, danni ossidativi da sonochimica e danni UV da sonoluminescenza si verificano a causa dello shock termico. Questi effetti sembrano essere concentrati sulla superficie del batterio. Per inattivare la popolazione microbica e influenzare l'attività enzimatica, è stato segnalato che gli ultrasuoni vengono applicati in molti prodotti alimentari (succhi, latticini, acqua, carne, ecc.) (Pagnossa et al., 2020). Tuttavia, l'efficacia degli ultrasuoni dipende fortemente dal livello di resistenza dei microrganismi/enzimi trattati. Le spore sono più resistenti delle forme vegetative (Mason et al., 2003). I batteri Gram-positivi sono più resistenti dei batteri Gram-negativi, probabilmente a causa dello spessore della parte cellulare e della composizione (peptidoglicano e acido teicoico) (Ojha et al., 2017). Per quanto riguarda gli enzimi, è stata osservata un'inattivazione dovuta alla depolimerizzazione delle catene laterali, anche se non in modo coerente (Mason et al., 2003). Infatti, i radicali liberi generati dalla decomposizione ultrasonica dell'acqua interagiscono con i residui di amminoacidi per influenzare l'attività enzimatica (Islam et al., 2014; Karaseva & Meteliza, 2006). Infine, combinati con metodi chimici antimicrobici, gli ultrasuoni sono ancora più

efficienti (Adal, 2020; Demirdoven & Baysal, 2008). Il trattamento con ultrasuoni non ha avuto effetti significativi sul contenuto di vitamina C del pomodoro (Costa et al., 2013). Gli ultrasuoni accoppiati con acqua idrolizzata a bassa concentrazione acida hanno inibito significativamente le attività PPO e POD dei funghi pronti al consumo, ritardando l'imbrunimento e riducendo la perdita di durezza (Wu et al., 2018). L'attività PPO è stata ridotta nel succo del 20%, senza effetti significativi sul contenuto di composti fenolici (Yeoh & Ali, 2017), e nel succo di mela fresco, ma con un contenuto fenolico totale ridotto, contenuto totale di flavonoidi e contenuto di acido clorogenico, probabilmente a causa delle specifiche condizioni sperimentali e delle differenze tra varietà di frutta e verdura (Sun et al., 2015). L'applicazione degli ultrasuoni su mele e frutta di quarta gamma è piuttosto recente. Un primo utilizzo è nella fase di prelavaggio della materia prima. La ricerca ha dimostrato che gli ultrasuoni possono rimuovere fino a quasi il 92% dei residui di 16 pesticidi dalla buccia (Lozowicka et al., 2016). Ultrasuoni ad alta potenza (20 kHz, 600 W, 3-9 min) inattivano completamente lieviti e muffe a 60 °C, ma lo stesso fenomeno non è stato osservato a 20 °C e 40 °C (Jambrak et al., 2018). In merito all'applicazione di ultrasuoni alle fette di mela, quale varietà ha risposto meglio al trattamento e se gli ultrasuoni da soli o combinati con additivi sono più efficaci, uno studio sistematico è stato condotto da Putnik (Putnik et al., 2017), che ha valutato gli ultrasuoni e diversi tipi di dipping in relazione a diverse varietà di mele. Le varietà commerciali selezionate sono state *Idared*, *Golden Delicious*, *Gala*, *Gloster*, *Cripps Pink*, *Braeburn* e *Fuji*. L'esperimento è stato condotto mantenendo le mele in presenza o in assenza di ossigeno. L'analisi sensoriale e del colore ha mostrato che le cultivar con minore tendenza all'imbrunimento e maggiore apprezzamento sensoriale erano *Golden Delicious* e *Cripps Pink*. Dopo aver selezionato le cultivar più adatte, la seconda parte dello studio ha identificato le migliori soluzioni anti-imbrunimento. Un bagno in acido ascorbico + acido citrico; acido ascorbico + NaCl; NaCl, acido citrico e ascorbato di calcio è stato effettuato sulle cultivar *Cripps Pink* e *Golden Delicious*. L'ascorbato di calcio e l'acido ascorbico/citrico hanno ricevuto il miglior punteggio sensoriale e i campioni trattati sono stati valutati uguali o addirittura migliori dei campioni non trattati. Per quanto riguarda il cambiamento di colore e l'indice di imbrunimento (BI), è stato osservato un cambiamento di colore maggiore in *Cripps Pink* rispetto a *Golden Delicious*. Entrambe le cultivar quando immerse in

ascorbato di calcio hanno avuto un cambiamento di colore cinque volte inferiore rispetto ai controlli. L'ascorbato di calcio e la miscela di acido ascorbico/acido citrico sono stati selezionati come le migliori soluzioni anti-imbrunimento da testare mediante esposizione ultrasonica (US) a 40 kHz per 1 o 3 minuti, in un tempo di conservazione e controllo di 24 ore. È interessante notare che le soluzioni hanno mostrato tendenze opposte quando i campioni sono stati esposti agli ultrasuoni. I campioni di ascorbato di calcio tendevano a diminuire di colore giallo b^* (5%) mentre l'opposto si osservava per la miscela di acido ascorbico/citrico (aumento dell'8%). Inoltre, periodi più brevi di esposizione ultrasonica favorivano l'imbrunimento, mentre periodi più lunghi tendevano a diminuire il cambiamento di colore. Una possibile spiegazione potrebbe essere ricercata in una maggiore compattezza (Andani et al., 2001) della *Cripps Pink* rispetto alla *Golden Delicious*, in quanto era meno incline a imbrunirsi durante il trattamento con ultrasuoni. L'influenza positiva degli ultrasuoni sull'acido ascorbico è stata precedentemente riportata in letteratura. In quel caso, gli ultrasuoni associati sono stati in grado di far assorbire l'acido ascorbico all'interno della cellula, con conseguente diminuzione dell'attività della monofenolasi (Jang & Moon, 2011) e della PPO (Jang et al., 2009). Per il calcio sembra ragionevole supporre che gli ioni Ca^{2+} aumentino la compattezza nei frutti (Garcia & Barrett, 2002). Infatti, uno studio molto recente mostra che l'applicazione di ultrasuoni durante il prelavaggio della frutta insieme a $CaCl_2$ ha aumentato l'assorbimento di Ca^{2+} nel tessuto, la compattezza dei frutti di giuggiola e ha inibito l'aumento della respirazione e della produzione di etilene. Gli ultrasuoni hanno consentito una maggiore distribuzione di Ca^{2+} nell'apoplasto e nel simplasto durante la conservazione (Zhi et al., 2017). In un altro studio condotto sugli effetti degli ultrasuoni sulle fette di mela cotogna (Yildiz et al., 2020), è stato esaminato l'effetto del trattamento chimico (acido ascorbico e cloruro di calcio in diverse concentrazioni) rispetto al trattamento fisico (bagno d'acqua a 65 °C) e al bagno a ultrasuoni durante 14 giorni di conservazione. Le fette di mela cotogna trattate sono state analizzate in termini di colore, attività di polifenolo ossidasi e PME, composti bioattivi, analisi sensoriale e microbica. I risultati hanno mostrato che il trattamento con ultrasuoni ha inibito la crescita di batteri, muffe, apportando miglioramenti significativi nei composti bioattivi e proprietà fisiche rispetto a tutti gli altri trattamenti. Allo stesso modo, i campioni trattati con ultrasuoni hanno mostrato i

migliori valori di colore con meno imbrunimento enzimatico e il punteggio più basso per decadimento e cattivo odore durante l'analisi sensoriale. Quindi, in generale, ciò che emerge è una certa efficacia del trattamento ad ultrasuoni nel disattivare la PPO, probabilmente dovuta all'effetto di cavitazione, e l'utilità nel mantenere la struttura intercellulare, quando combinato con l'uso di CaCl_2 o con acido ascorbico.

2. SCOPO DEL PROGETTO DI RICERCA

La frutta *ready to eat* è un *convenience* e un *functional food* che risente, come abbiamo visto, di una *shelf life* molto breve, in linea con il concetto di freschezza insito nel prodotto. La durata commerciale, l'elevato rischio di perdita anzitempo di attributi di qualità quali, in particolare, il colore, e il divieto dell'uso di conservanti e antimicrobici generano la necessità di introdurre tecnologie innovative per preservarne le caratteristiche e la freschezza. Il lavaggio con ultrasuoni potrebbe essere un'adeguata soluzione. Rientrerebbe facilmente all'interno del diagramma di flusso del processo produttivo senza che ci sia la necessità di introdurre una ulteriore operazione unitaria, aumentando così i costi di produzione; è una tecnologia sostenibile e a basso costo; non ha finalità microbica *sensu stricto*, tale da essere ritenuto un trattamento in violazione delle norme. Ma presenta, invece, effetti multipli, agendo sia a livello enzimatico che microbico. Di contro è una tecnologia complessa in cui sono presenti numerosi fattori di processo che necessitano di accurata modulazione e che interagiscono tra loro determinando esiti finali differenti sul prodotto. Risulta, pertanto, necessario effettuare una sperimentazione che testi gli effetti principali dei singoli fattori e le loro interazioni per tentare di comprendere meglio il processo e le ricadute sui singoli attributi di qualità. Lo scopo del presente lavoro è stato, dunque, valutare:

- 1) gli effetti di un bagno con acqua a ultrasuoni e del tradizionale dipping, nonché la loro combinazione, su attributi di qualità della mela *Cripps Pink* cv. appena tagliate durante 14 giorni di conservazione a 4°C.
- 2) gli effetti principali e le interazioni di fattori di processo quali la temperatura del mezzo, la potenza degli ultrasuoni, il tempo di esposizione in relazione anche alla presenza di calcio, di acido ascorbico o della loro combinazione in

soluzione, sul colore e sulla consistenza delle mele *Granny Smith cv* appena tagliate dopo 14 giorni di conservazione a 4°C.

I disegni sperimentali a due e cinque fattori, in due livelli, delle due fasi saranno utili a determinare la presenza di differenze significative tra i campioni e a comprendere il ruolo dei parametri di processo e i loro meccanismi di interazione, al fine di stabilire la combinazione utile a mantenere o migliorare le caratteristiche di qualità della mela di IV gamma.

3. ESPERIMENTO I: EFFETTI DEGLI ULTRASUONI E DEL DIPPING SUGLI ATTRIBUTI DI QUALITÀ DI *CRIPPS PINK CV*. DI IV GAMMA

3.1. Materiali e metodi

3.1.1. Preparazione dei campioni

Le mele *Cripps Pink cv.* sono state acquistate in un supermercato locale a Palermo in confezioni da 6 (peso: 1 kg). L'acido L-ascorbico (AsA) è stato acquistato da Lafod srl, Fasano, Italia. Il cloruro di calcio è stato acquistato presso Alquera Ciencia SL, Madrid, Spagna. Le mele intere sono state disinfettate con alcool etilico denaturato; tagliate con un coltello di acciaio inox, sotto cappa in dischi di circa 1,5 cm di spessore. Il nucleo centrale è stato rimosso utilizzando un levatorsoli in acciaio inossidabile. Il coltello e il levatorsoli sono stati preventivamente disinfettati con alcol etilico prima del taglio di ogni mela. Per ogni mela sono stati realizzati 3 dischi, che sono stati poi divisi in 4-5 pezzi di forma triangolare. Le mele sono state divise in 4 gruppi: il gruppo A è il campione non trattato); il gruppo B è stato immerso in un bagno a ultrasuoni (US) (Shenzhen DeKang Electronic Cleaning Appliances Co., LTD) con acqua deionizzata a 28 kHz, intensità di 120 kW/m³, potenza di 100 W per 10 minuti (dopo 3 minuti di degasaggio). Il tempo e la frequenza ottimali sono stati determinati dopo un precedente esperimento di 2,5, 5, 10 e 15 minuti a 28 e 40 kHz; Il gruppo C è stato sottoposto a trattamento con ultrasuoni in una soluzione di acqua deionizzata con acido L-ascorbico al 2% e cloruro di calcio all'1% p/p per 10 minuti a 28 kHz, intensità di 120 kW/m³, potenza di 100 W, dopo 3 minuti di degasaggio). Il gruppo D è stato immerso in una soluzione di acqua deionizzata con acido L-ascorbico al 2% e cloruro di calcio all'1% p/p per 3 minuti, tempo medio di trattamento di immersione, come riportato nella maggior parte dei lavori pubblicati (intervallo da 1 a 5 min) (Soliva-

Fortuny & Martin-Belloso, 2003). Sono state eseguite tre ripetizioni per ciascun gruppo. Dopo i trattamenti, i campioni di mele appena tagliate sono stati asciugati con un tovagliolo di carta assorbente e confezionati in sacchetti di polietilene, etichettati adeguatamente, e conservati in condizioni di refrigerazione a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ per 14 giorni. Tutte le analisi sono state ripetute il giorno 0, 7 e 14.

3.1.2. Design sperimentale

La progettazione degli esperimenti è stata impostata come segue (fig. 4). Le due applicazioni, innovativa e tradizionale, ultrasuoni (US) e immersione (DIPP), con acido ascorbico al 2% (AsA) e cloruro di calcio all'1% (CC), sono stati trattati come due fattori indipendenti. Ogni fattore presenta due livelli: assenza (NO) e presenza (YES), per un totale di quattro combinazioni. L'obiettivo era valutare come ogni singolo fattore influenzi gli attributi di qualità (colore e consistenza, microbiologia e acido ascorbico), l'attività enzimatica della polifenolossidasi (PPO) in una mela *Cripps Pink* cv. di IV gamma e se questa influenza sia o meno statisticamente significativa. A questo scopo, è stata eseguita un'analisi di regressione fattoriale. L'equazione di regressione con più di un termine assume la seguente forma:

$$Y = a_0 + a_1A + a_2B + a_3AB + \varepsilon \quad (2)$$

dove Y è la variabile di risposta; A, B sono due fattori; a_0 è una costante del modello; a_1 , a_2 sono coefficienti lineari; a_3 rappresentano gli effetti di interazione del modello, ε l'errore.

DESIGN SPERIMENTALE

FULL FATTORIAL 2²

	StdOrder	RunOr>>	CenterPt	Blocks	ULTRASUONI	DIPPING	TRATTAMENTO	CODICE
1	1	1	1	1	NO	NO	CONTROLLO	CONTROLLO
2	2	2	1	1	YES	NO	ULTRASUONI	US
3	4	3	1	1	YES	YES	ULTRASUONI*DIPPING	US*DIPP
4	3	4	1	1	NO	YES	DIPPING	DIPP

Fig. 4: Design sperimentale fattoriale completo a 2 fattori e 2 livelli (NO/SI). Il livello NO indica assenza; il livello SI, presenza.

3.1.3. Determinazione dell'indice di imbrunimento

Il colore della superficie delle mele appena tagliate è stato misurato utilizzando un Minolta Chromameter (CR-300, Minolta, Tokyo, Giappone) dotato di illuminante D65 e un'area di misurazione di 8 mm nella scala cromatica CIE L* a* b*. Il colorimetro è stato calibrato utilizzando una piastra standard bianca. Le variabili di colore, tra cui L* (chiaro/scuro), a* (rosso/verde) e b* (giallo/blu) nella scala cromatica Hunter Lab (Hunter Lab, 1996), sono state misurate su ciascun campione di mela appena tagliata (A) o su quelli sottoposti a trattamenti (B, C, D). I risultati sono stati espressi come valore medio di tre repliche, ciascuna composta da tre misurazioni su cui i parametri sono stati valutati in due posizioni. L'indice di imbrunimento (BI) è stato calcolato utilizzando la seguente equazione (Pathare et al., 2013):

$$BI = \frac{[100(x-0.31)]}{0.17} \quad x = \frac{(a^*+1.75L^*)}{(5.645L^*+a^*-3.012b^*)} \quad (3)$$

L'aspetto visivo delle fette cambia durante la conservazione ed è stato monitorato tramite foto (Fig. 6).

3.1.4. Determinazione della resistenza alla compressione

Il test di compressione è stato condotto utilizzando una macchina per prove meccaniche universali Instron (modello 5564, Tinius Olsen Company) con una capacità di carico di 2 kN e una sonda di compressione cilindrica di 30 mm di diametro. Ogni singolo campione di mela (tre ripetizioni per tre repliche) è stato inizialmente tagliato in una forma cilindrica con un diametro di 30 mm e spessore 15 mm. Successivamente, è stato caricato tra due piastre parallele della macchina e compresso. I test di compressione sono stati eseguiti a temperatura ambiente (23 °C) alle seguenti condizioni: una velocità di prova di 10 mm/min. L'acquisizione dei dati per questi profili testuali è stata eseguita utilizzando il software fornito con la macchina Instron. Il parametro valutato è la resistenza alla compressione, misurata con la massima risposta di forza in Newton (N).

3.1.5. Estrazione di polifenolossidasi e determinazione dell'attività

L'estratto proteico per l'attività della polifenolossidasi (PPO) è stato ottenuto omogeneizzando la polvere congelata di mela (1:2 p/v) con tampone di fosfato di sodio

(0,5 M, pH 6.4) contenente il 2% (p/v) di PVPP. Il contenuto proteico è stato valutato con il test di Bradford (Bradford, 1976). L'attività della polifenolossidasi (EC 1.10.3.1) è stata determinata come descritto da (Petriccione et al., 2018). L'attività della PPO è stata espressa come nmol per g/peso fresco.

3.1.6. Determinazione del contenuto in acido ascorbico

Il contenuto di acido ascorbico (AsA) è stato determinato secondo il metodo descritto da (Magri et al., 2022) con alcune modifiche. Le fette di mela (1:4, w/v) sono state estratte con una soluzione di acido metafosforico al 16% (v/v) e acido etilendiamminotetraacetico disodico allo 0,18% (w/v). La miscela è stata centrifugata a 11000 per g per 10 min a 4 °C. La reazione è stata ottenuta utilizzando 200 µl di estratto, acido metafosforico allo 0,3% (v/v) e reagente di Folin diluito (1:5, v/v). I risultati sono stati espressi come mg di acido ascorbico (AsA) per 100 g/peso fresco.

3.1.7. Determinazione della conta microbica totale

Sono stati prelevati 30 grammi del campione e omogeneizzati con 270 ml di acqua peptonata tamponata (BPW) per 5 minuti utilizzando uno stomacher Maxicator (IUL S.A., Barcellona, Spagna). Sono state preparate diluizioni decimali seriali (1:10) dalla sospensione madre e, successivamente, 1 ml di ciascuna sospensione/diluizione è stato inoculato per l'inclusione in Plate Count Agar (PCA) e distribuito su piastre Dichloran-Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC). Le piastre PCA sono state incubate a 30 °C per 72 ore, mentre le piastre DRBC sono state incubate a 25 °C per 5 giorni. Le analisi sono state condotte in triplicato e i risultati ottenuti sono stati espressi in LOG di unità formanti colonie per grammo (UFC/g).

3.1.8. Analisi statistica

È stata eseguita l'analisi della varianza (ANOVA) a una via per confrontare la differenza fra i trattamenti allo stesso tempo di conservazione. Le differenze tra le medie sono state studiate con il test di Tukey e le differenze a $p < 0.05$ sono state considerate significative. L'analisi degli effetti (ANOVA a due vie) è stata condotta secondo Viera et al. 2020. Per valutare gli effetti dei fattori sono stati utilizzati: il grafico normale degli effetti standardizzati, i grafici di Pareto e i grafici delle

interazioni. Il grafico normale rappresenta graficamente la direzione e l'entità degli effetti. Nel grafico normale degli effetti standardizzati, gli effetti e le interazioni con coefficienti negativi (segni negativi) sono nella regione inferiore al 50%, mentre i fattori e le interazioni con coefficienti positivi (segni positivi) sono nella regione superiore al 50%. Tutti gli effetti principali e le interazioni non significativi giacciono sulla linea retta (la linea centrale che attraversa il valore zero sull'asse x al 50% di probabilità). Quelli considerati significativi nella risposta sono distanziati dalla linea retta. I segni positivi degli effetti principali indicano un aumento delle variabili, viceversa una riduzione. Sul grafico di Pareto gli effetti superiori a 2.31 ($p = 0.05$), situati a destra della linea di demarcazione, sono significativi. I valori standardizzati assoluti degli effetti di ciascun fattore e delle interazioni corrispondono al test t di Student calcolato per ciascuna variabile indipendente. Il grafico delle interazioni è utile a mostrare come la relazione tra un fattore categoriale e una variabile dipendente continua dipenda dal valore del secondo fattore categoriale (McCabe et al., 2018). I dati sono stati elaborati utilizzando il software Minitab® 19, Minitab Inc., State College, Pennsylvania, USA.

3.2. Risultati

3.2.1. Indice di imbrunimento

Tab. 1: Media + deviazione standard dei risultati per indice di imbrunimento.

Trattamento	T	Media	StDev	95% CI
CONTROLLO	0	24.9 ±3.4		(21.90; 27.94)
US	0	22.3 ±1.9		(19.32; 25.35)
US*DIPP	0	21.6 ±1.2		(18.61; 24.64)
DIPP	0	22.3 ±2.0		(19.30; 25.33)
CONTROLLO	7	49.0 ±4.0		(45.05; 53.05)
US	7	30.9 ±3.2		(26.90; 34.90)
US*DIPP	7	25.4 ±1.6		(21.45; 29.44)
DIPP	7	28.0 ±2.0		(23.99; 31.99)
CONTROLLO	14	48.5 ±2.2		(45.77; 51.31)
US	14	32.7 ±2.4		(29.93; 35.47)
US*DIPP	14	26.8 ±2.4		(24.05; 29.59)
DIPP	14	28.8 ±0.8		(26.01; 31.55)

La tabella riporta la media + ds dell'attività dell'indice di imbrunimento nei campioni trattati e non (controllo=campione non trattato; US=campione trattato con ultrasuoni; US*DIPP=campione trattato con ultrasuoni e dipping; DIPP=campione immerso nel dipping), misurata immediatamente dopo il trattamento, e nei giorni 7 e 14 di conservazione.

Per valutare gli effetti del trattamento sul colore durante il periodo di conservazione, è stato considerato l'indice di imbrunimento (BI) della mela. I risultati dell'ANOVA a una via e del test di Tukey (Tab. 1 e Fig. 5) mostrano che, al giorno 0, post trattamento, i campioni non presentano differenze significative dovute all'applicazione dei diversi trattamenti. Dopo 7 giorni di conservazione a temperatura di stoccaggio controllata (+ 4° C) le mele (fig. 5) presentano differenze statisticamente significative ($p \leq 0.05$).

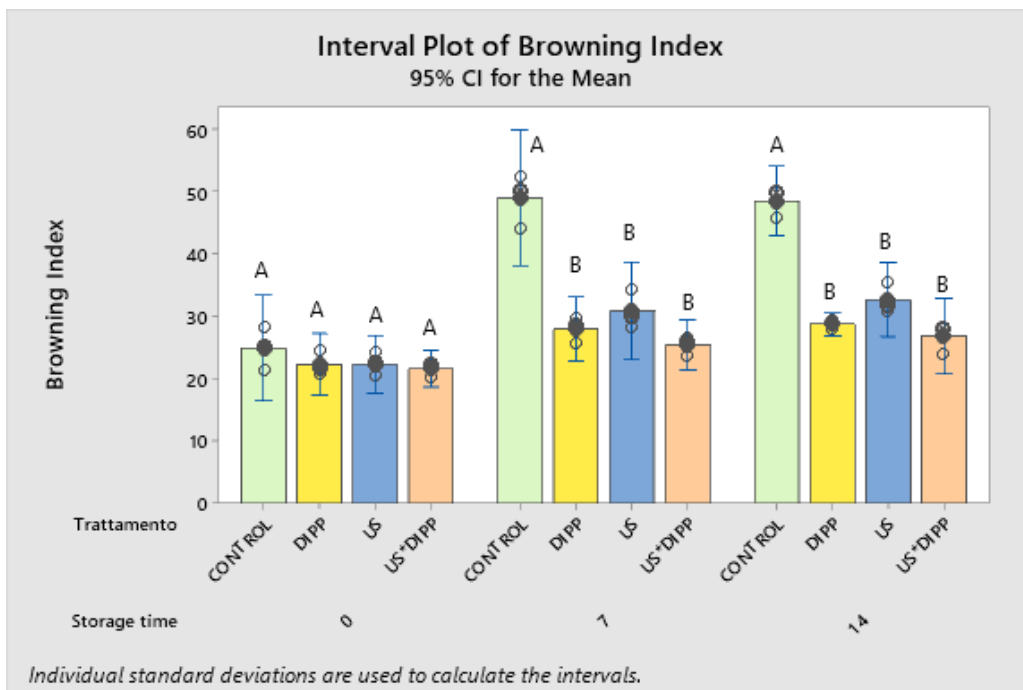


Fig. 5: Interval plot dei trattamenti a diversi tempi di controllo. A-B indicano differenze statisticamente significative ($p \leq 0.05$) tra i trattamenti allo stesso tempo di controllo.

In particolare, il campione non trattato ha una media di 49.0 ± 4.0 (tab. 1), pari quasi al doppio del campione trattato con ultrasuoni e dipping. Gli altri tre campioni trattati, invece, non mostrano alcuna differenza significativa ($p \geq 0.05$) tra di loro. Dopo 14 giorni di stoccaggio, il controllo non trattato mantiene i valori di imbrunimento più elevati segnando una differenza statisticamente significativa ($p \leq 0.05$) rispetto agli altri campioni trattati, con valori stabili rispetto al campione controllato il settimo giorno. Si evidenzia tramite analisi visiva (fig. 6) la differenza tra il controllo e i restanti campioni. Esso appare già imbrunito dopo i primi 7 giorni di stoccaggio rispetto agli altri. Il campione trattato con soli ultrasuoni mostra visivamente una lieve differenza di imbrunimento nel tempo. Il dipping e il trattamento US*DIPP presentano

un andamento simile nel tempo e restituiscono un campione finale con maggiore luminosità e minore imbrunimento superficiale.

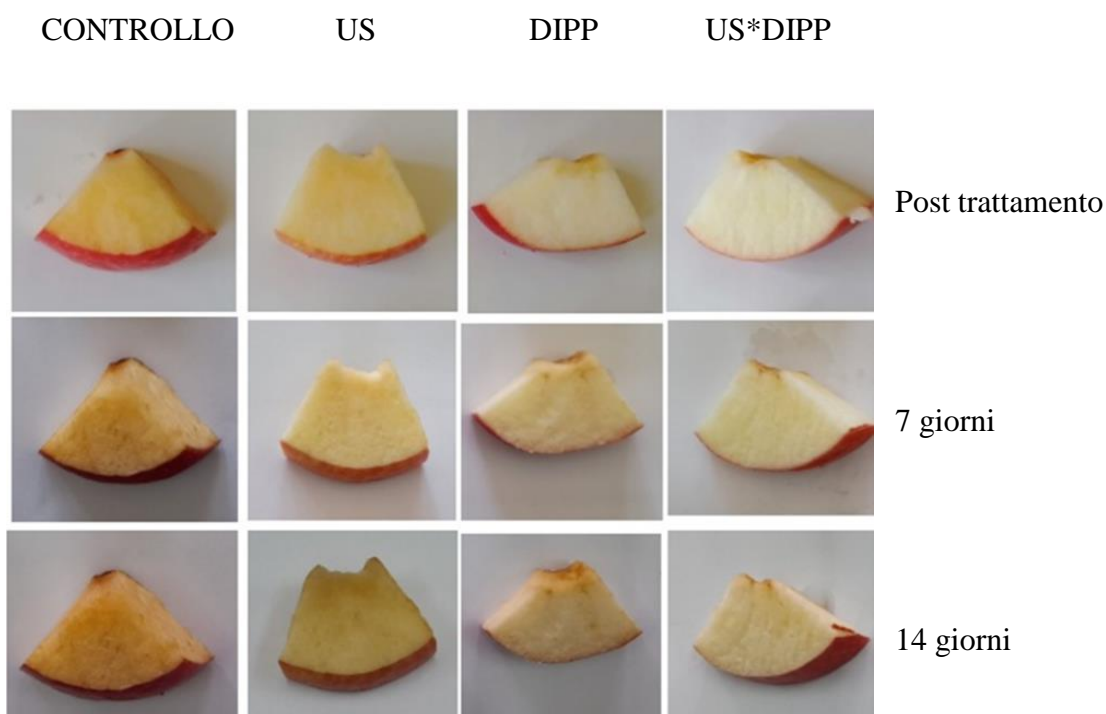


Fig. 6: Repertorio fotografico di un gruppo di repliche dei campioni, fotografati durante i quattordici giorni di stoccaggio.

L'ANOVA a due vie (tab. 2), a differenza della precedente analisi, che si limita a fornire solo una comparazione dei trattamenti per evidenziare eventuali differenze, rivela il peso o, meglio, l'effetto principale dei fattori di processo sulla variabile di risposta, singolarmente e in combinazione, in modo da determinare anche eventuali effetti di interazione statisticamente significativi.

Tab. 2: Analisi della varianza per la risposta indice di imbrunimento dopo il trattamento.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	p-value
Model	3	18.980	6.327	1.23	0.360
Linear	2	16.303	8.151	1.59	0.262
US	1	8.049	8.049	1.57	0.246
DIPP	1	8.254	8.254	1.61	0.240
2-Way	1	2.677	2.677	0.52	0.491
Interactions					
US*DIPP	1	2.677	2.677	0.52	0.491
Error	8	41.038	5.130		
Total	11	60.018			

US=Ultrasuoni; DIPP=Dipping; US*DIPP=Ultrasuoni più dipping. p-value ≤ 0.05 denota un effetto principale o una interazione statisticamente significativa dei fattori di processo.

In questo studio si è optato per valutare un possibile impatto dell'effetto in due momenti: dopo il trattamento e dopo 14 giorni di conservazione con il fine di comprendere se ci sia o meno un'evoluzione o un cambiamento nel tempo della relazione tra i fattori di processo in esame. La tabella 2 e il grafico di Pareto (fig. 7) post trattamento segnalano che non ci sono effetti principali o interazioni significativi ($p \geq 0.05$) sull'imbrunimento della mela post trattamento.

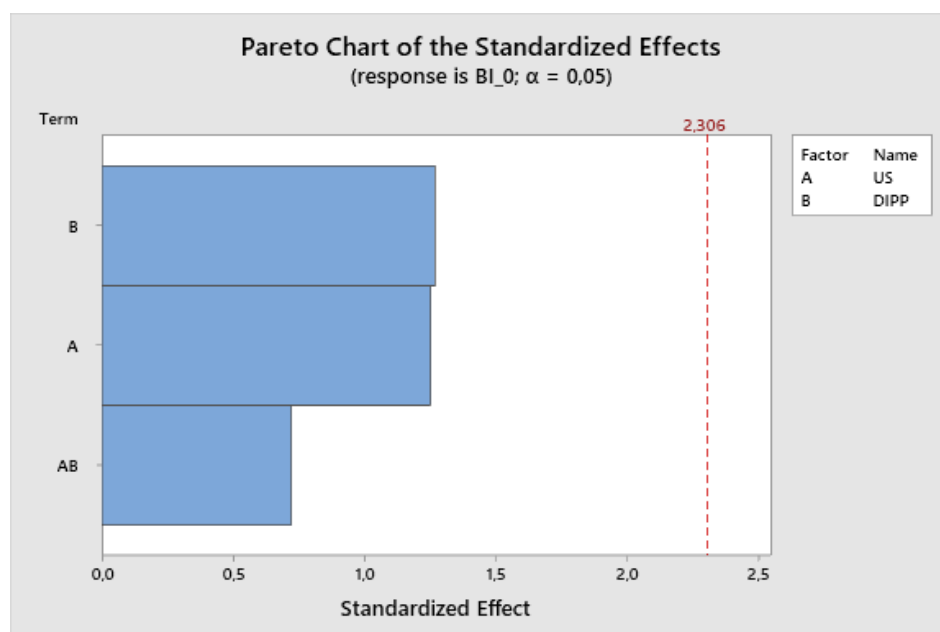


Fig. 7: Grafico di Pareto degli effetti principali standardizzati della risposta indice di imbrunimento dopo il trattamento.

In tabella 3 sono riportati gli effetti dei singoli fattori e la loro direzione, data dal segno che precede.

Tab. 3: Effetti stimati e coefficienti per la risposta indice di imbrunimento dopo il trattamento.

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		22.799	0.654	34.87	0.000	
US	-1.638	-0.819	0.654	-1.25	0.246	1.00
DIPP	-1.659	-0.829	0.654	-1.27	0.240	1.00
US*DIPP	0.945	0.472	0.654	0.72	0.491	1.00

Il segno che precede i valori in colonna "Effect" indica la direzione dell'effetto: - significa che in presenza del fattore la variabile dipendente diminuisce, + che in presenza del fattore la variabile aumenta. $p \leq 0.05$ indica che l'effetto principale o l'interazione sono statisticamente significativi.

Seppur non in maniera statisticamente significativa la presenza di dipping o di ultrasuoni registra la tendenza ad abbassare la risposta della variabile BI. La loro interazione (fig. 8), invece, mostra un potenziale effetto sinergico, si verifica quando la compresenza di un fattore intensifica la direzione dell'effetto del primo fattore sulla

risposta della variabile. Nel caso in oggetto US*DIPP restituiscono un valore più basso di BI seppur non significativo.

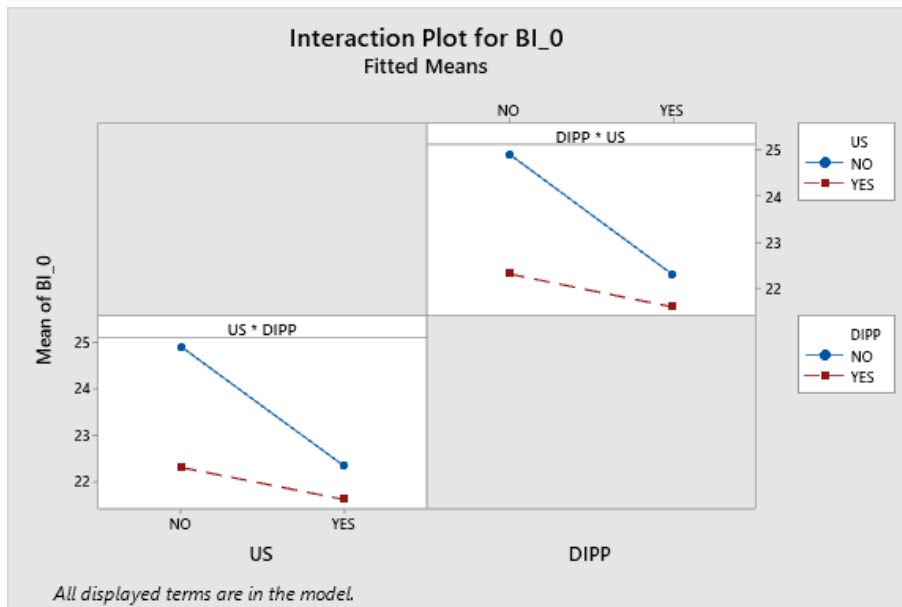


Fig. 8: Interaction plot per la risposta indice di imbrunimento dopo il trattamento.

Questo andamento è chiaramente visibile anche sul grafico degli effetti normalizzati (fig. 9), dove entrambi i fattori, US e DIPP, si trovano a destra della linea centrale.

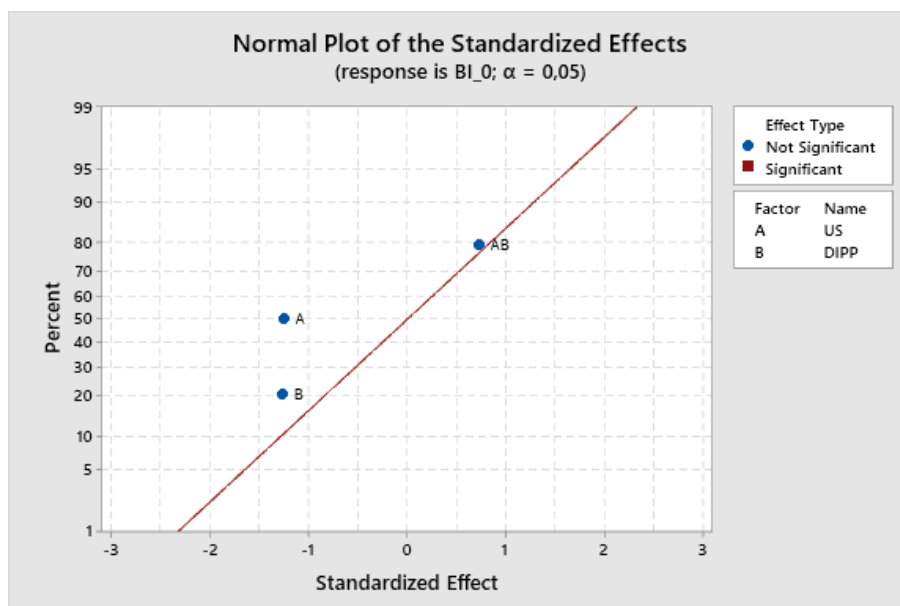


Fig. 9: Normal probability plot degli effetti standardizzati per la risposta indice di imbrunimento dopo trattamento.

Dopo 14 giorni di conservazione, i singoli fattori e le interazioni risultano tutti statisticamente significativi (tab. 4), come si evince anche dal grafico di Pareto (fig.10).

Tab. 4: Analisi della varianza per la risposta indice di imbrunimento dopo 14 giorni di conservazione.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	3	875.29	291.762	67.46	0.000
Linear	2	730.63	365.317	84.46	0.000
US	1	237.77	237.773	54.97	0.000
DIPP	1	492.86	492.862	113.95	0.000
2-Way Interactions	1	144.65	144.652	33.44	0.000
US*DIPP	1	144.65	144.652	33.44	0.000
Error	8	34.60	4.325		
Total	11	909.89			

US=Ultrasuoni; DIPP=Dipping; US*DIPP=Ultrasuoni più dipping. p-value ≤ 0.05 denota un effetto principale o una interazione statisticamente significativa dei fattori di processo.

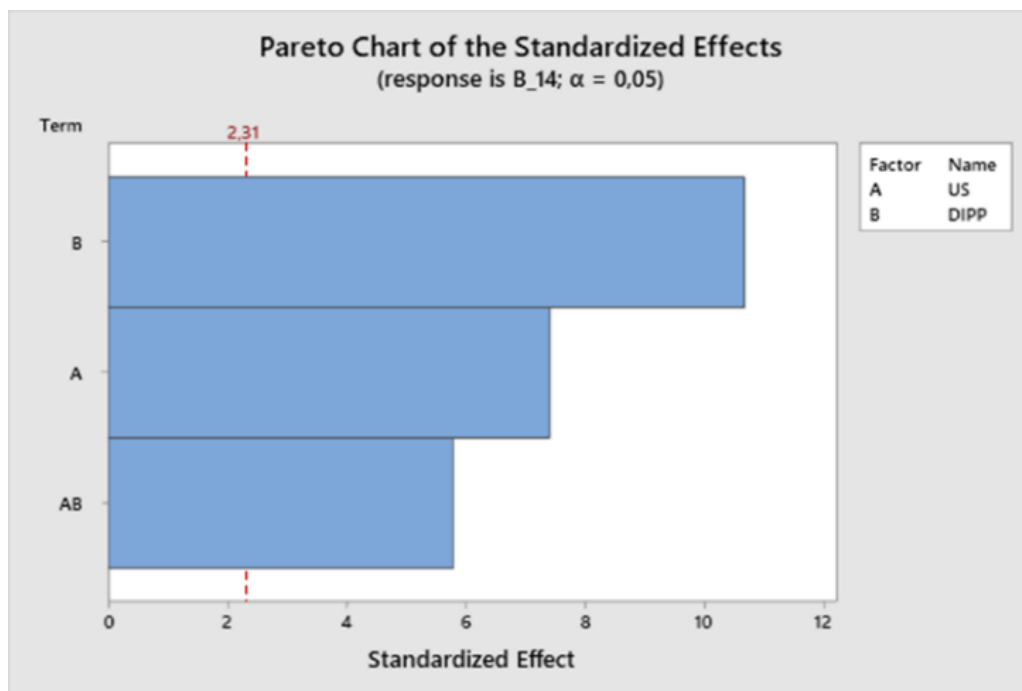


Fig. 10: Grafico di Pareto per la risposta indice di imbrunimento dopo 14 giorni di conservazione.

Il dipping presenta l'effetto maggiore, seguito da ultrasuoni e interazione. Il dipping e gli ultrasuoni confermano l'impatto negativo (tab. 5) sulla variabile, indice di imbrunimento, già segnalata nella fase post trattamento.

Tab. 5: Effetti stimati e coefficienti per la risposta indice di imbrunimento dopo 14 giorni di conservazione.

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		34.211	0.600	56.98	0.000	
US	-8.903	-4.451	0.600	-7.41	0.000	1.00
DIPP	-12.817	-6.409	0.600	-10.67	0.000	1.00
US*DIPP	6.944	3.472	0.600	5.78	0.000	1.00

Il segno che precede i valori in colonna “Effect” indica la direzione dell’effetto: – significa che in presenza del fattore la variabile dipendente diminuisce, + che in presenza del fattore la variabile aumenta. $p \leq 0.05$ indica che l’effetto principale o l’interazione sono statisticamente significativi.

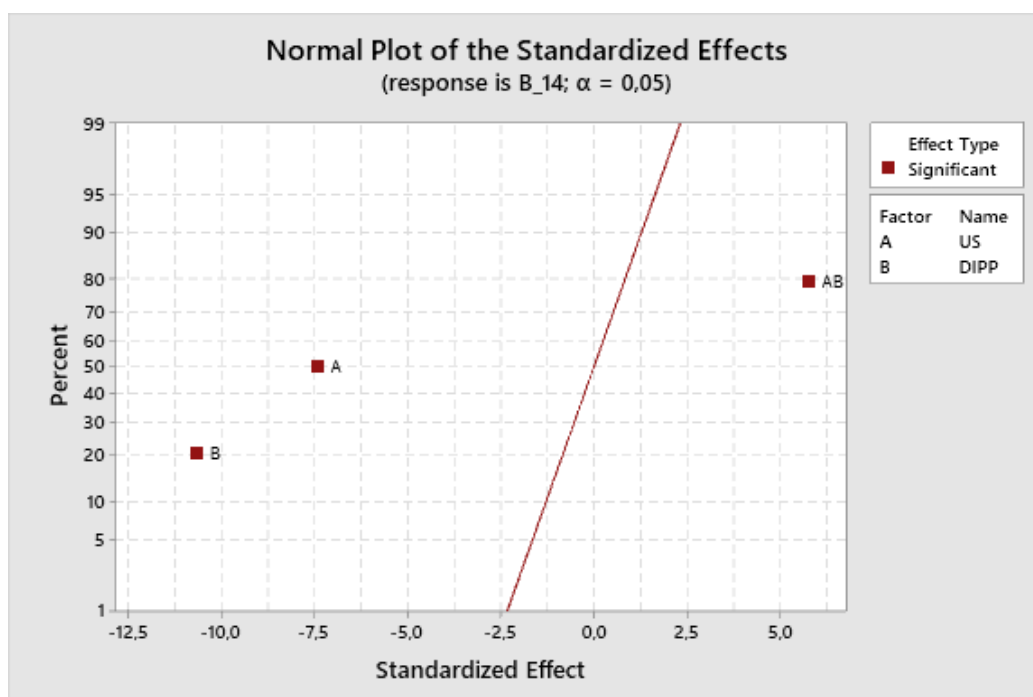


Fig. 11: Normal probability plot degli effetti standardizzati per la risposta indice di imbrunimento dopo 14 giorni di conservazione.

È interessante notare attraverso l’analisi del normal plot degli effetti standardizzati (fig.11) e del grafico dell’interazione (fig. 12) che anche l’interazione, non solo è significativa ($p \leq 0.05$), ma mostra chiaramente un effetto sinergico tra i fattori, che provoca l’intensificazione degli effetti negativi dei singoli trattamenti se compresenti. Tale effetto (negativo sulla variabile ma positivo nel raggiungimento dell’obiettivo finale di mela con minore imbrunimento) dell’acido ascorbico e del cloruro di calcio sui campioni di mela a differenti concentrazioni è già stato documentato in letteratura (Ponting et al., 2006). L’uso di ultrasuoni da soli (Yildiz et al., 2020) o in combinazione con acido ascorbico (Jang et al., 2009) o calcio ascorbato (Putnik et al., 2017), ha evidenziato un effetto positivo sul mantenimento del colore della frutta di

IV gamma nel tempo. L'analisi statistica effettuata è utile a dimostrare, tuttavia, la presenza dell'effetto sinergico di interazione nell'uso della combinazione di ultrasuoni e dipping.

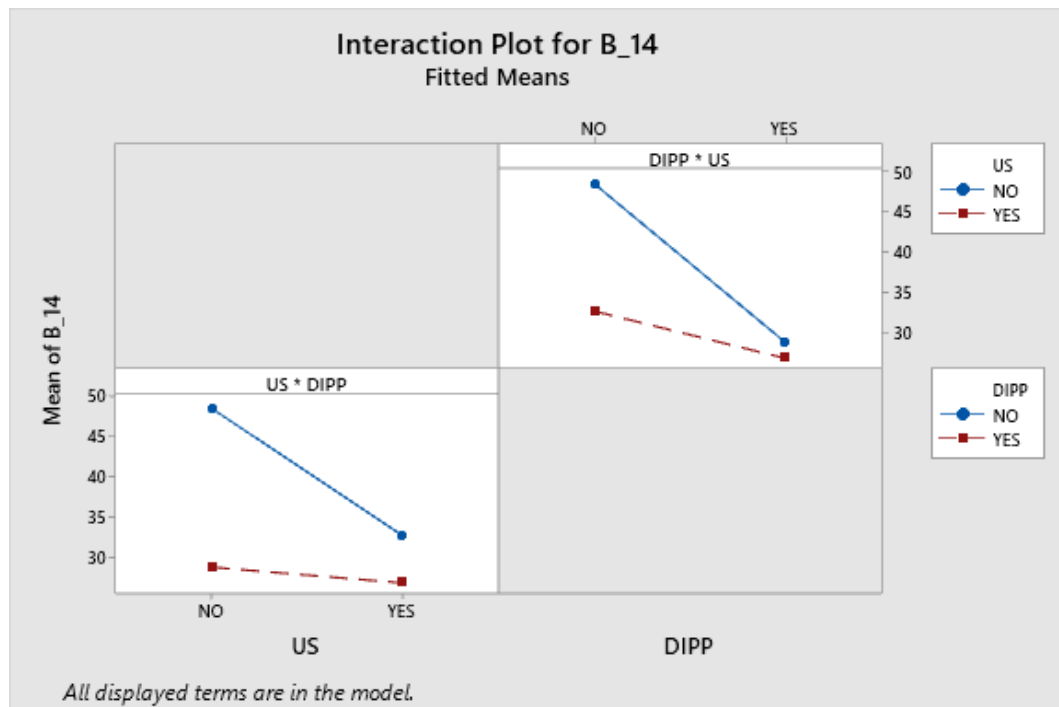


Fig. 12: Interaction plot per la risposta indice di imbrunimento dopo 14 giorni di conservazione.

3.2.2. Attività della polifenolossidasi

Per meglio comprendere il fenomeno è stato analizzato anche l'impatto dei fattori sull'enzima polifenolossidasi (PPO). Questo enzima è responsabile del processo biochimico che porta alla formazione di composti di melanina (Arnold & Gramza-Michałowska, 2022), la causa principale, della variazione di colore e dell'imbrunimento nelle mele.

Post-trattamento (fig. 13), i campioni sono tutti differenti in maniera statisticamente significativa ($p \leq 0.05$). La maggiore attività della PPO (tab. 6) si registra nel trattamento combinato, US*DIPP, con 30.2 ± 2.7 nmol/g, seguito dal dipping, ultrasuoni e controllo, con il valore più basso 7.0 ± 0.2 nmol/g. Dopo 7 giorni di conservazione i campioni presentano tutti un incremento dell'attività enzimatica, indipendentemente dal trattamento subito.

Tab. 6: Media + deviazione standard dei risultati dell'attività della polifenolossidasi in nmol/g.

Trattamento	T	Media	StDev	95% CI
CONTROLLO	0	7.0 ±0.2		(4.41; 9.64)
US	0	16.5 ±0.6		(13.93; 19.16)
US*DIPP	0	30.2 ±2.7		(27.54; 32.77)
DIPP	0	22.0 ±2.7		(19.40; 24.63)
CONTROLLO	7	26.1 ±0.1		(23.99; 28.31)
US	7	29.8 ±2.9		(27.61; 31.93)
US*DIPP	7	38.7 ±1.3		(36.52; 40.84)
DIPP	7	43.8 ±0.6		(41.63; 45.96)
CONTROLLO	14	18.5 ±1.3		(14.98; 22.12)
US	14	31.3 ±4.2		(27.76; 34.89)
US*DIPP	14	23.0 ±1.2		(19.48; 26.62)
DIPP	14	32.8 ±2.8		(29.21; 36.35)

La tabella riporta la media + ds dell'attività dell'enzima della polifenolossidasi nei campioni trattati e non (controllo=campione non trattato; US=campione trattato con ultrasuoni; US*DIPP=campione trattato con ultrasuoni e dipping; DIPP=campione immerso nel dipping), misurata immediatamente dopo il trattamento, e nei giorni 7 e 14 di conservazione.

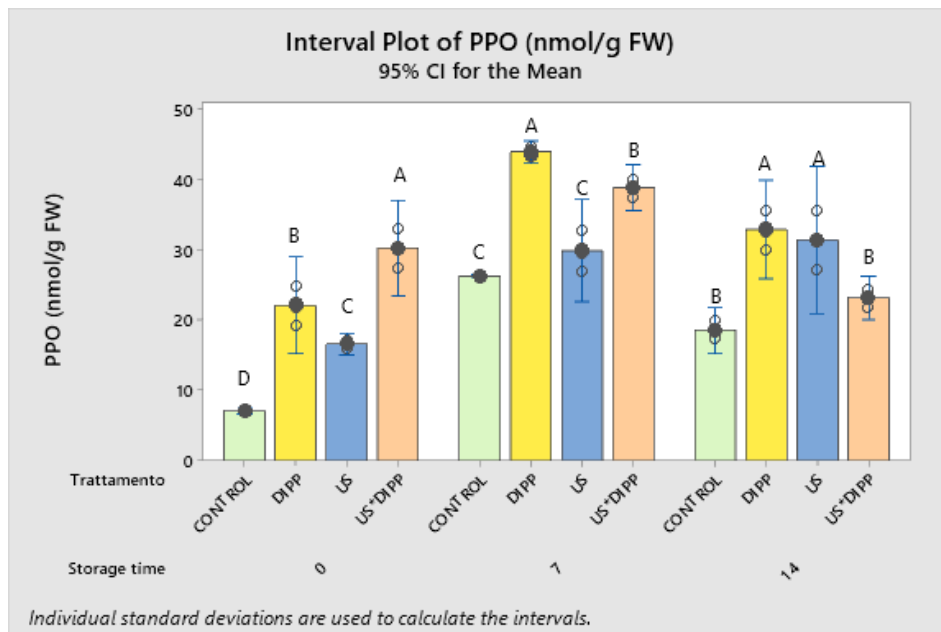


Fig. 13: Interval plot dei trattamenti nei diversi punti di controllo. A-D indicano differenze statisticamente significative ($p \leq 0.05$) tra i trattamenti allo stesso tempo di controllo (ANOVA-Tukey).

Il maggiore incremento si registra nel dipping, pari al 166%, seguito dal trattamento combinato e dagli ultrasuoni. I trattamenti sono differenti tra loro in maniera statisticamente significativa ($p \leq 0.05$), tranne ultrasuoni e controllo che non presentano differenza. Dopo 14 giorni di trattamento dipping e ultrasuoni presentano

L'attività maggiore e nessuna differenza significativa tra loro, così come il combinato con il campione non trattato.

Tab. 7: Analisi della varianza per la risposta polifenolossidasi dopo il trattamento.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	3	849.292	283.097	73.34	0.000
Linear	2	847.867	423.933	109.83	0.000
US	1	234.039	234.039	60.63	0.000
DIPP	1	613.828	613.828	159.03	0.000
2-Way Interactions	1	1.425	1.425	0.37	0.560
US*DIPP	1	1.425	1.425	0.37	0.560
Error	8	30.879	3.860		
Total	11	880.171			

US=Ultrasuoni; DIPP=Dipping; US*DIPP=Ultrasuoni più dipping. p-value ≤ 0.05 denota un effetto principale o una interazione statisticamente significativa dei fattori di processo.

L'analisi ANOVA degli effetti restituisce effetti significati del dipping e degli ultrasuoni ma non della loro interazione come si evince dalla tabella 7 e dal grafico di Pareto (fig. 14). I dati mostrano un effetto principale positivo e significativo ($p \leq 0.05$) dell'attività PPO al tempo 0 che comporta un aumento della variabile di risposta (tab. 8).

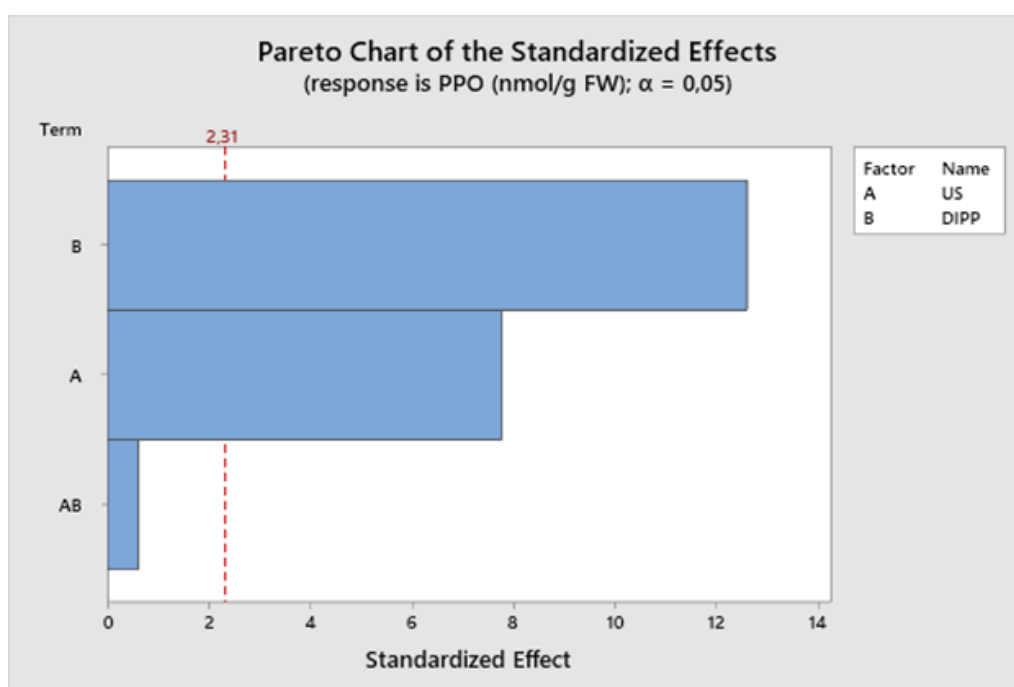


Fig. 14: Grafico di Pareto dei principali effetti sulla polifenolossidasi dopo il trattamento.

Tab. 8: Effetti stimati e coefficienti per la risposta polifenolossidasi dopo il trattamento.

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		18.935	0.567	33.39	0.000	
US	8.833	4.416	0.567	7.79	0.000	1.00
DIPP	14.304	7.152	0.567	12.61	0.000	1.00
US*DIPP	-0.689	-0.345	0.567	-0.61	0.560	1.00

Il segno che precede i valori in colonna “Effect” indica la direzione dell’effetto: – significa che in presenza del fattore la variabile dipendente diminuisce, + che in presenza del fattore la variabile aumenta. $p \leq 0.05$ indica che l’effetto principale o l’interazione sono statisticamente significativi.

La direzione degli effetti DIPP e US è positiva, nel senso che la loro presenza incrementa la risposta della variabile, come si evince anche dal normal plot degli effetti standardizzati in figura 15. L’effetto maggiore è dato dal dipping.

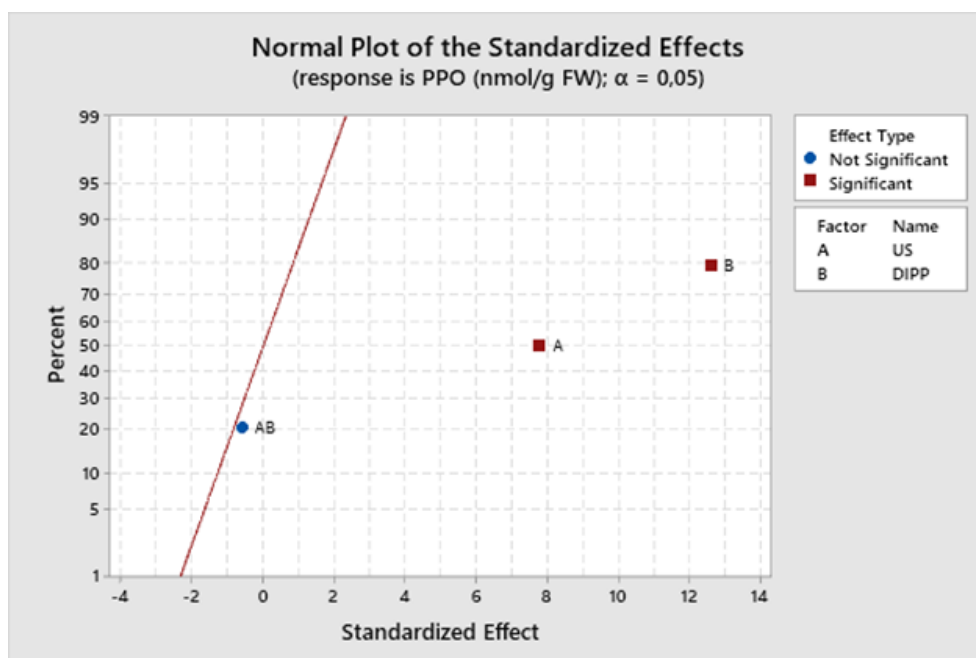


Fig. 15: Normal probability plot degli effetti standardizzati per la risposta polifenolossidasi dopo il trattamento.

Una spiegazione all’aumento dell’attività potrebbe essere data dalla presenza dell’1% p/p di CC nel DIPP, come precedentemente evidenziato in uno studio sulle fragole (Langer et al., 2019). Un aumento dell’attività PPO è stato rilevato nella frutta trattata con CC rispetto al campione non trattato subito dopo il trattamento (0 giorni). A 8 giorni a 4° C + 2 giorni a 20° C (8 + 2 giorni), i valori nei tessuti trattati sono diminuiti e hanno raggiunto livelli simili a quelli del controllo. Allo stesso modo, ma in misura minore, gli ultrasuoni stimolano ($p < 0.05$) l’attività della PPO. Gli ultrasuoni, infatti, a una certa frequenza possono indurre cambiamenti conformazionali che portano a un

aumento dell'attività enzimatica (Hang et al., 2017). In purea di avocado trattata a 20 kHz e 750 W/c² l'attività della polifenolossidasi è aumentata fino al 187% (Bi et al., 2015). Alcuni autori attribuiscono il fenomeno, in alcuni casi, ai parametri di processo impostati, quali la potenza > 200 W (Liu et al., 2017; Iqbal et al., 2020) Il grafico delle interazioni (fig. 16) non mostra esistenza di alcuna interazione tra i fattori. Le linee, infatti, si presentano in perfetto parallelismo tra loro. Pertanto, il trattamento combinato ha il livello più elevato di attività per mera somma degli effetti dei singoli fattori.



Fig. 16 Interaction plot degli effetti della polifenolossidasi dopo il trattamento.

Al 14° giorno di conservazione (tab. 9 e fig. 17), gli effetti principali non risultano statisticamente significativi. Si registra soltanto la significatività statistica ($p \leq 0.000$) dell'interazione tra i due fattori.

Tab. 9: Analisi della varianza dell'attività della polifenolossidasi dopo 14 giorni di conservazione.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	3	413.373	137.791	19.17	0.001
Linear	2	33.573	16.787	2.34	0.159
US	1	6.962	6.962	0.97	0.354
DIPP	1	26.611	26.611	3.70	0.091
2-Way Interactions	1	379.800	379.800	52.84	0.000
US*DIPP	1	379.800	379.800	52.84	0.000
Error	8	57.502	7.188		
Total	11	470.875			

US=Ultrasuoni; DIPP=Dipping; US*DIPP=Ultrasuoni più dipping. $p\text{-value} \leq 0.05$ denota un effetto principale o una interazione statisticamente significativa dei fattori di processo.

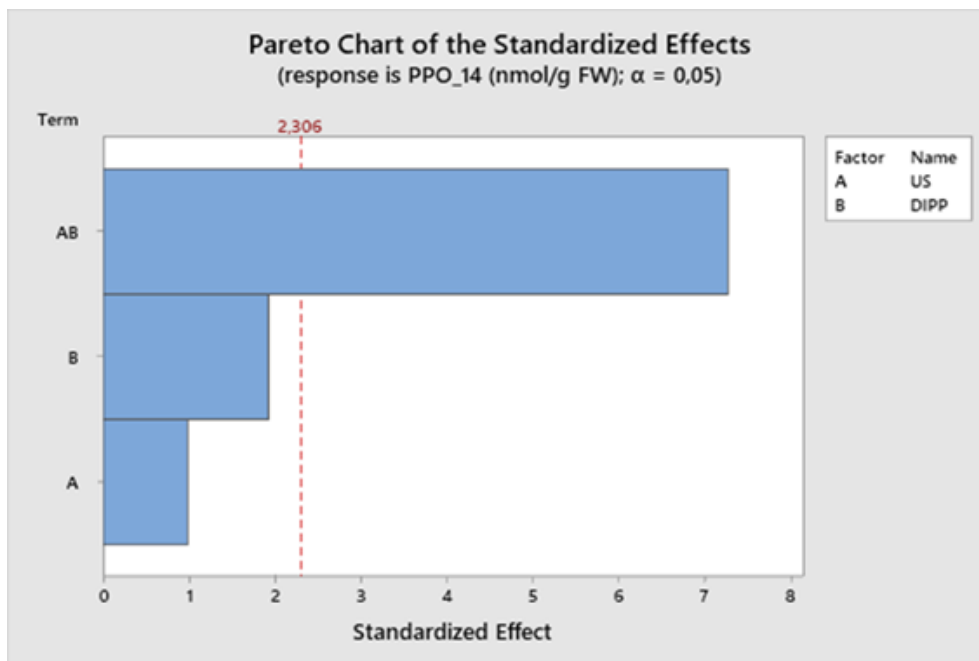


Fig. 17: Grafico di Pareto dei principali effetti e delle interazioni della risposta polifenolossidasi dopo 14 giorni di conservazione.

La direzione dei singoli fattori (come evidenziato nel post trattamento) è positiva ma non significativa dell'aumento dell'attività enzimatica (tab.10 e fig.18).

Tab.10 Effetti stimati e coefficienti per la risposta polifenolossidasi dopo 14 giorni di conservazione.

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		26.427	0.774	34.15	0.000	
US	1.523	0.762	0.774	0.98	0.354	1.00
DIPP	2.978	1.489	0.774	1.92	0.091	1.00
US*DIPP	-11.252	-5.626	0.774	-7.27	0.000	1.00

Il segno che precede i valori in colonna "Effect" indica la direzione dell'effetto: - significa che in presenza del fattore la variabile dipendente diminuisce, + che in presenza del fattore la variabile aumenta. $p \leq 0.05$ indica che l'effetto principale o l'interazione sono statisticamente significativi.

Si riconferma la tendenza, precedentemente registrato, di aumento dell'attività della polifenolossidasi in presenza dei fattori ultrasuoni o dipping, sebbene tale aumento non risulti più statisticamente significativo. Si evidenzia, piuttosto, la significatività dell'interazione tra i fattori ($p \leq 0.05$).

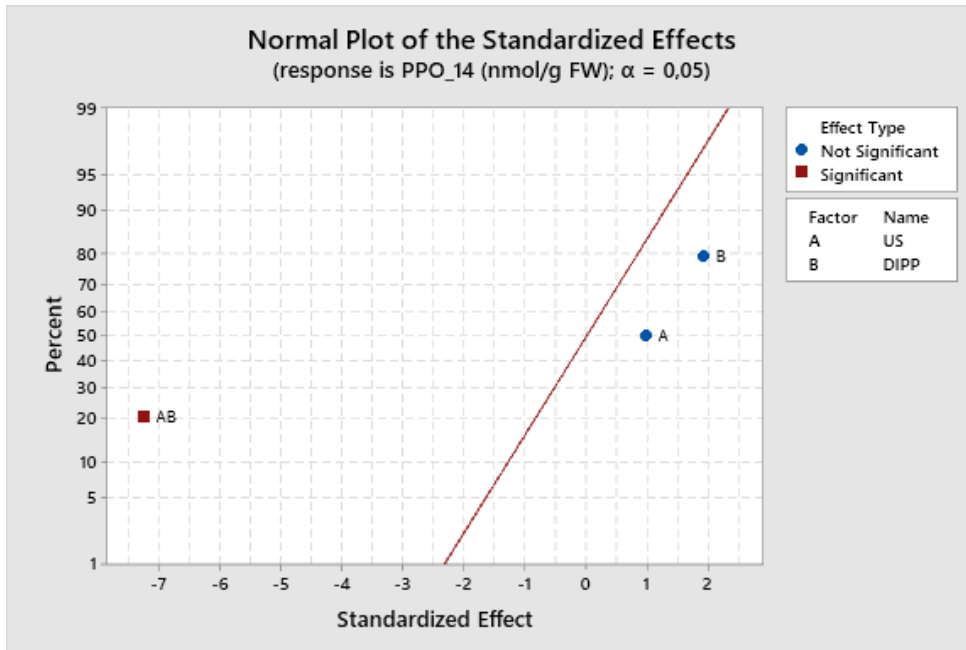


Fig. 18: Normal probability plot degli effetti standardizzati per la risposta polifenolossidasi dopo 14 giorni di conservazione.

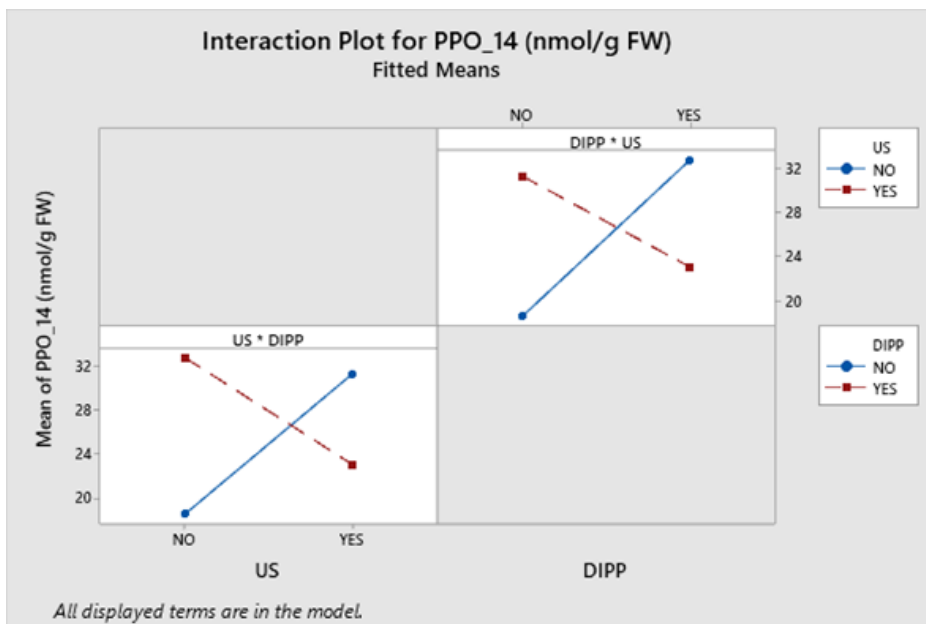


Fig. 19: Interaction plot dei fattori per la risposta polifenolossidasi dopo 14 giorni di conservazione.

Dall'analisi del grafico delle interazioni si evince un'interazione di tipo antagonistico: entrambi i fattori influenzano la risposta nella stessa direzione, sebbene DIPP sia associato a un aumento dell'attività solo in assenza di US e viceversa. Pertanto, se

l'applicazione dei trattamenti singolarmente determina un aumento dell'attività della PPO, la presenza di entrambi i trattamenti diminuisce l'attività della PPO dopo 14 giorni di conservazione. In letteratura sono riportati risultati simili ottenuti dalla combinazione tra AsA e US. Il trattamento di US e AsA combinato è stato notevolmente efficace nel disattivare PPO, mentre l'applicazione individuale di ultrasuoni o acido ascorbico non ha inattivato gli enzimi (Jang & Moon, 2011). Questo effetto è stato riscontrato (Xu et al., 2022) anche sulle patate trattate con acido ascorbico 0,2 % e ultrasuoni (40 kHz, 200 W, 3 min).

3.2.3. Resistenza alla compressione

Per valutare gli effetti dei parametri di processo sulla consistenza della mela, è stata considerata la resistenza alla compressione misurata in Newton (N). In tab.11 è possibile notare un calo della resistenza alla compressione da parte dei campioni non trattati o trattati con ultrasuoni e dipping in combinazione. Al contrario, si registra un aumento della resistenza dei campioni trattati in immersione (+31.18% dopo 14 giorni di conservazione). Il confronto tra i trattamenti (fig. 20) ai diversi punti di controllo (0, 7 e 14), tuttavia, mostra solamente una differenza significativa ($p \leq 0.05$) tra il campione non trattato e i campioni sottoposti a trattamento al tempo 0. Questa differenza non si evince né al 7°, né al 14° giorno dal trattamento.

Tab. 11: Media + deviazione standard dei risultati resistenza alla compressione in Newton.

Trattamento	T	Media	StDev	95% CI
CONTROLLO	0	27.4 ±1.5		(24.87; 29.87)
US	0	23.2 ±0.9		(20.73; 25.73)
US*DIPP	0	21.2 ±2.8		(18.66; 23.66)
DIPP	0	18.6 ±1.8		(16.06; 21.07)
CONTROLLO	7	23.1 ±2.4		(20.27; 25.93)
US	7	20.4 ±2.3		(17.52; 23.17)
US*DIPP	7	20.0 ±0.9		(17.18; 22.84)
DIPP	7	22.5 ±2.5		(19.66; 25.31)
CONTROLLO	14	17.2 ±2.8		(12.39; 22.00)
US	14	17.9 ±2.1		(13.08; 22.70)
US*DIPP	14	21.2 ±3.5		(16.40; 26.02)
DIPP	14	24.4 ±5.2		(19.58; 29.19)

La tabella riporta la media + ds della resistenza alla compressione nei campioni trattati e non (controllo=campione non trattato; US=campione trattato con ultrasuoni; US*DIPP=campione trattato con ultrasuoni e dipping; DIPP=campione immerso nel dipping), misurata immediatamente dopo il trattamento, e nei giorni 7 e 14 di conservazione.

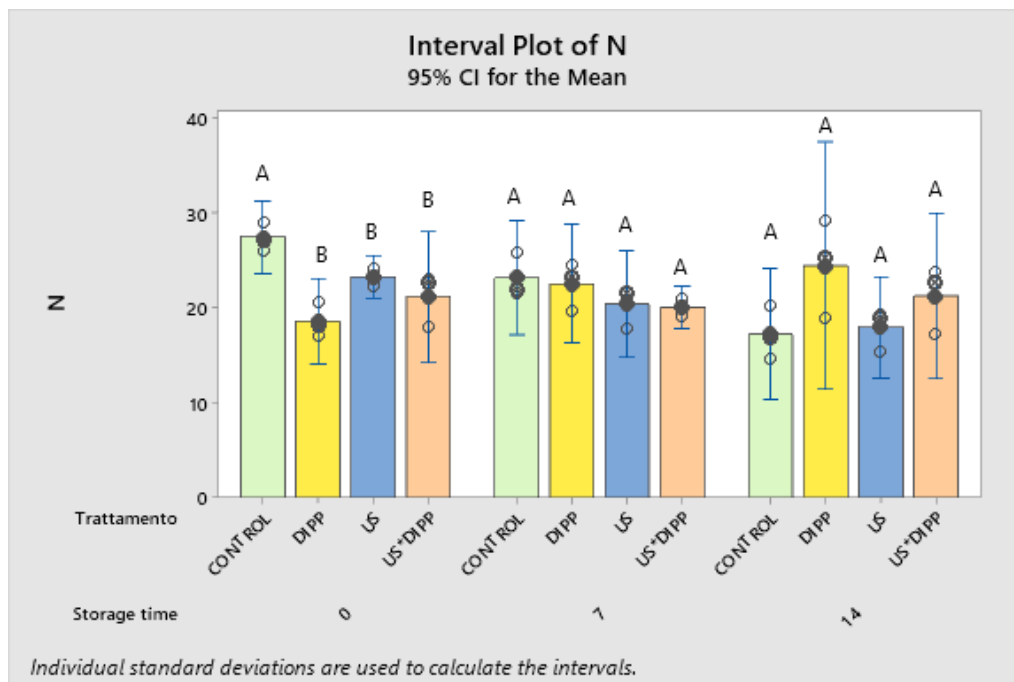


Fig. 20: Interval plot dei trattamenti nei diversi punti di controllo. A-B indicano differenze statisticamente significative ($p \leq 0.05$) tra i trattamenti allo stesso tempo di controllo (ANOVA-Tukey).

L'analisi fattoriale a due vie mostra che il giorno del trattamento, DIPP ha un effetto negativo significativo ($p \leq 0.001$) (Tab. 12). Tale significatività, seppur in misura minore, si riscontra anche nell'interazione tra i fattori, come si evince anche dal grafico di Pareto (fig. 21).

Tab. 12: Analisi della varianza per la risposta resistenza alla compressione dopo il trattamento.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	3	124.572	41.524	11.75	0.003
Linear	2	90.528	45.264	12.81	0.003
US	1	1.802	1.802	0.51	0.495
DIPP	1	88.726	88.726	25.11	0.001
2-Way Interactions	1	34.044	34.044	9.64	0.015
US*DIPP	1	34.044	34.044	9.64	0.015
Error	8	28.263	3.533		
Total	11	152.835			

US=Ultrasuoni; DIPP=Dipping; US*DIPP=Ultrasuoni più dipping. p-value ≤ 0.05 denota un effetto principale o una interazione statisticamente significativa dei fattori di processo.

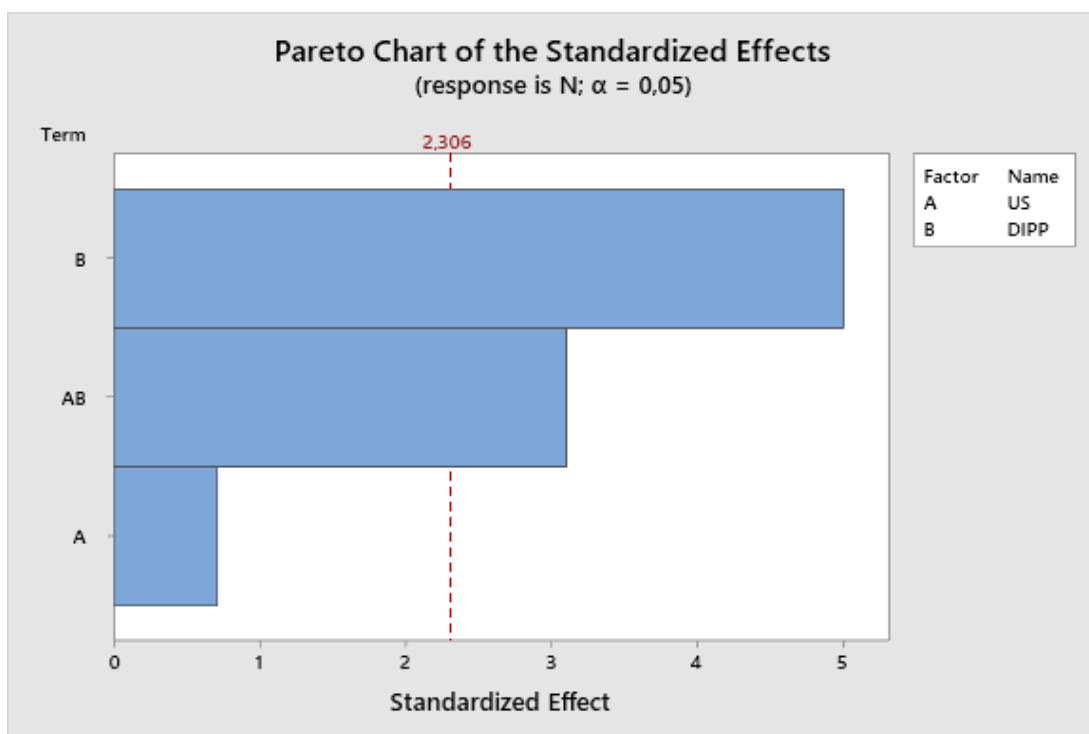


Fig. 21: Grafico di Pareto dei principali effetti e delle interazioni della risposta resistenza alla compressione dopo il trattamento.

L’immersione della mela in AsA e CC per un tempo di 3 minuti diminuisce la resistenza alla compressione subito dopo il trattamento. Non si riscontra alcun effetto significativo con gli US ($p \geq 0.495$)

Tab. 13: Effetti stimati e coefficienti per la risposta resistenza alla compressione dopo il trattamento.

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		22.581	0.543	41.62	0.000	
US	-0.775	-0.387	0.543	-0.71	0.495	1.00
DIPP	-5.438	-2.719	0.543	-5.01	0.001	1.00
US*DIPP	3.369	1.684	0.543	3.10	0.015	1.00

Il segno che precede i valori in colonna “Effect” indica la direzione dell’effetto: – significa che in presenza del fattore la variabile dipendente diminuisce, + che in presenza del fattore la variabile aumenta. $p \leq 0.05$ indica che l’effetto principale o l’interazione sono statisticamente significativi.

La direzione degli effetti e la loro significatività è visibile anche sul grafico degli effetti standardizzati (fig. 22). Vale la pena, far notare come in un’analisi a una via di confronto tra i trattamenti, l’unica differenza significativa era quella che emergeva tra il campione non trattato e il resto dei campioni. In questo caso emergono informazioni

interessanti e utili a comprendere il peso che i singoli fattori esercitano sulla variabile dipendente di risposta.

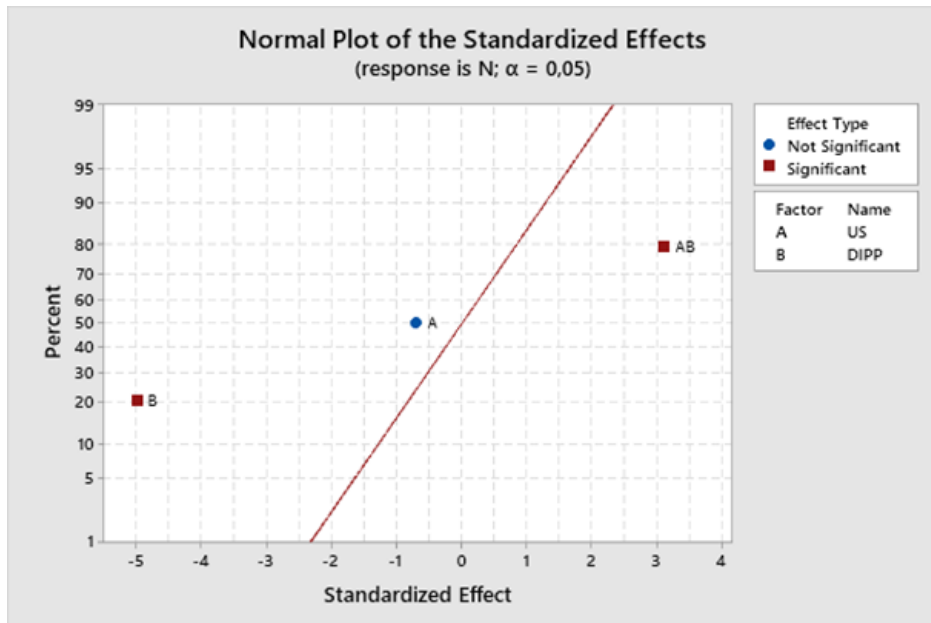


Fig. 22: Normal probability plot degli effetti standardizzati per la risposta resistenza alla compressione dopo il trattamento

In fig. 23 è analizzato il trattamento combinato nel dettaglio e l'interazione significativa tra i fattori

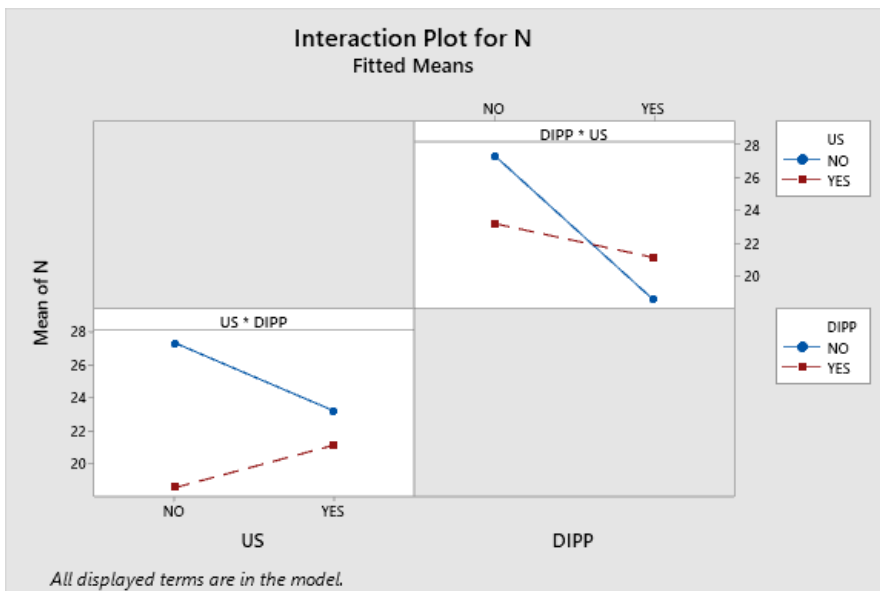


Fig. 23 Interaction plot dei fattori per la risposta resistenza alla compressione dopo il trattamento.

Da una parte l'effetto negativo del dipping sulla fermezza della mela comporta un effetto buffering sugli ultrasuoni. Il combinato US*DIPP, di fatto, abbassa il livello

della risposta rispetto al trattamento con gli ultrasuoni semplici. Tale interazione, tuttavia, potrebbe anche essere interpretata come la capacità degli ultrasuoni di attenuare l'effetto negativo del dipping. Dopo 14 giorni di conservazione, la situazione sembra capovolgersi. Dall'analisi della varianza (tab. 14) emerge ancora un effetto significativo per il DIPP ($p \leq 0.05$) a differenza dell'interazione tra fattori (trattamento combinato) che perde di significatività statistica, come mostra anche il grafico di Pareto (fig. 24).

Tab. 14: Analisi della varianza per la risposta resistenza alla compressione dopo 14 giorni di conservazione.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	3	98.743	32.914	2.52	0.131
Linear	2	87.514	43.757	3.36	0.087
US	1	4.595	4.595	0.35	0.569
DIPP	1	82.919	82.919	6.36	0.036
2-Way Interactions	1	11.229	11.229	0.86	0.381
US*DIPP	1	11.229	11.229	0.86	0.381
Error	8	104.327	13.041		
Total	11	203.070			

US=Ultrasuoni; DIPP=Dipping; US*DIPP=Ultrasuoni più dipping. p-value ≤ 0.05 denota un effetto principale o una interazione statisticamente significativa dei fattori di processo.

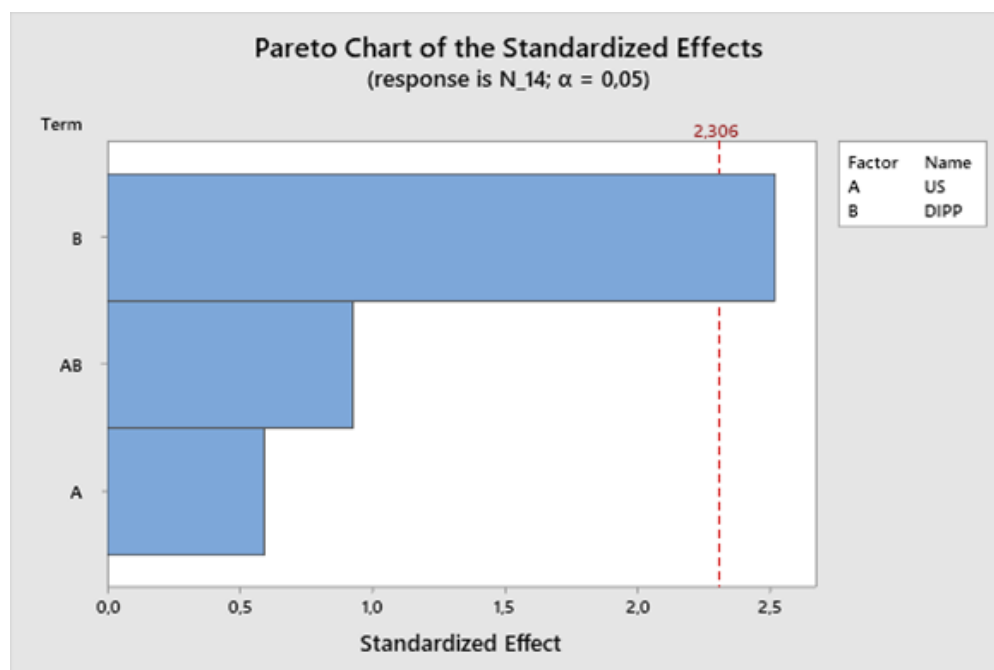


Fig. 24: Grafico di Pareto dei principali effetti e delle interazioni della risposta resistenza dopo 14 giorni di conservazione.

Un'analisi dettagliata (tab. 15 e fig. 25) mostra che l'effetto del dipping è totalmente cambiato. Le mele trattate con soluzione a base di AsA 2% e CC 1% hanno una

maggiore fermezza dopo 14 giorni di conservazione e una maggiore resistenza alla compressione rispetto ad altri campioni. Nessun effetto si riscontra nell'uso di ultrasuoni.

Tab. 15 Effetti stimati e coefficienti per la risposta resistenza alla compressione dopo 14 giorni di conservazione.

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		20.17	1.04	19.35	0.000	
US	-1.24	-0.62	1.04	-0.59	0.569	1.00
DIPP	5.26	2.63	1.04	2.52	0.036	1.00
US*DIPP	-1.93	-0.97	1.04	-0.93	0.381	1.00

Il segno che precede i valori in colonna "Effect" indica la direzione dell'effetto: - significa che in presenza del fattore la variabile dipendente diminuisce, + che in presenza del fattore la variabile aumenta. $p \leq 0.05$ indica che l'effetto principale o l'interazione sono statisticamente significativi.

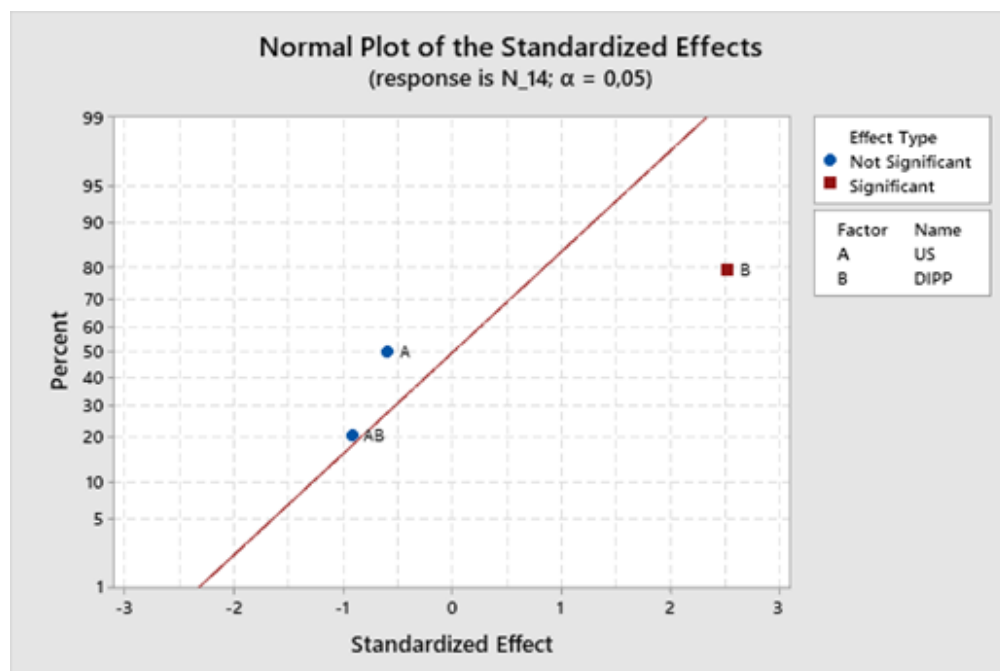


Fig. 25: Normal probability plot degli effetti standardizzati per la risposta resistenza dopo 14 giorni di conservazione.

L'interazione non è più significativa. Tuttavia, l'analisi del grafico (fig. 26) delle interazioni mostra un cambiamento nelle relazioni tra i fattori rispetto all'analisi effettuata nel post trattamento.

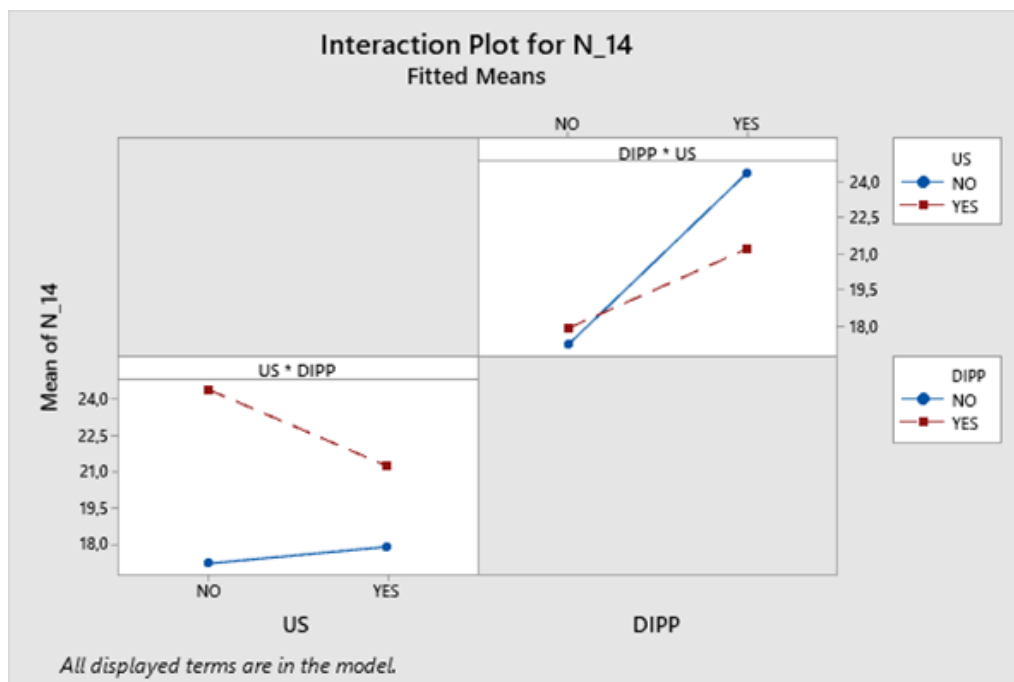


Fig.

26: Interaction plot dei fattori per la risposta resistenza alla compressione dopo 14 giorni di conservazione.

Emerge da una parte un effetto sinergico del dipping sugli ultrasuoni. Il livello più alto di DIPP, in combinazione, migliora l'effetto degli US sulla resistenza alla compressione (N). Dall'altra parte, abbiamo un effetto buffering degli ultrasuoni sul dipping. Tale inversione di tendenza nella mela, osservata tra il giorno 0 e il giorno 14 post trattamento, potrebbe essere dovuta al fatto che, il giorno del trattamento, non sono ancora evidenti gli effetti negativi dell'uso di US. Tali effetti sono stati ampiamente riportati in letteratura; quali l'effetto spugna e/o la formazione di microcanali (Rajewska & Mierzwa, 2017) con il conseguente indebolimento dei legami intercellulari. Gli ultrasuoni potrebbero, tuttavia, durante e immediatamente dopo il trattamento, aver favorito o accelerato l'assorbimento dell'AsA e, in particolare, del CC. Nel frutto del giuggiolo la combinazione di CC e ultrasuoni ha prolungato la conservabilità del frutto facilitando l'assorbimento di Ca^{2+} e stabilizzando la struttura della parete cellulare (Zhi et al., 2017). Analogamente, dopo 14 giorni diventano più evidenti gli effetti positivi del dipping a base di calcio (Giacalone et al., 2018) che, una volta adeguatamente assorbito, seppur con diversa cinetica di assorbimento rispetto al trattamento combinato US*DIPP, inibisce l'attività

della poligalatturonasi (Guo et al., 2023), enzima responsabile della degradazione delle pectine, rallentando così il processo di senescenza e rammollimento.

3.2.4. Contenuto di acido ascorbico

L'acido ascorbico è una misura del valore nutrizionale della frutta (Lee e Kader 2000). La sua azione inibitoria verso la PPO è stata attribuita alla riduzione degli o-chinoni (prodotti dalla reazione di ossidazione enzimatica) in o-difenoli, ritardando la biosintesi dei composti bruni (Walker, 1977).

Tab. 16 Media + deviazione standard dei risultati del contenuto in acido ascorbico in mg/100g.

Trattamento	T	Media	StDev	95% CI
CONTROLLO	0	2.3 ±0.1		(1.96; 2.70)
ULTRASUONI	0	2.0 ±0.2		(1.63; 2.38)
US*DIPP	0	0.28 ±0.03		(0.08; 0.66)
DIPPING	0	5.0 ±0.5		(4.59; 5.34)
CONTROLLO	7	1.9 ±0.1		(1.71; 2.17)
ULTRASUONI	7	1.9 ±0.2		(1.71; 2.18)
US*DIPP	7	0.6 ±0.1		(0.38; 0.84)
DIPPING	7	6.3 ±0.3		(6.05; 6.51)
CONTROLLO	14	3.8 ±0.1		(3.37; 4.28)
ULTRASUONI	14	4.9 ±0.3		(4.41; 5.32)
US*DIPP	14	0.60 ±0.01		(0.05; 1.16)
DIPPING	14	5.3 ±0.5		(4.89; 5.79)

La tabella riporta la media + ds del contenuto in acido ascorbico nei campioni trattati e non (controllo=campione non trattato; US=campione trattato con ultrasuoni; US*DIPP=campione trattato con ultrasuoni e dipping; DIPP=campione immerso nel dipping), misurata immediatamente dopo il trattamento, e nei giorni 7 e 14 di conservazione.

Se analizziamo i dati (tab. 16), l'ANOVA a una via restituisce una differenza significativa tra i trattamenti nei tre punti di controllo. In particolare, post trattamento il test di Tukey (fig. 27) evidenzia una differenza tra il DIPP, che presenta il contenuto più elevato di acido ascorbico 5.0 ± 0.5 (più del doppio del controllo), il controllo e gli US (nessuna differenza significativa tra loro) e il trattamento combinato, DIPP*US, con i valori nettamente più bassi 0.28 ± 0.03 .

Questa tendenza di conferma dopo 7 giorni di conservazione, con lieve modifica nel 14° giorno dove gli US e il DIPP non presentano alcuna differenza significativa tra loro, ma solo rispetto al campione non trattato e al combinato. Il DIPP, dopo un picco raggiunto a 7 giorni di conservazione mostra un calo del 15,87%.

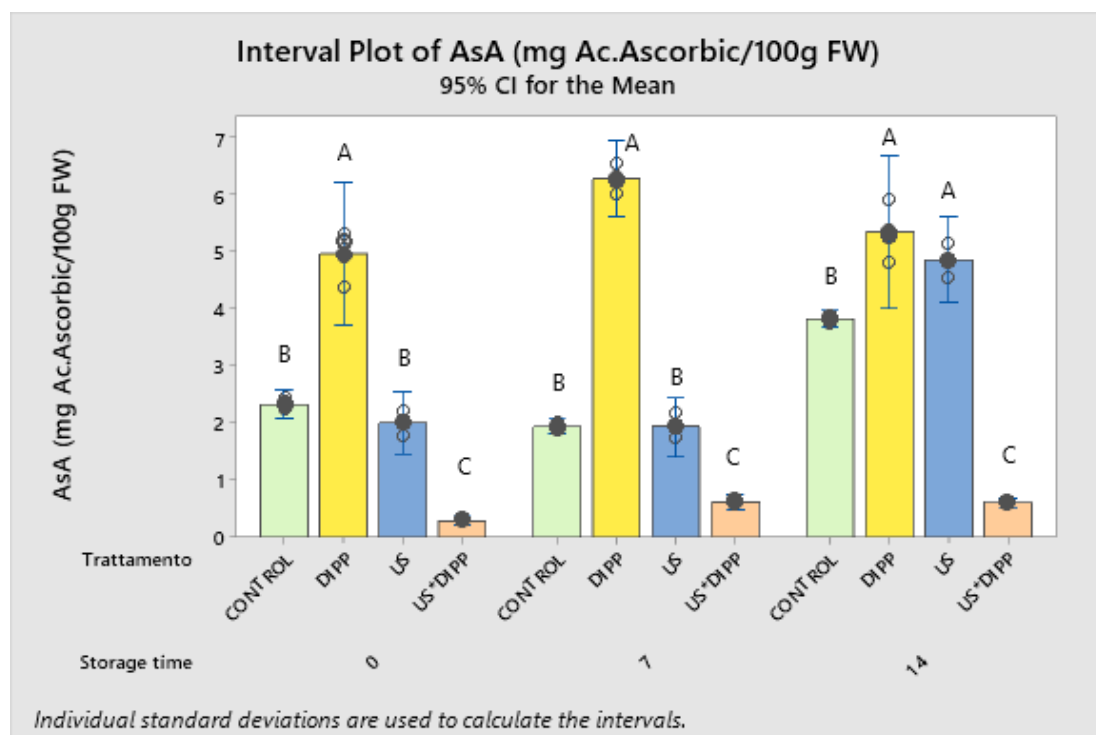


Fig. 27: Interval plot dei trattamenti nei diversi punti di controllo. A-C indicano differenze statisticamente significative ($p \leq 0.05$) tra i trattamenti allo stesso tempo di controllo (ANOVA-Tukey).

Tab. 17: Analisi della varianza per la risposta acido ascorbico dopo il trattamento.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	3	33.5911	11.1970	142.97	0.000
Linear	2	19.3884	9.6942	123.78	0.000
US	1	18.7566	18.7566	239.50	0.000
DIPP	1	0.6318	0.6318	8.07	0.022
2-Way Interactions	1	14.2027	14.2027	181.35	0.000
US*DIPP	1	14.2027	14.2027	181.35	0.000
Error	8	0.6265	0.0783		
Total	11	34.2176			

US=Ultrasuoni; DIPP=Dipping; US*DIPP=Ultrasuoni più dipping. $p\text{-value} \leq 0.05$ denota un effetto principale o una interazione statisticamente significativa dei fattori di processo.

L'analisi della varianza (tab. 17) e il grafico di Pareto (fig. 28) mostrano effetti principali significativi dei fattori di processo, DIPP e US, e della loro interazione US*DIPP. È opportuno, pertanto, approfondire la grandezza e la direzione degli effetti post trattamento

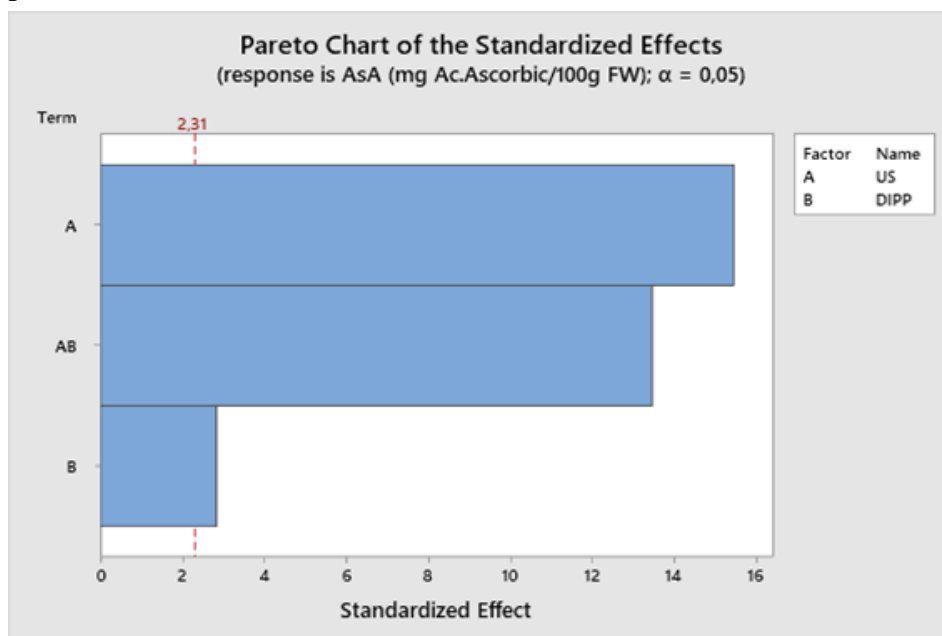


Fig. 28: Grafico di Pareto dei principali effetti e delle interazioni della risposta contenuto in acido ascorbico nel campione post trattamento.

attraverso la tabella (tab. 18) degli effetti stimati e dei coefficienti e il normal plot degli effetti standardizzati (fig. 29).

Tab. 18 Effetti stimati e coefficienti per la risposta acido ascorbico dopo il trattamento

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		2.3979	0.0808	29.68	0.000	
US	-2.5004	-1.2502	0.0808	-15.48	0.000	1.00
DIPP	0.4589	0.2294	0.0808	2.84	0.022	1.00
US*DIPP	-2.1758	-1.0879	0.0808	-13.47	0.000	1.00

Il segno che precede i valori in colonna "Effect" indica la direzione dell'effetto: - significa che in presenza del fattore la variabile dipendente diminuisce, + che in presenza del fattore la variabile aumenta. $p \leq 0.05$ indica che l'effetto principale o l'interazione sono statisticamente significativi.

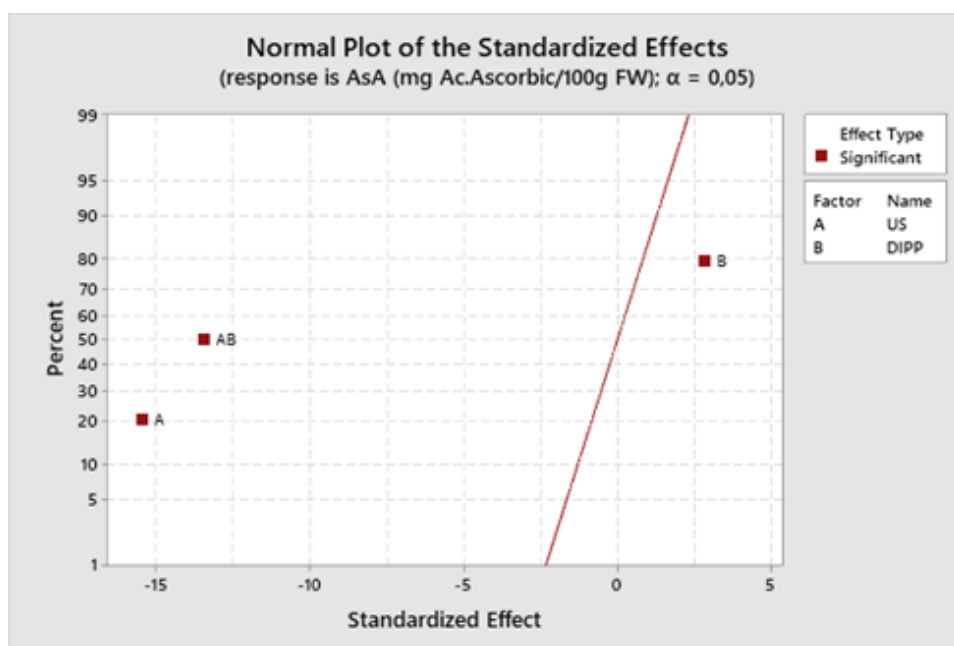


Fig. 29: Normal probability plot degli effetti standardizzati per la risposta contenuto in acido ascorbico dopo il trattamento

Emerge chiaramente un effetto positivo sulla risposta contenuto in AsA del fattore DIPP, in linea con la precedente analisi a una via. Tale effetto si giustifica con l'aggiunta esogena dell'acido ascorbico al campione, in soluzione. In uno studio, il contenuto di AsA dei campioni immersi in acido ascorbico era circa 20 volte superiore rispetto ai campioni non trattati all'inizio della conservazione, e rimaneva più elevato fino al sesto giorno di refrigerazione (Cocci et al., 2006), dato che si riflette anche nei campioni oggetto di questo esperimento. D'altra parte, gli US hanno un effetto negativo e presentano una magnitudine maggiore rispetto al precedente fattore. Se applicati, riducono l'AsA endogeno della mela (Ordonez-Santos et al., 2017). Questo esito è stato attribuito alla formazione di radicali liberi per effetto degli ultrasuoni (Lešková et al., 2006) e al processo di ossidazione dell'AsA, in funzione di agente riducente, e alla conseguente formazione di acido deidroascorbico. Anche la combinazione di trattamenti ha una significativa interazione. Se esaminiamo nel dettaglio il grafico delle interazioni (fig. 30), si nota come l'introduzione degli ultrasuoni comporti un effetto buffering sul DIPP, che porta a una riduzione drastica dei livelli di AsA (endogeno ed esogeno).

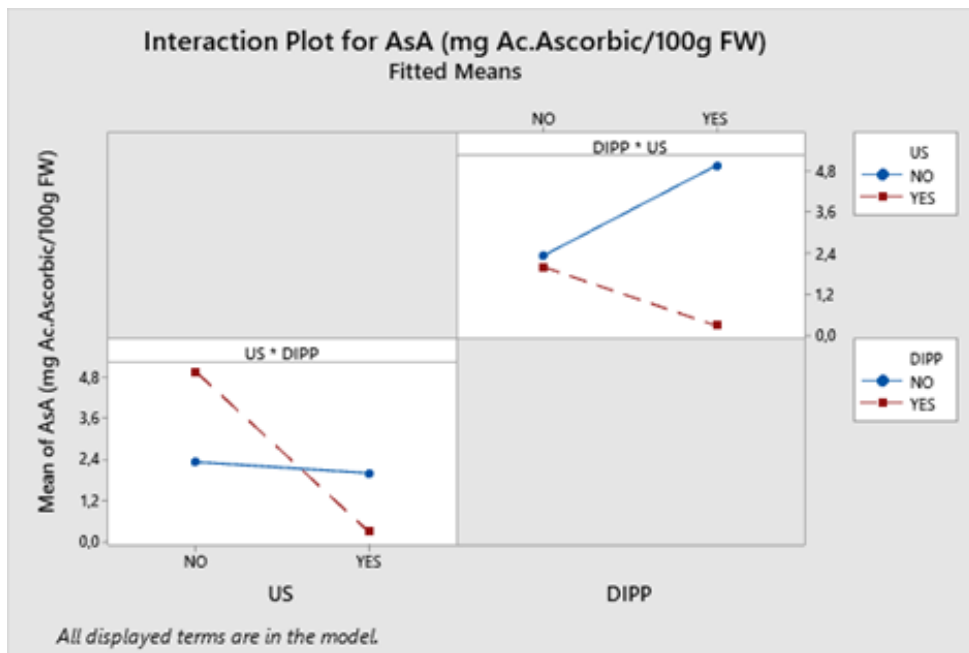


Fig. 30: Interaction plot dei fattori per la risposta contenuto in acido ascorbico dopo il trattamento.

La degradazione dell'acido ascorbico è altresì influenzata da temperatura, luce, livello di ossigeno disciolto e pH (Roig et al., 1995). CC combinato con ultrasuoni potrebbe aver influenzato il pH del solvente. In uno studio condotto su succo d'arancia trattato con ultrasuoni (US) e cloruro di calcio per 10 minuti, il campione ha mostrato una diminuzione di quasi il 50% di AsA rispetto al controllo (Gomez-Lopez et al. 2010).

Dopo 14 giorni di conservazione, tutti i fattori rimangono significativi compresa la loro combinazione (tab. 19 e fig. 31).

Tab. 19 Analisi della varianza per la risposta acido ascorbico dopo 14 giorni di conservazione.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	3	30.7392	10.2464	92.81	0.000
Linear	2	12.7919	6.3960	57.94	0.000
US	1	9.1347	9.1347	82.74	0.000
DIPP	1	5.0013	5.0013	45.30	0.000
2-Way Interactions	1	22.2308	22.2308	201.37	0.000
US*DIPP	1	22.2308	22.2308	201.37	0.000
Error	7	0.7728	0.1104		
Total	10	31.5119			

US=Ultrasuoni; DIPP=Dipping; US*DIPP=Ultrasuoni più dipping. p-value ≤ 0.05 denota un effetto principale o una interazione statisticamente significativa dei fattori di processo.

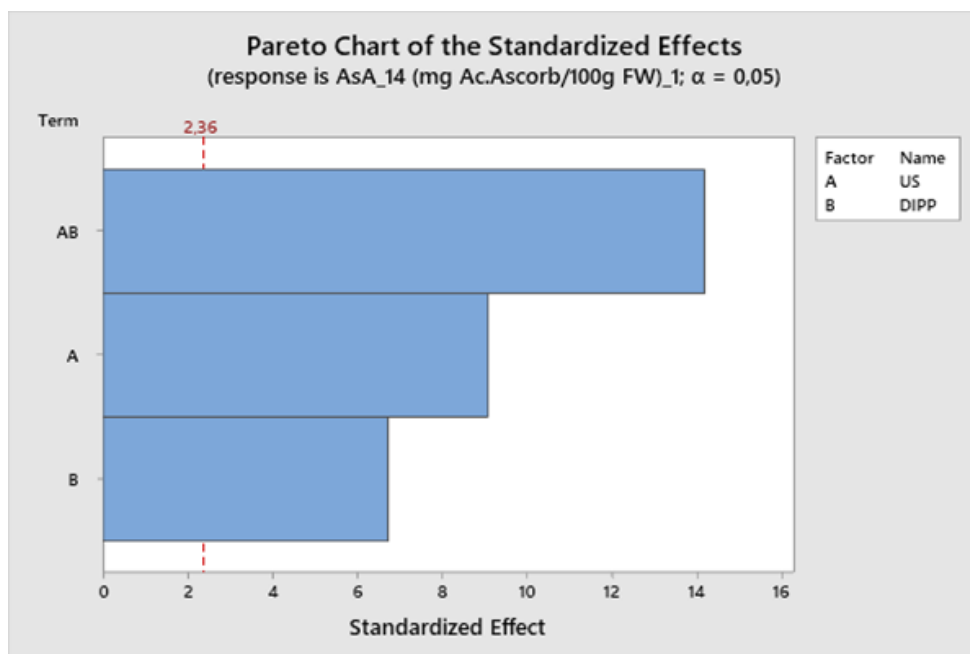


Fig. 31: Grafico di Pareto dei principali effetti e delle interazioni della risposta contenuto in acido ascorbico nel campione dopo 14 giorni di conservazione.

L'analisi, tuttavia, sulla direzione degli effetti e sulla loro grandezza (tab. 20 e fig. 32), mostra un cambiamento negli effetti del DIPP. La presenza del dipping dopo 14 giorni di conservazione non incrementa più la risposta nel contenuto di AsA, piuttosto comporta una riduzione.

Tab. 20: Effetti stimati e coefficienti per la risposta contenuto in acido ascorbico dopo 14 giorni di conservazione.

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		3.660	0.102	35.98	0.000	
US	-1.851	-0.925	0.102	-9.10	0.000	1.02
DIPP	-1.369	-0.685	0.102	-6.73	0.000	1.02
US*DIPP	-2.887	-1.444	0.102	-14.19	0.000	1.02

Il segno che precede i valori in colonna "Effect" indica la direzione dell'effetto: - significa che in presenza del fattore la variabile dipendente diminuisce, + che in presenza del fattore la variabile aumenta. $p \leq 0.05$ indica che l'effetto principale o l'interazione sono statisticamente significativi.

L'effetto risulta minore rispetto a quello dovuto all'applicazione degli ultrasuoni. L'analisi dell'interazione ci chiarisce il comportamento negativo della combinazione dei due fattori.

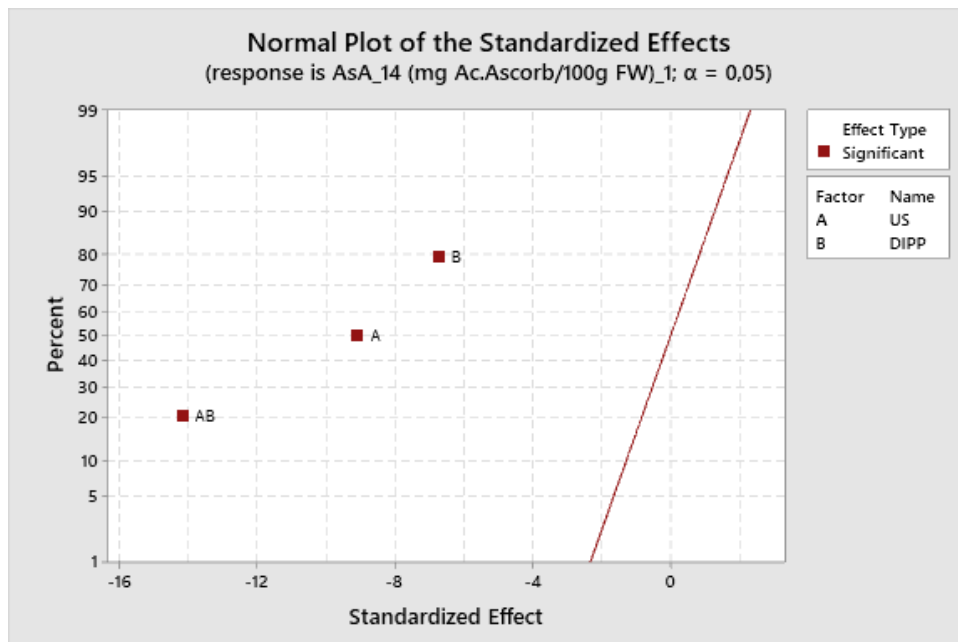


Fig. 32: Normal probability plot degli effetti standardizzati per la risposta contenuto in acido ascorbico dopo 14 giorni dal trattamento.

Il grafico delle interazioni (fig. 33) mostra, rispetto al post trattamento, una relazione antagonista tra i fattori laddove entrambi i predittori hanno un effetto sull'acido ascorbico che va nella stessa direzione (aumento della risposta) solo in assenza dell'altro fattore.

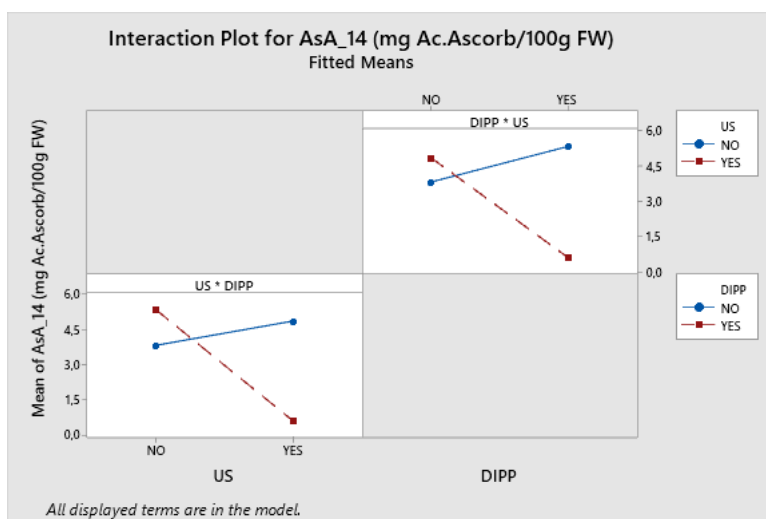


Fig. 33 Interaction plot dei fattori per la risposta acido ascorbico dopo 14 giorni di conservazione.

La combinazione, invece, attenua gli effetti e diminuisce drasticamente il contenuto.

3.2.5. Conta microbica totale

Per valutare un aspetto importante della qualità, la sicurezza alimentare, sono state eseguite analisi della conta microbica totale (CMT) sulla mela post trattamento e dopo 7 e 14 giorni di conservazione. Dalle analisi emerge (tab. 21) una differenza significativa tra i campioni trattati, già a giorno 0, post trattamento. Il campione trattato con ultrasuoni presenta livelli CMT di elevati.

Tab. 21: Media + deviazione standard dei risultati per carica microbica totale in Log UFC/g..

Trattamento	T	Media	StDev	95% CI
CONTROLLO	0	1.16 ±0.27		(0.54; 1.78)
ULTRASUONI	0	3.93 ±0.20		(3.31; 4.55)
US*DIPP	0	2.04 ±0.43		(1.41; 2.66)
DIPPING	0	2.96 ±0.76		(2.33; 3.58)
CONTROLLO	7	3.42 ±0.74		(2.50; 4.34)
ULTRASUONI	7	5.23 ±0.65		(4.31; 6.15)
US*DIPP	7	2.24 ±0.46		(1.32; 3.16)
DIPPING	7	3.15 ±0.85		(2.23; 4.07)
CONTROLLO	14	3.87 ±0.85		(3.13; 4.60)
ULTRASUONI	14	6.53 ±0.34		(5.80; 7.26)
US*DIPP	14	2.71 ±0.36		(1.98; 3.44)
DIPPING	14	3.54 ±0.49		(2.81; 4.27)

La tabella riporta la media + ds della carica microbica totale nei campioni trattati e non (controllo=campione non trattato; US=campione trattato con ultrasuoni; US*DIPP=campione trattato con ultrasuoni e dipping; DIPP=campione immerso nel dipping), misurata immediatamente dopo il trattamento, e nei giorni 7 e 14 di conservazione.

Seguono DIPP e trattamento combinato US*DIPP. Il controllo, probabilmente anche grazie alla minore esposizione ambientale (taglio e conservazione in busta) è quello che presenta livelli significativamente minori ($p \leq 0.05$) rispetto agli altri campioni (fig. 34).

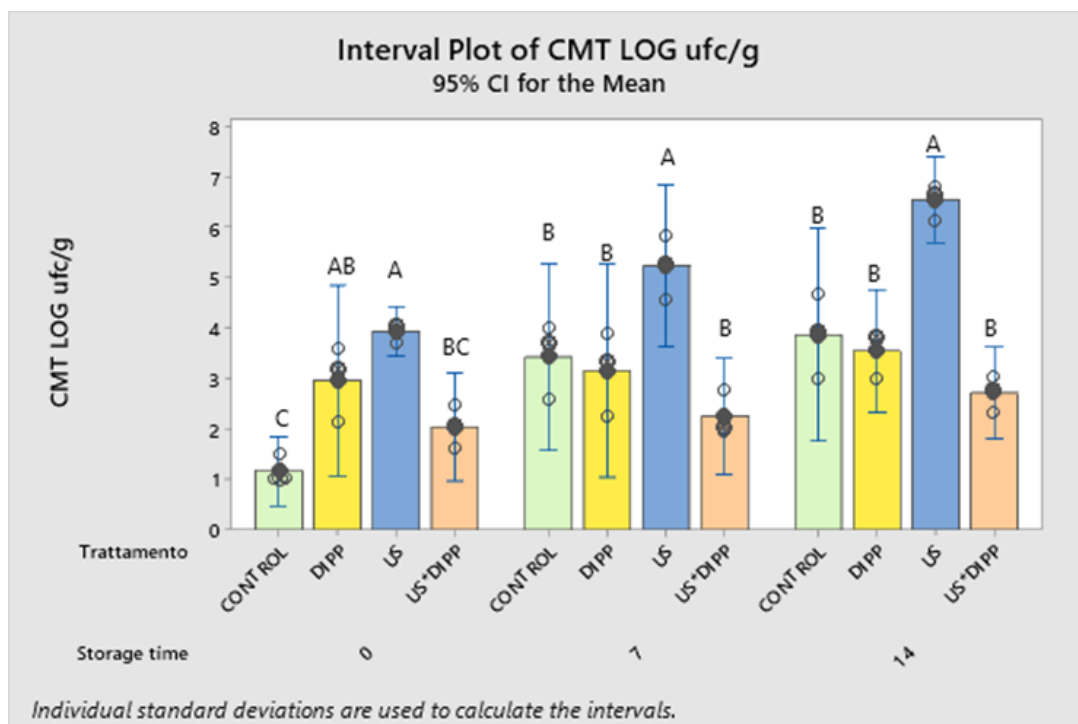


Fig. 34: Interval plot dei trattamenti nei diversi punti di controllo. A-C indicano differenze statisticamente significative ($p \leq 0.05$) tra i trattamenti allo stesso tempo di controllo (ANOVA-Tukey).

Dopo 7 giorni di conservazione, i campioni trattati con US presentano livelli più elevati e significativamente ($p \leq 0.05$) differenti rispetto gli altri campioni, che non mostrano alcuna differenza tra loro. Tuttavia, è possibile notare come il campione non trattato abbia raggiunto i livelli dei campioni trattati con DIPP o con US*DIPP. La situazione rimane invariata dopo 14 giorni di conservazione. Il campione a ultrasuoni presenta una carica microbica totale di 10^6 UFC/g, ai limiti di accettabilità del prodotto.

L'ANOVA fattoriale a due vie ci restituisce, invece, altre informazioni. Innanzitutto, sia il fattore US che l'interazione US*DIPP risultano significativi.

Tab. 22 Analisi della varianza per la risposta carica microbica totale dopo il trattamento.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	3	12.7855	4.2618	19.51	0.000
Linear	2	2.5688	1.2844	5.88	0.027
US	1	2.5619	2.5619	11.73	0.009
DIPP	1	0.0069	0.0069	0.03	0.864
2-Way Interactions	1	10.2167	10.2167	46.77	0.000
US*DIPP	1	10.2167	10.2167	46.77	0.000
Error	8	1.7476	0.2184		
Total	11	14.5331			

US=Ultrasuoni; DIPP=Dipping; US*DIPP=Ultrasuoni più dipping. p-value ≤ 0.05 denota un effetto principale o una interazione statisticamente significativa dei fattori di processo.

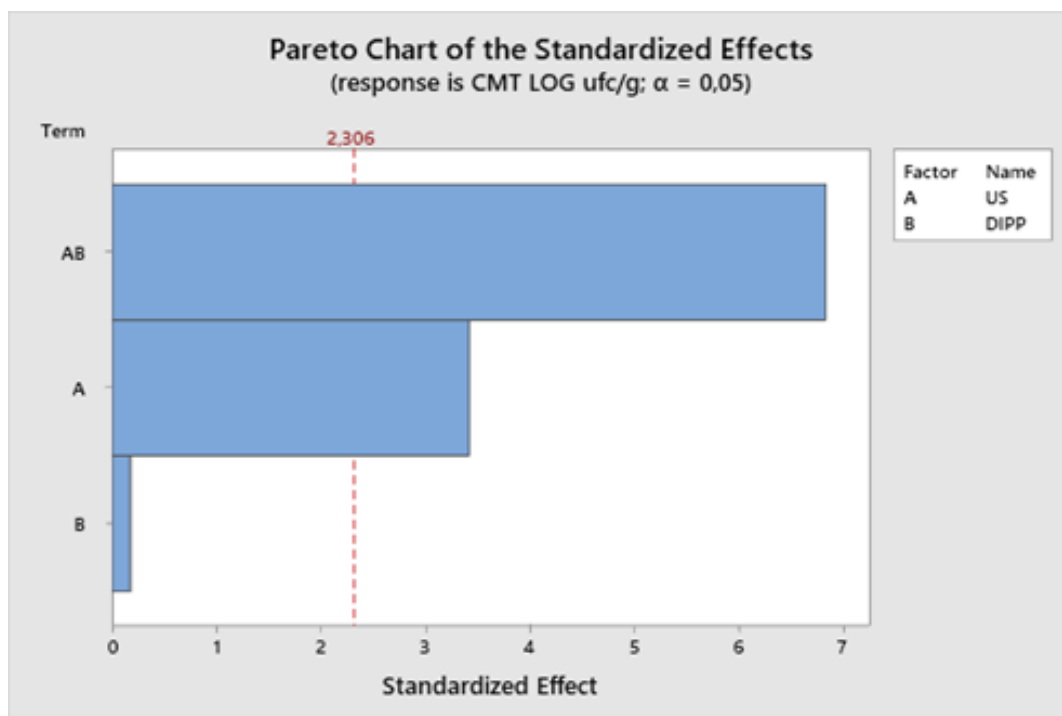


Fig. 35 Grafico di Pareto dei principali effetti e delle interazioni della risposta carica microbica totale nel campione dopo il trattamento.

Immediatamente dopo il trattamento, l’interazione tra i trattamenti e gli ultrasuoni ha un effetto sulla carica microbica totale. La direzione dell’effetto si evince dall’analisi degli effetti e dei coefficienti (tab. 23 e fig. 36).

Tab. 23: Effetti stimati e coefficienti per la risposta carica microbica totale dopo il trattamento.

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		2.520	0.135	18.68	0.000	
US	0.924	0.462	0.135	3.42	0.009	1.00
DIPP	-0.048	-0.024	0.135	-0.18	0.864	1.00
US*DIPP	-1.845	-0.923	0.135	-6.84	0.000	1.00

Il segno che precede i valori in colonna “Effect” indica la direzione dell’effetto: – significa che in presenza del fattore la variabile dipendente diminuisce, + che in presenza del fattore la variabile aumenta. $p \leq 0.05$ indica che l’effetto principale o l’interazione sono statisticamente significativi.

La presenza degli US stimola la risposta a livello. Questo effetto stimolante degli ultrasuoni è già stato evidenziato in vari studi quando la potenza (W) e il tempo di esposizione sono insufficienti per inibire la crescita (Hang et al., 2017).

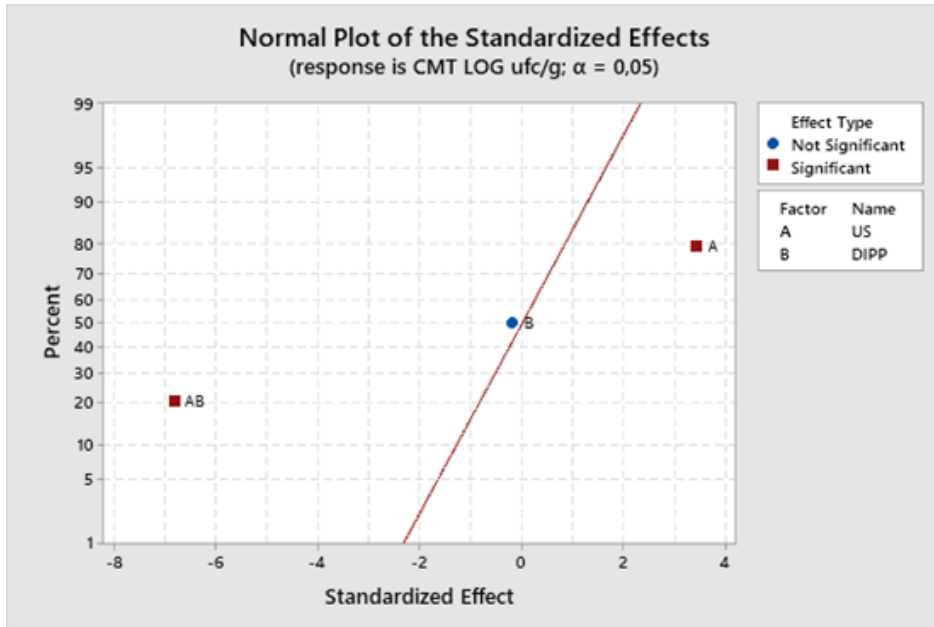


Fig. 36: Normal probability plot degli effetti standardizzati per la risposta carica microbica totale dopo il trattamento.

L'interazione significativa tra i fattori e il tipo di relazione si evince nel relativo grafico (fig. 37). Si evidenzia, infatti, un'interazione di tipo antagonistico. Entrambi i fattori condizionano la variabile di risposta nella stessa direzione ma uno dei due è associato all'aumento della CMT solo quando l'altro fattore è assente. Questo comporta che la combinazione dei due fattori US*DIPP, in questo caso, abbassa i livelli di CMT.

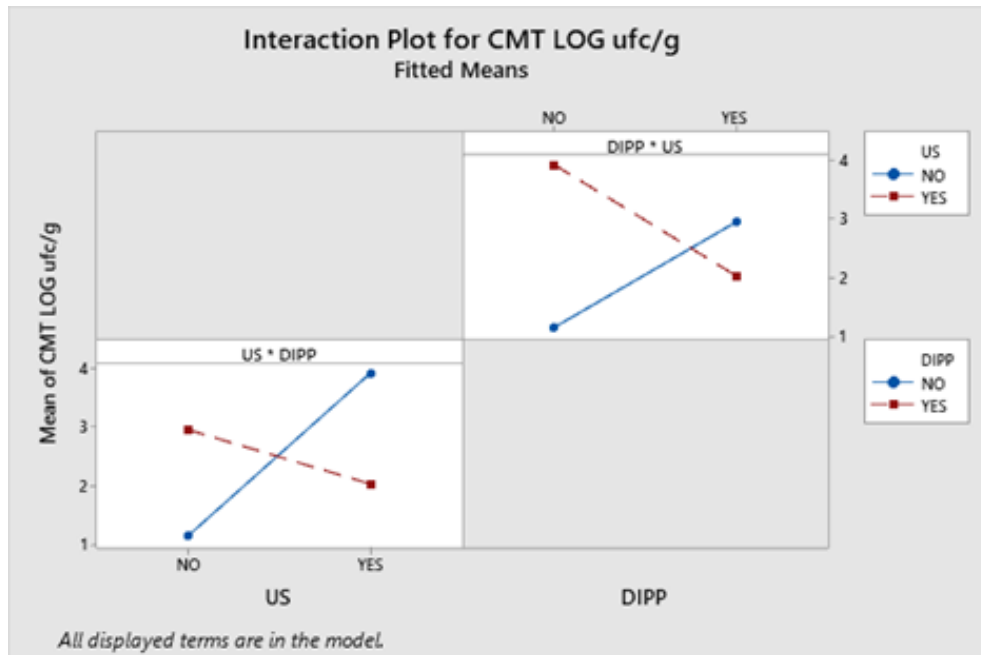


Fig. 37: Interaction plot dei fattori per la risposta carica microbica totale dopo il trattamento.

La presenza del DIPP, in sostituzione della mera acqua distillata ha, quindi, un effetto positivo sul trattamento. La causa potrebbe risiedere nella capacità di inibizione della crescita microbica dovuta all'effetto combinato di calcio e acido ascorbico. Studi recenti, infatti, mostrano che il CC ha un effetto inibitorio sulla crescita microbica (Rajamma et al., 2021).

Dopo 14 giorni di conservazione, gli US, DIPP e US*DIPP presentano ancora un effetto significativo (tab. 24 e fig.38).

Tab. 24: Analisi della varianza per la risposta carica microbica totale dopo 14 giorni di conservazione.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	3	24.574	8.1913	27.13	0.000
Linear	2	15.422	7.7112	25.54	0.000
US	1	2.538	2.5379	8.41	0.020
DIPP	1	12.885	12.8845	42.67	0.000
2-Way Interactions	1	9.152	9.1515	30.31	0.001
US*DIPP	1	9.152	9.1515	30.31	0.001
Error	8	2.415	0.3019		
Total	11	26.989			

US=Ultrasuoni; DIPP=Dipping; US*DIPP=Ultrasuoni più dipping. p-value ≤ 0.05 denota un effetto principale o una interazione statisticamente significativa dei fattori di processo.

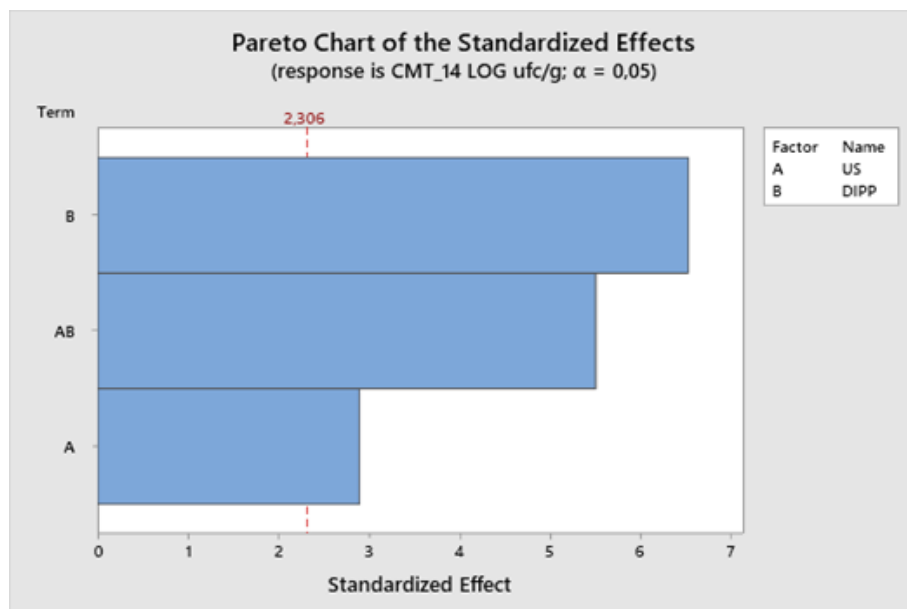


Fig. 38: Grafico di Pareto dei principali effetti e delle interazioni della risposta carica microbica totale nel campione dopo 14 giorno di conservazione.

Gli ultrasuoni influiscono positivamente sulla variabile. Il DIPP, invece, diminuisce la risposta.

Tab. 25: Effetti stimati e coefficienti per la risposta carica microbica totale dopo 14 giorni di conservazione.

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		4.164	0.159	26.25	0.000	
US	0.920	0.460	0.159	2.90	0.020	1.00
DIPP	-2.072	-1.036	0.159	-6.53	0.000	1.00
US*DIPP	-1.747	-0.873	0.159	-5.51	0.001	1.00

Il segno che precede i valori in colonna “Effect” indica la direzione dell’effetto: – significa che in presenza del fattore la variabile dipendente diminuisce, + che in presenza del fattore la variabile aumenta. $p \leq 0.05$ indica che l’effetto principale o l’interazione sono statisticamente significativi.

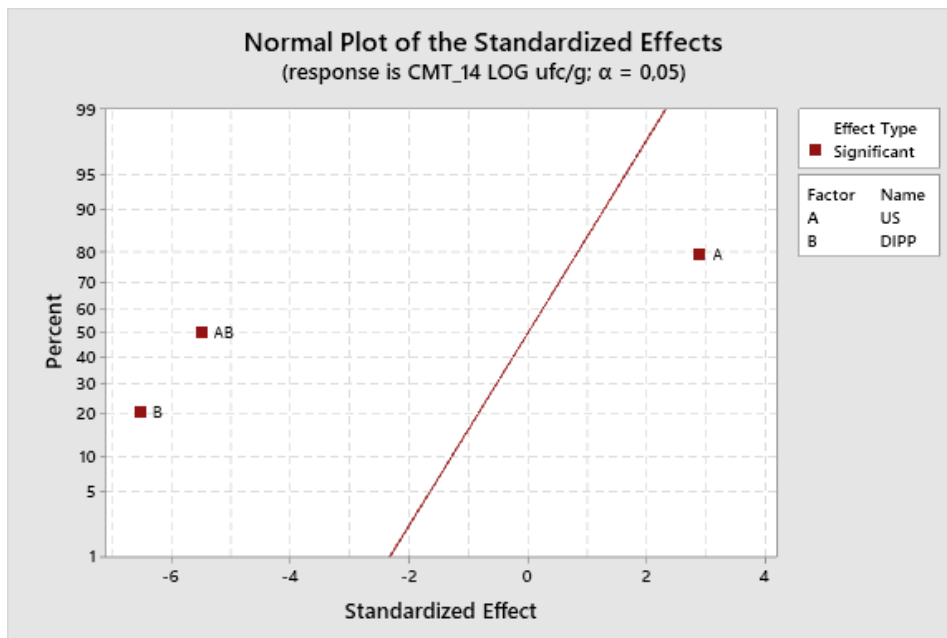


Fig.39: Normal probability plot degli effetti standardizzati per la risposta carica microbica totale dopo 14 giorni di conservazione.

Il grafico dell’interazione (fig. 40) mostra un’interazione statisticamente significativa tra i due fattori. Il DIPP presenta un effetto buffering sugli ultrasuoni e viceversa. La combinazione dei trattamenti determina la più bassa conta microbica totale dopo 14 giorni di conservazione (10^2 UFC/g), in linea con i valori prescritti dalla legge.

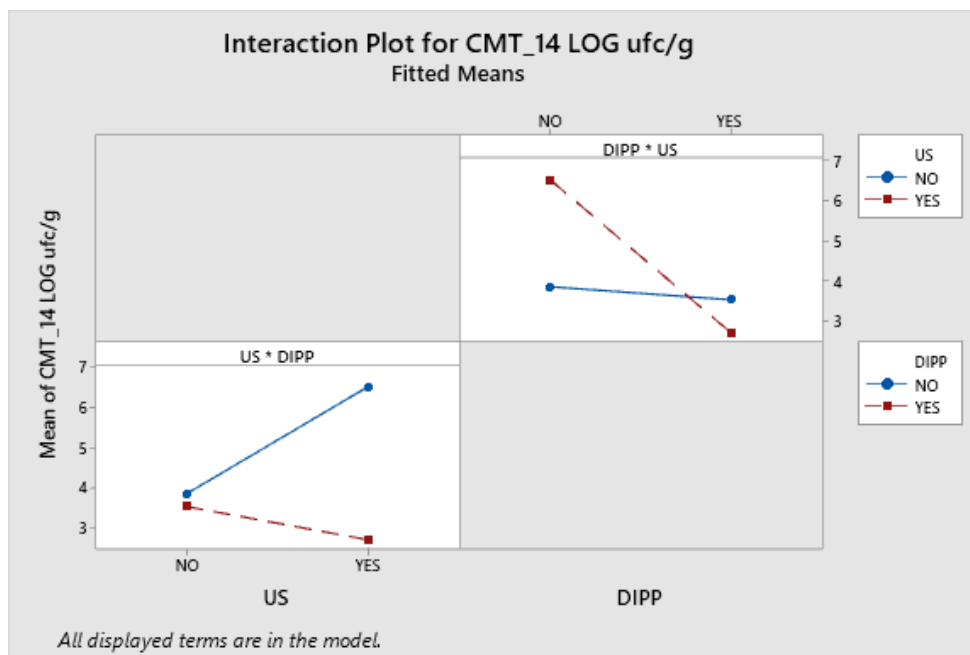


Fig. 40: Interaction plot dei fattori per la risposta carica microbica totale dopo 14 giorni di conservazione.

3.3. Conclusioni

L'uso degli ultrasuoni e del dipping, dopo 14 giorni di conservazione di mela *Cripps Pink* di IV gamma, ha evidenziato sia effetti positivi che negativi sulle caratteristiche di qualità e di sicurezza. In particolare, l'analisi statistica fattoriale ha mostrato un effetto sinergico nell'abbassamento dei valori dell'indice di imbrunimento accompagnato da una interazione antagonista sull'enzima della polifenolossidasi che ne ha limitato fortemente l'attività. Si è registrata una netta e significativa riduzione della conta microbica totale fin dal post- trattamento e dopo 14 giorni. Dall'altra parte il combinato US*DIPP non riesce a restituire una mela con una resistenza alla compressione superiore al trattamento con solo dipping, sebbene quest'ultimo limiti fortemente l'effetto negativo indotto dalla cavitazione e dalla formazione di microcanali. Purtroppo, la combinazione dei due fattori ha comportato una netta riduzione del contenuto in acido ascorbico nella mela. L'applicazione in soluzione di 2% di acido ascorbico non è servita a tamponare le perdite. Restano da chiarire quali sono i meccanismi chimici alla base di questa perdita, che avviene già durante l'esecuzione del trattamento, al fine di trovare eventuali soluzioni alternative.

4. ESPERIMENTO II: EFFETTI DEGLI ULTRASUONI E DEL DIPPING SULLE CARATTERISTICHE DI QUALITÀ DI GRANNY SMITH CV DI IV GAMMA

L'esperimento precedente ha mostrato l'efficacia della combinazione degli ultrasuoni e del dipping su attributi di qualità, quali colore, conta microbica totale, resistenza alla compressione, contenuto in acido ascorbico e attività della polifenolossidasi. Tuttavia, i parametri di processo erano fissi (potenza 100 W, temperatura 25° C, tempo di esposizione 10 minuti) e il dipping utilizzato era dato costituito dalla miscela di due additivi in soluzione (acido ascorbico al 2 % e cloruro di calcio all'1 %). Questo ha permesso di indagare il differente impatto tra un'applicazione tradizionale (dipping) e una innovativa (ultrasuoni) ma non ha restituito informazioni sugli effetti e l'impatto dei fattori di modulazione degli ultrasuoni e dei singoli additivi, presi. In letteratura sono riportati tentativi di definizione dei parametri del processo a ultrasuoni su frutta minimamente processata. Per misurare gli effetti sul colore e la consistenza modulando parte dei fattori di processo o testando a fattori fissi. Per esempio, le ciliegie trattate a 33 kHz, 60 W, per 10/20/30/40/60 minuti presentavano ΔE aumentato quando il trattamento era >30 minuti. Il trattamento di 20 min, invece, è stato il più efficace per mantenere la brillantezza del colore rosso per 15 giorni. Si è registrata, invece, una diminuzione significativa della compattezza quando i campioni sono stati trattati per più di 20 minuti (Muzaffar et al., 2016). Non si rilevano, tuttavia, studi fattoriali per indagare le eventuali interazioni tra i parametri di processo. Pertanto, si è ritenuto necessario, grazie alla disponibilità degli impianti e dei laboratori dell'Institute of Food Engineering Food UPV (Universitat Politècnica de Valencia), testare parametri di processo ed effetto dei singoli additivi sui campioni di mela di IV gamma. Nel dettaglio: potenza, tempo di esposizione, temperatura del mezzo in cui sono stati immersi i campioni, acido ascorbico e cloruro di calcio separatamente e in combinazione.

4.1. Materiali e metodi

4.1.1. Preparazione dei campioni

Le mele *Granny Smith* cv. sono state acquistate in un supermercato locale a Valencia. L'acido L-ascorbico (AsA) e cloruro di calcio (CC) sono stati acquistati da Scharlab

(Spain). Le mele intere sono state lavate e tagliate con un coltello di acciaio inox in dischi di circa 1,5 cm di spessore. Il nucleo centrale è stato rimosso utilizzando un levatorsoli in acciaio inossidabile. Per ogni mela sono stati realizzati 3 dischi, che sono stati poi divisi in 4-5 pezzi di forma triangolare. I circa 15 pezzi per mela sono stati utilizzati per essere sottoposti allo stesso trattamento e per effettuare le analisi di controllo del colore nel tempo. I campioni di mela sono stati immersi in un bagno a ultrasuoni (ATM 12L, ATU, Paterna, Valencia) con acqua deionizzata in presenza/assenza di CC a AsA a una potenza di 200 W e 400 W, per 5 o 10 minuti di trattamento e alla temperatura di 4° C e 25° C, variabile secondo il design sperimentale, alla frequenza fissa di 24 kHz. Per mantenere la temperatura ai livelli prestabiliti all'interno del bagno a ultrasuoni è stata introdotta una sonda per la misurazione della temperatura e un sistema di ricircolo automatico della acqua a temperatura controllata, secondo i parametri impostati, con oscillazione di temperature variabile in base ai parametri di esperimento di $\pm 1^\circ$ C. Sono state preparate tre ripetizioni per ciascun gruppo. Dopo i trattamenti, i campioni di mele appena tagliate sono stati asciugati con un tovagliolo di carta e confezionati in sacchetti di polietilene, etichettati correttamente e conservati in condizioni di conservazione a temperatura di 4° C \pm 0.5 per 14 giorni.

4.1.2. Design sperimentale

L'esperimento è un multifattoriale completo a 5 fattori e 2 livelli (2^5) (Tab. 25) per un totale di 32 prove sperimentali. I campioni di ogni mela sono stati sottoposti a ogni trattamento in maniera randomizzata. I fattori di processo di un bagno dotato di ultrasuoni sono suddivisi in fattori intrinseci (potenza degli ultrasuoni) ed estrinseci: temperatura, tempo di esposizione agli ultrasuoni, presenza/assenza cloruro di calcio, presenza/assenza acido ascorbico. La frequenza degli ultrasuoni è stata mantenuta fissa a 24 kHz. La potenza espressa è stata di 200 W e 400 W a livello più alto.

Tab. 25: Design sperimentale a cinque fattori e due livelli.

	StdOrder	RunOr>>	CenterPt	Blocks	P	Time_Ex	T	CC	AsA
1	25	1	1	1	200	5	4	YES	YES
2	29	2	1	1	200	5	25	YES	YES
3	6	3	1	1	400	5	25	NO	NO
4	27	4	1	1	200	10	4	YES	YES
5	2	5	1	1	400	5	4	NO	NO
6	22	6	1	1	400	5	25	NO	YES
7	8	7	1	1	400	10	25	NO	NO
8	1	8	1	1	200	5	4	NO	NO
9	12	9	1	1	400	10	4	YES	NO
10	19	10	1	1	200	10	4	NO	YES
11	13	11	1	1	200	5	25	YES	NO
12	10	12	1	1	400	5	4	YES	NO
13	21	13	1	1	200	5	25	NO	YES
14	11	14	1	1	200	10	4	YES	NO
15	9	15	1	1	200	5	4	YES	NO
16	17	16	1	1	200	5	4	NO	YES
17	18	17	1	1	400	5	4	NO	YES
18	23	18	1	1	200	10	25	NO	YES
19	3	19	1	1	200	10	4	NO	NO
20	32	20	1	1	400	10	25	YES	YES
21	24	21	1	1	400	10	25	NO	YES
22	4	22	1	1	400	10	4	NO	NO
23	16	23	1	1	400	10	25	YES	NO
24	20	24	1	1	400	10	4	NO	YES
25	15	25	1	1	200	10	25	YES	NO
26	28	26	1	1	400	10	4	YES	YES
27	7	27	1	1	200	10	25	NO	NO
28	30	28	1	1	400	5	25	YES	YES
29	26	29	1	1	400	5	4	YES	YES
30	5	30	1	1	200	5	25	NO	NO
31	14	31	1	1	400	5	25	YES	NO
32	31	32	1	1	200	10	25	YES	YES

La tabella riporta i 32 trattamenti effettuati con le combinazioni di tutti i livelli dei seguenti fattori di processo: P= potenza; TimEx= tempo di esposizione agli ultrasuoni; T= temperatura della soluzione; AsA =acido ascorbico in soluzione al 2 %; CC= cloruro di calcio in soluzione all'1%

4.1.3. Determinazione dell'indice di imbrunimento

Il colore della superficie delle mele appena tagliate è stato misurato utilizzando un Minolta Chromameter (CM – 2500d, Konica Minolta, Tokyo, Japan). dotato di illuminante D65 e un'area di misurazione di 10 mm nella scala cromatica CIE L* a* b*. Il colorimetro è stato calibrato utilizzando una piastra standard bianca. Le variabili di colore, tra cui L* (chiaro/scuro), a* (rosso/verde) e b* (giallo/blu) nella scala

cromatica Hunter Lab (Hunter Lab, 1996), sono state misurate su ciascun campione di mela. I risultati sono stati espressi come valore medio di tre ripetizioni, ciascuna composta da due misurazioni in cui i parametri sono stati valutati in due posizioni. L'indice di imbrunimento (BI) è stato calcolato utilizzando la seguente equazione (Pathare et al., 2013):

$$BI = \frac{[100(x-0.31)]}{0.17} \quad x = \frac{(a^*+1.75L^*)}{(5.645L^* + a^* - 3.012b^*)} \quad (3)$$

L'aspetto visivo delle fette cambia durante la conservazione ed è stato monitorato tramite foto (Fig. 51).

4.1.4. Determinazione della resistenza alla compressione

I test di compressione sono stati condotti utilizzando una macchina per prove meccaniche universali (TA.XT2i, Stable Micro Systems, UK) con una capacità di carico di 2 kN e una sonda di compressione cilindrica di 6 mm di diametro. Ogni singolo campione di mela (tre ripetizioni) è stato caricato nella piastra della macchina e compresso. I test di compressione sono stati eseguiti a temperatura ambiente (23 °C) alle seguenti condizioni: una velocità di prova di 10 mm/min. L'acquisizione dei dati per questi profili testuali è stata eseguita utilizzando il software fornito con la macchina. Il parametro valutato è la resistenza alla compressione, misurata con la massima risposta di forza in Newton (N).

4.1.5. Analisi statistica

L'analisi degli effetti (ANOVA a due vie) è stata condotta come Viera et al. 2020. Per valutare gli effetti dei fattori sono stati utilizzati: il grafico normale degli effetti standardizzati, e i grafici delle interazioni. Il grafico normale rappresenta graficamente la direzione e l'entità degli effetti. Nel grafico normale degli effetti standardizzati, gli effetti e le interazioni con coefficienti negativi (segni negativi) sono nella regione inferiore al 50%, mentre i fattori e le interazioni con coefficienti positivi (segni positivi) sono nella regione superiore al 50%. Tutti gli effetti principali e le interazioni non significativi giacciono sulla linea retta (la linea centrale che attraversa il valore zero sull'asse x al 50% di probabilità). Quelli considerati significativi nella risposta sono distanziati dalla linea retta. I segni positivi degli effetti principali indicano un

aumento delle variabili, viceversa una riduzione. Sul grafico di Pareto gli effetti superiori a 2.31 ($p = 0.05$), situati a destra della linea di demarcazione, sono significativi. I valori standardizzati assoluti degli effetti di ciascun fattore e delle interazioni corrispondono al test t di Student calcolato per ciascuna variabile indipendente. Il grafico delle interazioni è utile a mostrare come la relazione tra un fattore categoriale e una variabile dipendente continua dipenda dal valore del secondo fattore categoriale (McCabe et al., 2018). Questo grafico mostra le medie per i livelli di un fattore sull'asse x e una linea separata per ogni livello di un altro fattore. È stata, infine, condotta un'analisi dei residui per testare la correttezza del modello. I dati sono stati elaborati utilizzando il software Minitab® 19, Minitab Inc., State College, Pennsylvania, USA, i grafici delle interazioni a tre o più vie con SPSS 21 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4.2. Risultati

4.2.1. Indice di imbrunimento dopo 14 giorni di conservazione

Nella tabella 26 (in grassetto sono evidenziati i fattori con effetto significativo sulla variabile di risposta) sono riportati i risultati dell'analisi fattoriale.

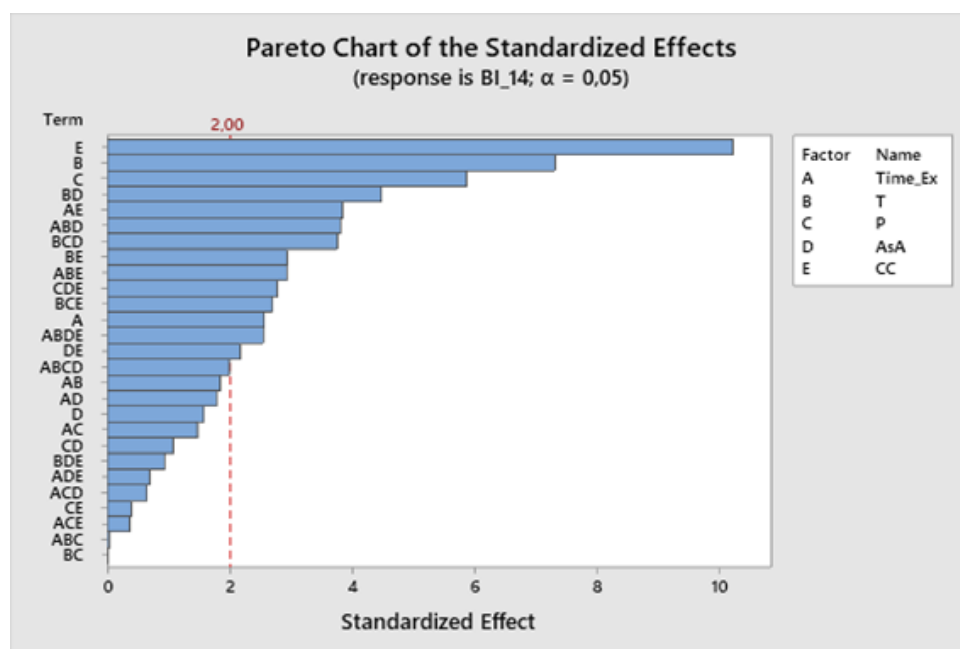


Fig. 41: Grafico di Pareto dei principali effetti e delle interazioni della risposta indice di imbrunimento nel campione dopo 14 giorni di conservazione.

Solo quattro fattori di processo principali sono significativi ($p < 0.05$): potenza, temperatura, tempo di esposizione e cloruro di calcio. La presenza/assenza di acido ascorbico non ha un impatto significativo sul campione. La temperatura e la potenza a livello superiore (25°C e 400 W), e la presenza di cloruro di calcio diminuiscono l'indice di imbrunimento. Al contrario, un maggiore tempo di esposizione (10 minuti) aumenta la risposta della variabile dipendente (fig. 41 grafico di Pareto e fig. 42 normal plot degli effetti standardizzati) influenzando negativamente sull'obiettivo finale che consiste nel limitare l'aumento di BI.

Tab. 26 Effetti stimati e coefficienti per la risposta indice di imbrunimento dopo 14 giorni di conservazione-

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		49.93	1.00	49.84	0.000	
Time_Ex	5.14	2.57	1.00	2.57	0.013	1.00
T	-14.66	-7.33	1.00	-7.31	0.000	1.00
P	-11.77	-5.88	1.00	-5.87	0.000	1.00
AsA	3.17	1.58	1.00	1.58	0.118	1.00
CC	-20.48	-10.24	1.00	-10.22	0.000	1.00
Time_Ex*T	-3.71	-1.85	1.00	-1.85	0.069	1.00
Time_Ex*P	2.96	1.48	1.00	1.48	0.144	1.00
Time_Ex*AsA	-3.57	-1.78	1.00	-1.78	0.079	1.00
Time_Ex*CC	-7.71	-3.85	1.00	-3.85	0.000	1.00
T*P	0.00	0.00	1.00	0.00	0.998	1.00
T*AsA	-8.98	-4.49	1.00	-4.48	0.000	1.00
T*CC	5.89	2.95	1.00	2.94	0.004	1.00
P*AsA	-2.17	-1.09	1.00	-1.08	0.282	1.00
P*CC	0.80	0.40	1.00	0.40	0.691	1.00
AsA*CC	4.35	2.18	1.00	2.17	0.033	1.00
Time_Ex*T*P	0.07	0.04	1.00	0.04	0.972	1.00
Time_Ex*T*AsA	7.63	3.81	1.00	3.81	0.000	1.00
Time_Ex*T*CC	5.87	2.94	1.00	2.93	0.005	1.00
Time_Ex*P*AsA	-1.30	-0.65	1.00	-0.65	0.518	1.00
Time_Ex*P*CC	-0.74	-0.37	1.00	-0.37	0.712	1.00
Time_Ex*AsA*CC	1.40	0.70	1.00	0.70	0.486	1.00
T*P*AsA	7.53	3.77	1.00	3.76	0.000	1.00
T*P*CC	5.42	2.71	1.00	2.70	0.009	1.00
T*AsA*CC	-1.88	-0.94	1.00	-0.94	0.352	1.00
P*AsA*CC	-5.57	-2.79	1.00	-2.78	0.007	1.00
Time_Ex*T*P*AsA	-4.00	-2.00	1.00	-2.00	0.050	1.00
Time_Ex*T*AsA*CC	-5.10	-2.55	1.00	-2.55	0.013	1.00

P= potenza (W); TimEx= tempo di esposizione agli ultrasuoni in minuti; T=temperatura del mezzo in gradi Celsius; AsA= acido ascorbico in soluzione; CC= cloruro di calcio in soluzione. p-value ≤ 0.05 denota un effetto principale o una interazione statisticamente significativa dei fattori di processo. Il segno che precede i valori in colonna "Effect" indica la direzione dell'effetto: - significa che in presenza del fattore la variabile dipendente diminuisce, + che in presenza del fattore la variabile aumenta.

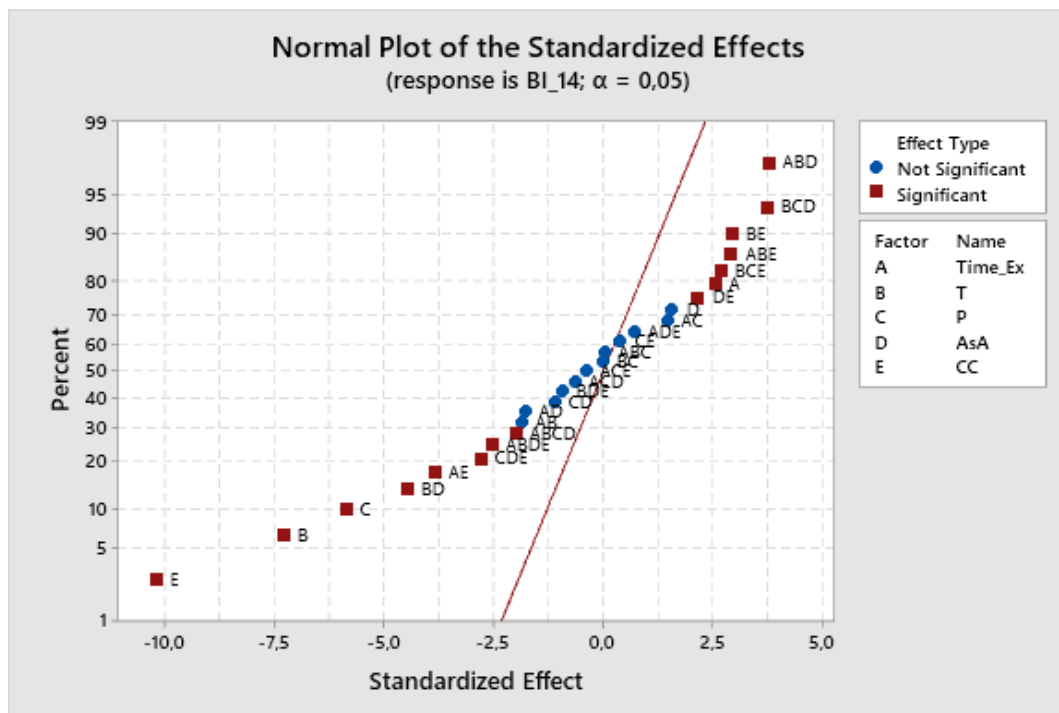


Fig. 42: Normal probability plot degli effetti standardizzati per la indice di imbrunimento dopo 14 giorni di conservazione.

La presenza di interazioni a livelli più elevati ci ha spinto ad approfondire l'analisi per determinare come i fattori si influenzino tra di loro.

4.2.1.1. Analisi fattoriale a due vie

Il grafico delle interazioni (fig. 43) presenta diversi effetti di interazione tra i fattori. Tuttavia, è necessario adottare una strategia *from bottom to up* concentrandosi inizialmente solo sull'analisi delle interazioni risultati significative, a due livelli (tab. 26) per poi proseguire con le interazioni a livello successivo. L'interazione T*AsA ($p < 0,05$) evidenzia come l'AsA, non significativo a livello di effetto principale, riesce, interagendo con la temperatura a livello più elevato di 25° C ad intensificare l'effetto di diminuzione della risposta BI o ad aumentarla nel caso in cui la temperatura sia mantenuta a 4° C. Il CC interagisce in maniera significativa con la temperatura, il tempo di esposizione e l'acido ascorbico. Nel primo caso, la presenza di CC in soluzione potenzia gli effetti della temperatura a prescindere dal livello (4 o 25° C), abbassando in maniera significativa la variabile, là dove l'interazione T*AsA era

efficace solo al livello più alto di temperatura. Il tempo di esposizione più elevato, 10 minuti, ha un effetto positivo di incremento sulla variabile. Tuttavia, in presenza del CC, si evidenzia un effetto buffering e, in maniera statisticamente significativa ($p \leq 0.05$) la risposta della variabile BI diminuisce notevolmente, tale che un trattamento a 10 minuti con CC in soluzione è più efficace di uno a 5 minuti. Di fatto, il fattore TimeEx inverte la tendenza mostrata come fattore singolo di processo.

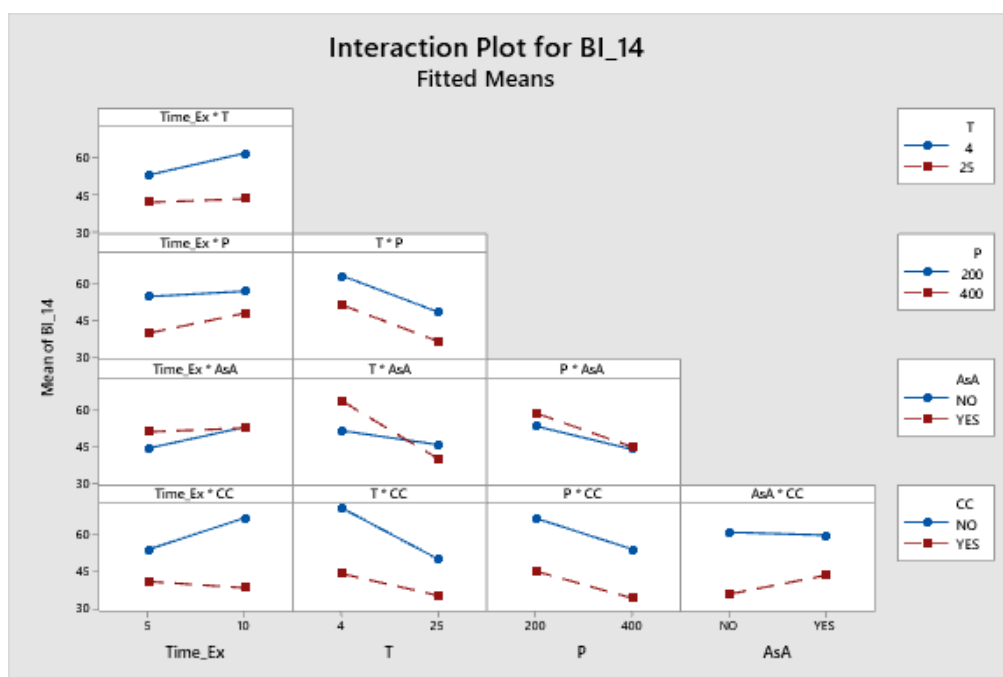


Fig. 43: Interaction plot dei fattori per la risposta indice di imbrunimento dopo 14 giorni di conservazione.

I dati dimostrano che la presenza/assenza di acido ascorbico non ha efficacia sul processo. Se, tuttavia, l'acido ascorbico è combinato con 1% di cloruro di calcio i valori di BI risultano notevolmente e significativamente più bassi.

4.2.1.2. Analisi fattoriale a tre vie

L'analisi delle interazioni a tre vie, che risultano statisticamente significative, ci consente di esplorare cambiamenti tra i fattori a un livello superiore. Le interazioni significative a questo livello sono cinque. Vediamole nel dettaglio.

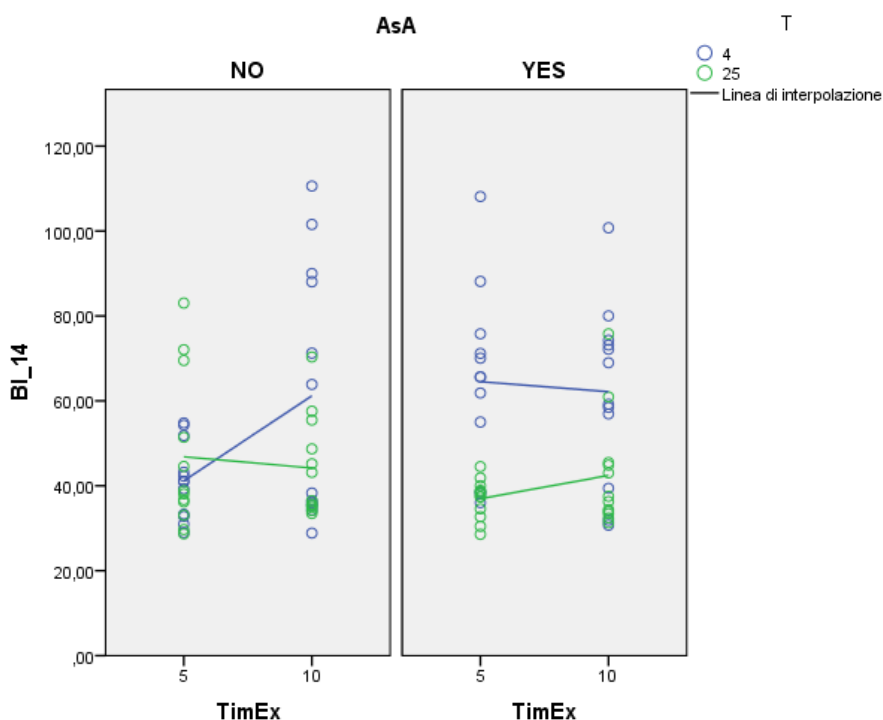


Fig. 44: Grafico di interazione a tre vie TimEx*T*AsA (tempo di esposizione*temperatura*acido ascorbico).

La prima interazione significativa ($p \leq 0.000$) riguarda il tempo di esposizione agli ultrasuoni, l'acido ascorbico e la temperatura. Nell'interazione a due vie, la presenza di AsA in combinazione con una temperatura di processo di 25°C restituiva un BI più basso e determinava, invece, un incremento della risposta a 4° C a prescindere dal tempo di esecuzione del processo. Dall'analisi del grafico (fig. 44) emerge che per TimEx*T*AsA l'interazione consiste nel fatto che alla temperatura di 4° C la presenza di acido ascorbico peggiora la risposta a 5 minuti laddove, come effetto principale, un tempo di esposizione minore di 5 minuti, era più favorevole.

La seconda interazione significativa ($p \leq 0.005$) riguarda il CC, la temperatura e il tempo di esposizione. L'analisi a due vie CC*T evidenziava un effetto sinergico di potenziamento sulla risposta BI in presenza di cloruro di calcio, in entrambi i livelli della temperatura di processo. La presenza di cloruro di calcio in soluzione rallenta, di fatto, l'imbrunimento della mela. Dal grafico di interazione a tre vie (fig. 45), possiamo notare come il CC e la temperatura a 25° C abbiano un effetto buffering sul tempo di processo a livello più alto (10 minuti) e come questa combinazione sia ancora più evidente a una temperatura di processo a livello più basso (4° C).

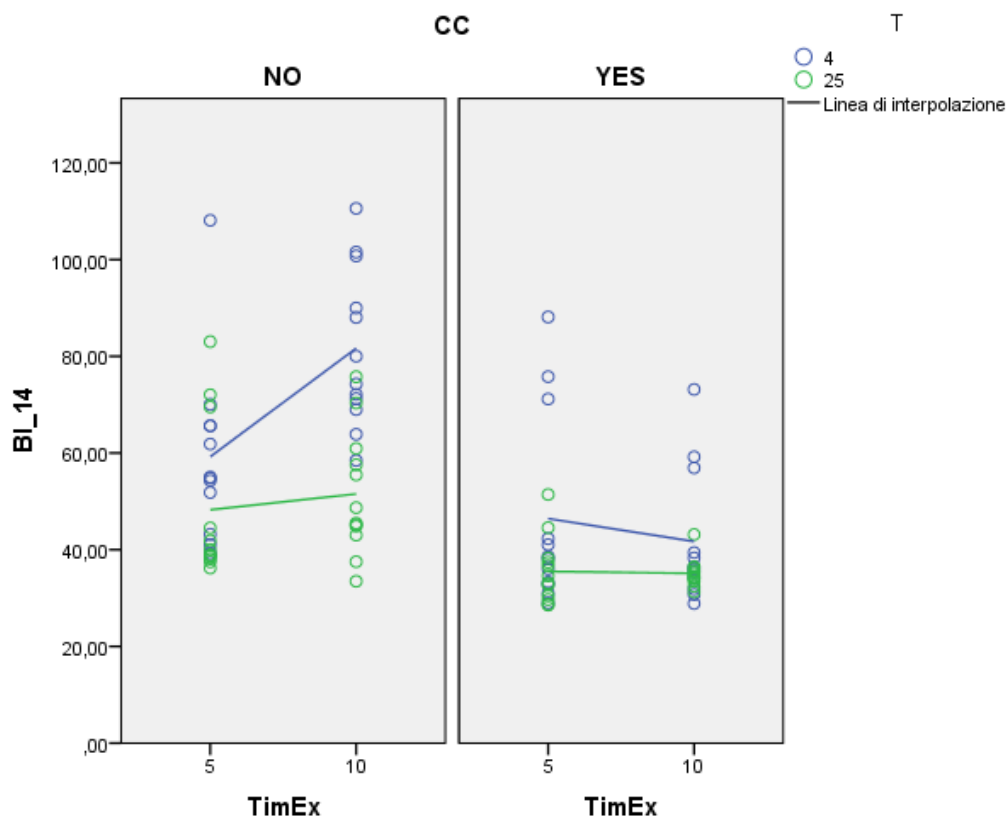


Fig. 45 Grafico di interazione a tre vie TimEx*T*CC (tempo di esposizione*temperatura*cloruro di calcio).

La terza interazione significativa ($p \leq 0.009$) è data da temperatura, cloruro di calcio e potenza di processo. Le interazioni T*P e P*CC non risultavano significative al secondo livello. Tuttavia, nell'interazione P*T*CC (fig. 46) emerge che in assenza di cloruro di calcio in soluzione è più opportuno aumentare la potenza a 400 W per registrare un calo significativo del BI a 25° C. Calo dell'indice di imbrunimento che non avviene se la potenza è mantenuta a 200 W. Un processo, inoltre, condotto a 400 W, 25° C di temperatura e in presenza di cloruro di calcio in soluzione risulta più efficace per il raggiungimento dell'obiettivo.

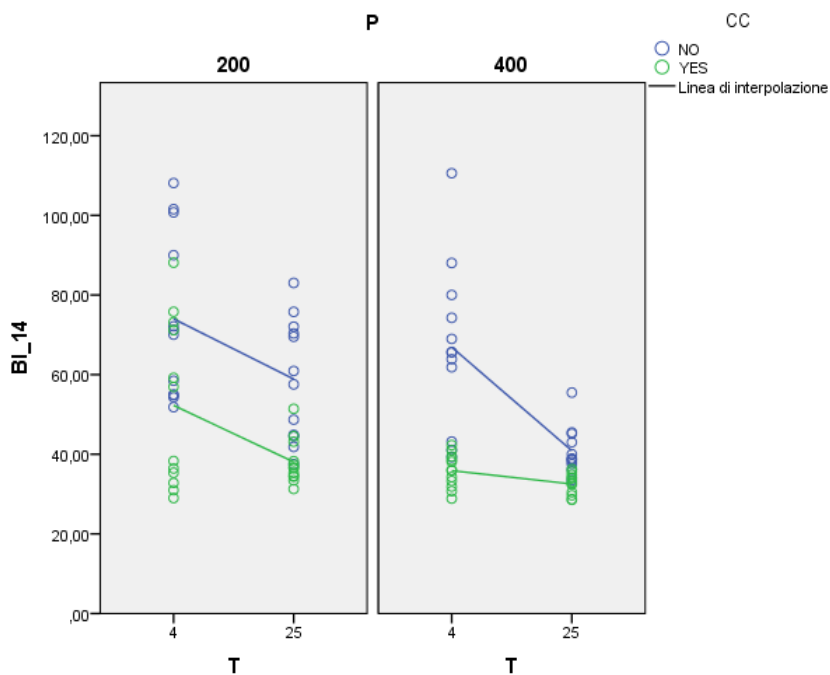


Fig. 46: Grafico di interazione a tre vie P*T*CC (potenza*temperatura*cloruro di calcio).

Nell'interazione tra T*AsA*P (fig. 47) si verifica quello che già era stato evidenziato nelle precedenti interazioni con l'acido ascorbico. AsA ha un effetto sinergico con T di incremento della risposta a 4° C.

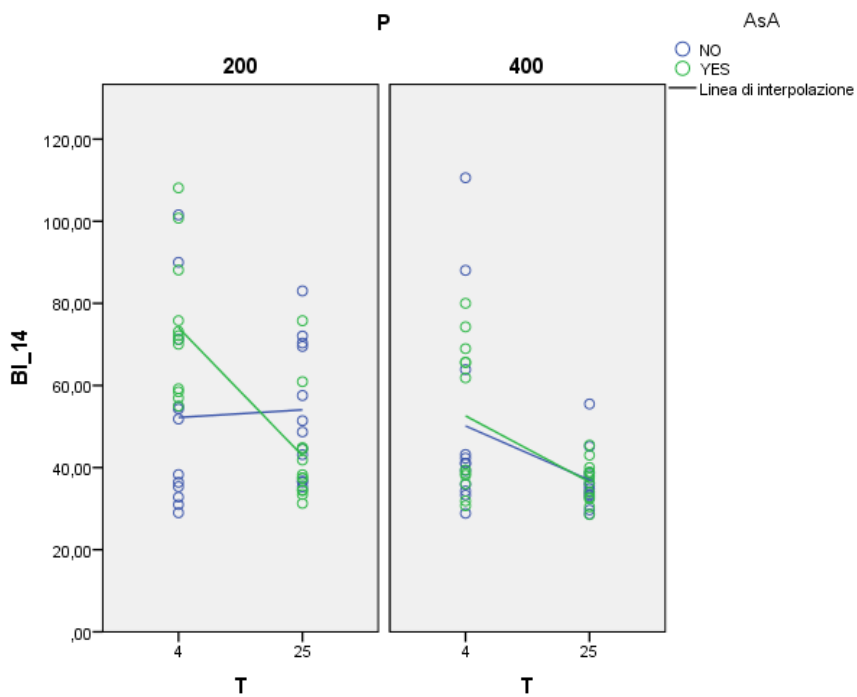


Fig. 47: Grafico di interazione a tre vie P*T*AsA (potenza*temperatura*acido ascorbico).

L'analisi del grafico di interazione a tre vie mostra come l'utilizzo di una potenza più elevata, a 400 W riesca a tamponare l'effetto negativo dell'AsA a 4° C, laddove 200 W di potenza non sembrano sufficienti. Questo esito è in linea anche con la precedente interazione tra potenza e cloruro di calcio. Resta, infine, da analizzare l'ultima interazione significativa ($p \leq 0.007$) tra AsA, CC e P. Dal grafico dell'interazione (fig. 48) si nota un effetto buffering tra i due additivi. La compresenza in soluzione dell'AsA con CC a 200 W aumenta la risposta della variabile BI rispetto al solo uso di cloruro di calcio. Al contrario, non si notano differenze in caso di presenza/assenza AsA a un livello di potenza superiore (400 W).

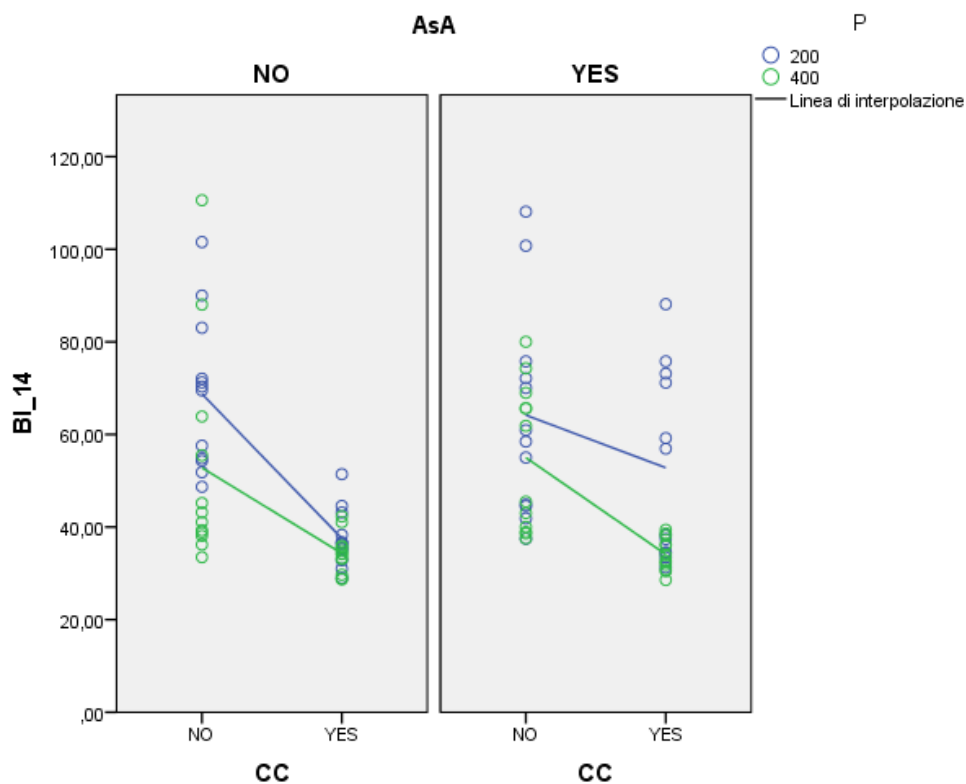


Fig. 48: Grafico di interazione a tre vie P*CC*AsA (potenza*cloruro di calcio*acido ascorbico).

4.2.1.3. Analisi fattoriale a quattro vie

Le analisi precedenti erano prodromiche alla comprensione dell'interazione più complessa a 4 vie. Quest'ultima ha restituito 2 interazioni significative: $T*TimEx*AsA*CC$ ($p \leq 0.013$) e $T*P*TimEx*AsA$ ($= 0.05$). Nel primo caso (fig. 49) si riconferma quanto emerso dalle analisi ai livelli inferiori: l'effetto positivo del CC al livello più alto di temperatura ($25^\circ C$) sulla variabile di risposta con l'attenuazione anche dell'effetto principale negativo del tempo di esposizione a 10 minuti. L'acido ascorbico presenta ancora un effetto opposto al cloruro di calcio. Se presente in soluzione incrementa la variabile di risposta a $4^\circ C$ e il suo effetto è attenuato solo nel trattamento combinato con CC.

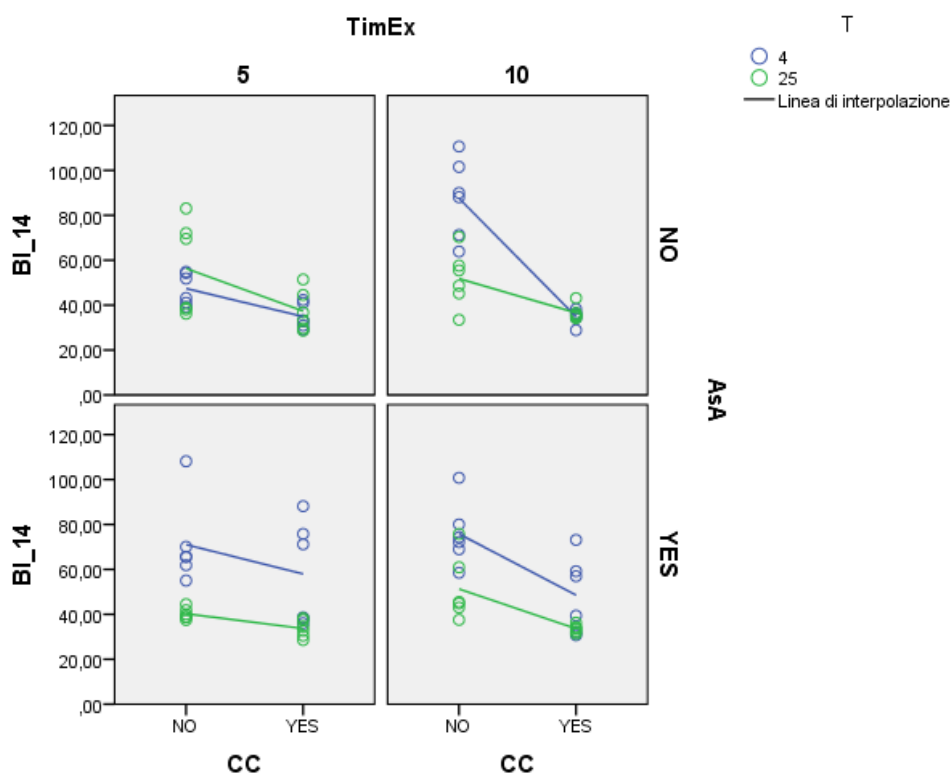


Fig. 49: Grafico di interazione a quattro vie $T*TimEx*AsA*CC$ (temperatura*tempo di esposizione*acido ascorbico*cloruro di calcio).

I trattamenti più efficaci per l'obiettivo risultano quelli condotti a $25^\circ C$, con la presenza di CC, o in combinazione con AsA, indipendentemente dal tempo di esposizione agli ultrasuoni dei campioni di mela.

In merito alla seconda interazione significativa $T*P*TimEx*AsA$, emerge nuovamente l'effetto negativo della presenza di AsA ai fini del processo ai livelli più bassi di potenza, temperatura e tempo di esposizione. A 200 w e 4° C in assenza di AsA si ottengono esiti più favorevoli. È indubbio che il livello di potenza più elevato riesca ad attenuare l'effetto negativo dell'acido ascorbico in soluzione a basse temperature.

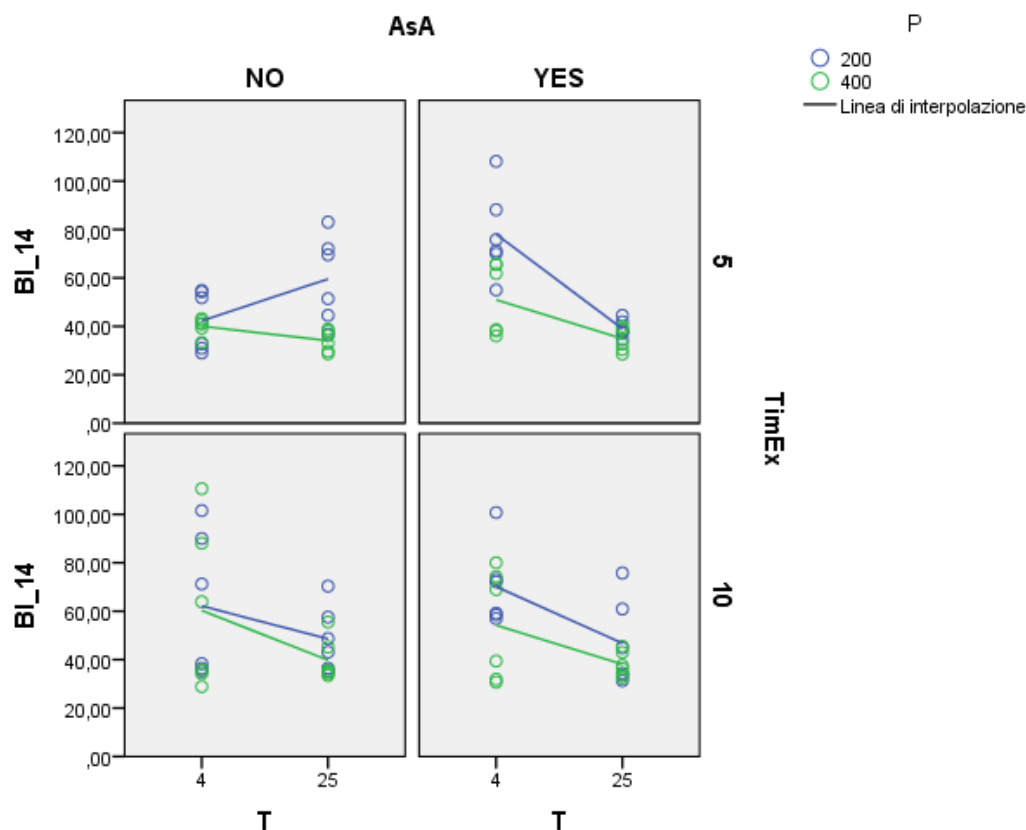
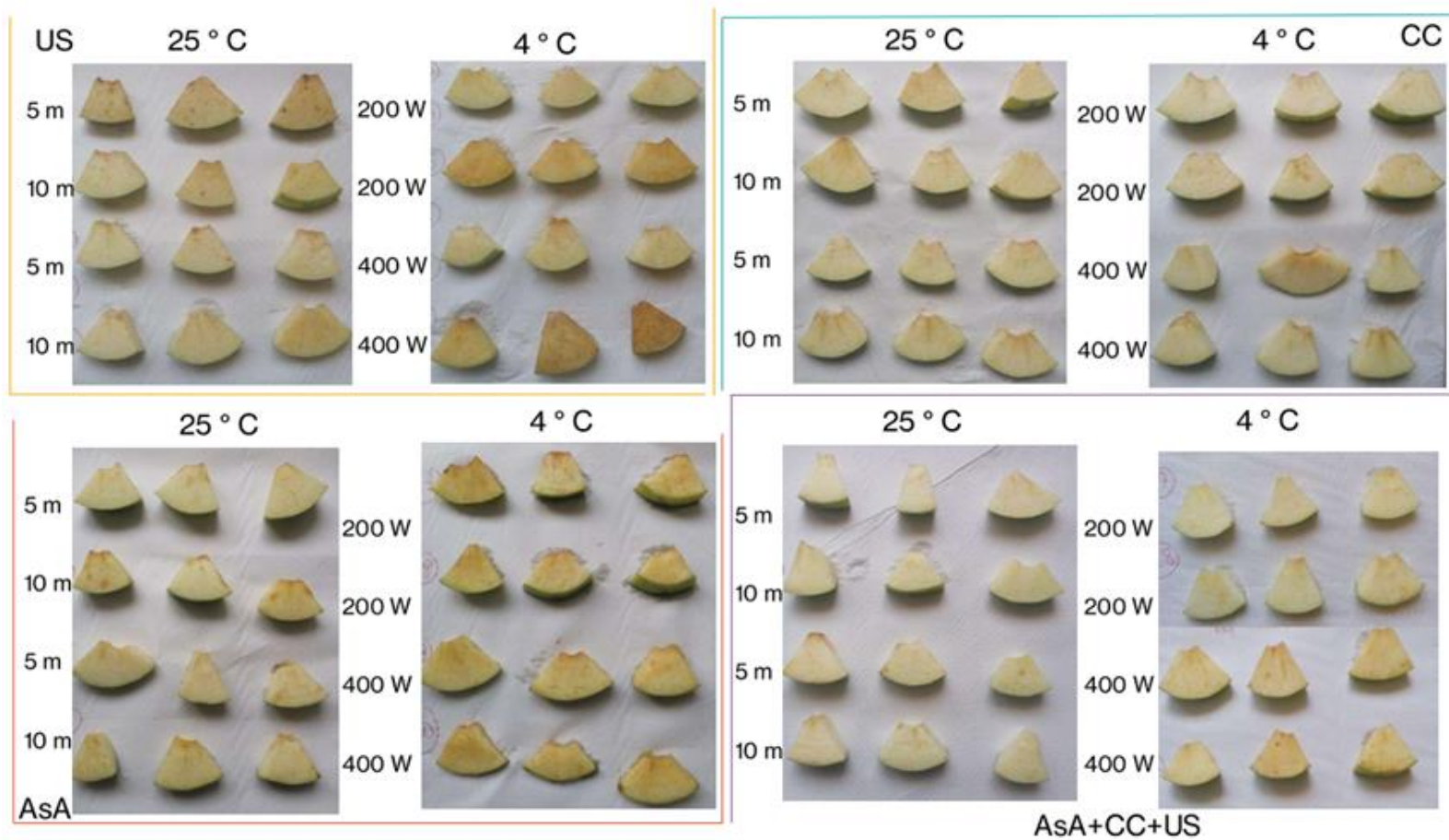


Fig. 50: Grafico di interazione a quattro vie $T*TimEx*AsA*P$ (temperatura*tempo di esposizione*acido ascorbico* cloruro di calcio)

Il processo condotto a 25° C, 400 W per 10 minuti è quello che risulta più efficace sia in assenza che in presenza di acido ascorbico. Tuttavia, la combinazione con il CC attenua gli effetti negativi dell'AsA sul processo. L'analisi visiva (fig. 51) conferma gli esiti dell'analisi statistica. Le mele dopo 14 giorni di conservazione a temperatura di 4°C restituiscono i migliori esiti se trattate a 25° C in presenza di CC, da solo e, soprattutto, in combinazione con AsA, a una potenza di 400 W, sia a 5 che a 10 minuti di tempo di esposizione. Le mele, invece, trattate con solo o senza acido ascorbico, e in assenza di cloruro di calcio, restituiscono la doratura superficiale più elevata.



1

2 **Fig. 50:** Repertorio fotografico di un gruppo di repliche dei campioni, fotografati a 14 giorni di conservazione.

La necessità di aumentare la potenza a 400 W nelle mele trattate a 4° C potrebbe trovare spiegazione nella maggiore densità del mezzo (acqua distillata e acqua con presenza/assenza di acido ascorbico e presenza/assenza di cloruro di calcio) a tale temperatura. La densità del liquido è, infatti, in proporzione diretta all'impedenza (Z). Un aumento della densità provoca una attenuazione della potenza degli ultrasuoni come emerge dall'equazione (1), in quanto influenza la propagazione delle onde nel mezzo e la loro efficacia. Pertanto, in caso di applicazioni a 4° C di temperatura è consigliabile utilizzare una potenza (W) maggiore. I risultati offrono nuova prospettiva sull'esperimento precedente. Innanzitutto, emerge che il cloruro di calcio ha una magnitudine maggiore nel condizionare e ridurre l'effetto dell'imbrunimento nella mela. Tale effetto era già stato evidenziato in già citato lavoro sul frutto della giuggiola (Zhi et al., 2017). Il cloruro di calcio combinato con gli ultrasuoni all'1 % in soluzione e con parametri di processo simili (350 W di potenza, 10 minuti di esposizione e 20° C), ha mostrato una diminuzione nella cinetica di cambiamento del colore. Ci saremmo aspettati, tuttavia, che il ruolo principale nel rallentare la degradazione del colore fosse svolta dall'acido ascorbico, come riportato in letteratura da Jang et al., 2009. Tuttavia, appare impossibile fare il confronto perché lo studio si limita a riportare solo la frequenza di 40 kHz e nulla riferisce in merito agli altri parametri fondamentali di processo. L'acido ascorbico, inoltre, è utilizzato in concentrazione minore dell'1 %.

4.3. Resistenza alla compressione dopo 14 giorni di conservazione

Nella tabella 27 (in grassetto sono evidenziati i fattori con effetto significativo sulla variabile di risposta) sono riportati i risultati dell'analisi fattoriale per la resistenza alla compressione dopo 14 giorni di conservazione a 4° C. Solo due fattori di processo mostrano effetti significativi ($p < 0.05$): la potenza e il CC. La presenza di CC migliora la resistenza alla compressione della mela (fig. 52 grafico di Pareto e fig. 53 normal plot degli effetti standardizzati) come ampiamente riportato in letteratura (Garcia & Barrett, 2002; Zhi et al., 2017; Giacalone & Chiabrando, 2018).

Tab. 27 Effetti stimati e coefficienti per la risposta indice di imbrunimento dopo 14 di conservazione

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		21.614	0.294	73.41	0.000	
Time_Ex	-0.459	-0.229	0.294	-0.78	0.438	1.00
T	0.123	0.062	0.294	0.21	0.834	1.00
P	-2.110	-1.055	0.294	-3.58	0.001	1.00
AsA	0.678	0.339	0.294	1.15	0.253	1.00
CC	1.217	0.608	0.294	2.07	0.042	1.00
T*P	-1.626	-0.813	0.294	-2.76	0.007	1.00
P*AsA	-1.459	-0.730	0.294	-2.48	0.015	1.00

P= potenza (W); TimEx= tempo di esposizione agli ultrasuoni in minuti; T=temperatura del mezzo in gradi Celsius; AsA= acido ascorbico in soluzione; CC= cloruro di calcio in soluzione. p-value ≤ 0.05 denota un effetto principale o una interazione statisticamente significativa dei fattori di processo. Il segno che precede i valori in colonna "Effect" indica la direzione dell'effetto: - significa che in presenza del fattore la variabile dipendente diminuisce, + che in presenza del fattore la variabile aumenta.

Un livello più elevato di potenza (400 W), invece, ha un effetto negativo e riduce la resistenza della mela alla compressione, restituendo un campione di mela con maggiore rammollimento.

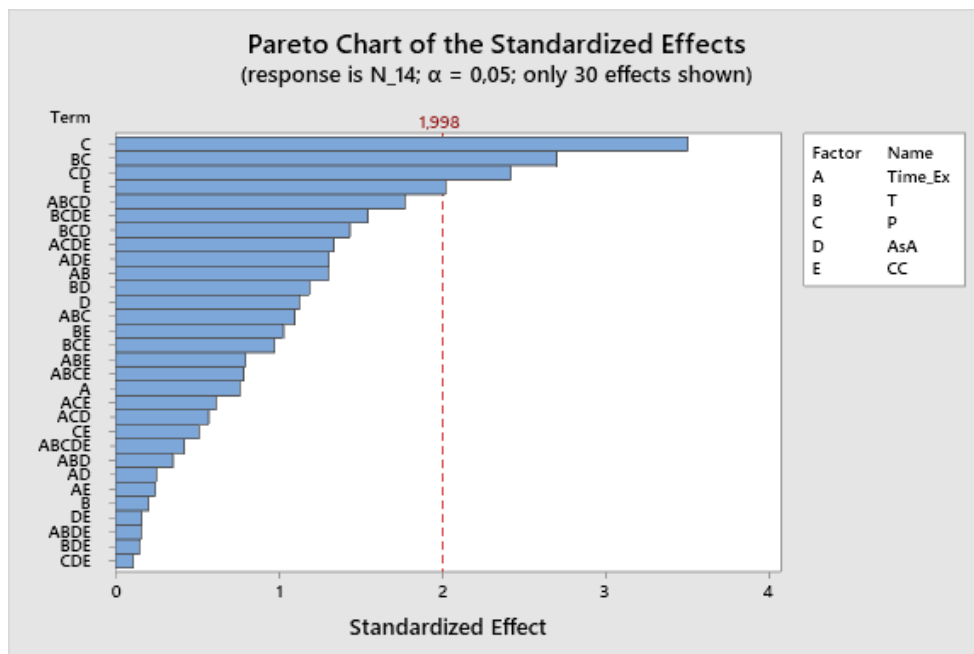


Fig. 52: Grafico di Pareto dei principali effetti e delle interazioni della risposta resistenza alla compressione nel campione dopo 14 giorni di conservazione.

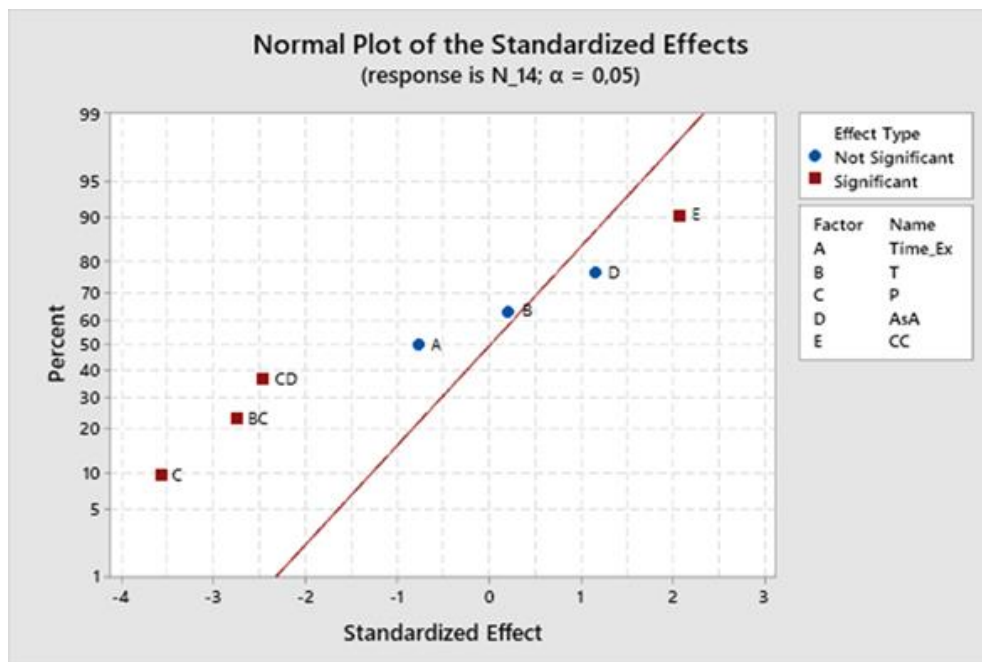


Fig. 53: Normal probability plot degli effetti standardizzati per la resistenza alla compressione 14 giorni dopo il trattamento

A livello superiore emergono solo interazioni a due vie significative. In particolare, un'interazione tra temperatura e potenza e tra potenza e acido ascorbico. Nel primo caso, l'analisi del grafico delle interazioni (fig. 54) mostra che la temperatura a livello più basso (4° C) non presenta valori diversi di resistenza alla compressione (N) in relazione ai livelli di potenza. Se però il processo è condotto a una temperatura di 25 ° C, la potenza di 400 W ha un effetto di buffering con conseguente riduzione della risposta. I 200 W sono più adatti a ottenere un valore più elevato di N in linea con gli obiettivi di processo. Nel caso dell'AsA, invece, la presenza a un livello di potenza più basso (200 W) rende la mela più resistente alla compressione e incrementa la risposta della variabile. Diversamente a 400 W abbassa la risposta della variabile resistenza alla compressione.

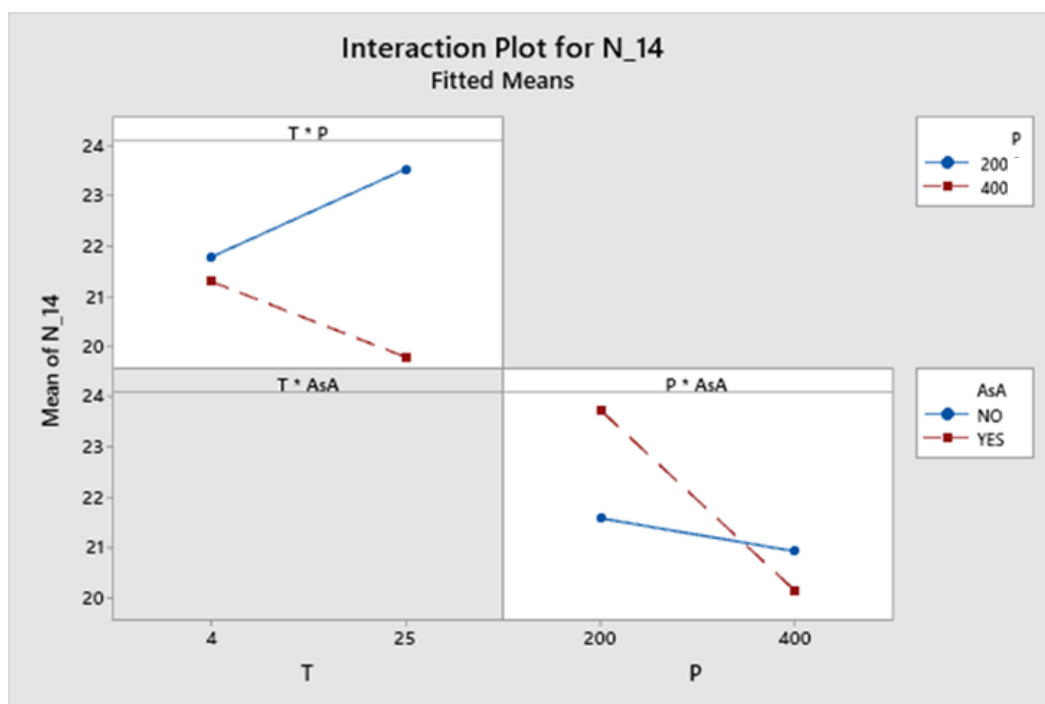


Fig. 54 Interaction plot dei fattori per la risposta indice di imbrunimento dopo 14 giorni di conservazione.

Questi risultati sono in linea con i precedenti risultati sull'indice di imbrunimento. Avevano, infatti, visto che il miglioramento del colore, conseguente a una probabile disattivazione dell'enzima della polifenolossidasi, richiedevano temperature più alte (25° C) o potenze più elevate (400 W) e che la presenza dell'acido ascorbico in soluzione, attenuava gli effetti negativi degli ultrasuoni. In questo caso, a causa dell'effetto cavitazione e dai danni provocati dalla formazione dei microcanali sulla struttura, appare evidente che un trattamento più blando favorisca un esito migliore. Pertanto, temperature e potenza meno elevate e la presenza di acido ascorbico in soluzione, nonché di cloruro di calcio (che ricordiamo ha un effetto principale significativo che si somma agli effetti semplici delle interazioni a due vie), rendono le mele più resistenti alla compressione dopo 14 giorni di conservazione.

5. CONCLUSIONI

Gli esperimenti effettuati dimostrano l'efficacia degli ultrasuoni combinati con un metodo tradizionale, quale il dipping di acido ascorbico al 2% e cloruro di calcio al 1% in soluzione, su caratteristiche di qualità della mela di IV gamma: colore, attività enzimatica e carica microbica totale. Tuttavia, i risultati lontani dagli obiettivi, quali il mantenimento della consistenza della texture nel tempo e la riduzione, già post trattamento, del contenuto di acido ascorbico, richiedono un approfondimento delle relazioni tra i fattori di processo al fine di stabilire una combinazione di parametri ottimale. Il secondo esperimento ha mostrato che la modulazione dei fattori potenza (W), temperatura (T), tempo di esposizione (TimEx) dei campioni agli ultrasuoni è complessa se posta in relazione anche alla presenza di additivi in soluzione. Il cloruro di calcio ha confermato il suo ruolo nel mantenimento della texture del frutto, attraverso un aumento della sua resistenza alla compressione, in combinazione soprattutto all'acido ascorbico, il cui ruolo, però, è stato di agente attenuante degli effetti negativi degli ultrasuoni a potenza di emissione pari a 400 W. Il cloruro di calcio si conferma, inoltre, un additivo efficace per il rallentamento della cinetica di imbrunimento della mela. Diversamente l'acido ascorbico non ha restituito buoni risultati in termine di colore se non in combinazione al cloruro di calcio. È interessante il fatto che il processo condotto a una temperatura ambiente abbia dato esiti favorevoli anche dal punto di vista microbiologico. Questo riduce potenzialmente l'impatto ambientale e i costi di processo, laddove non è richiesta una preventiva refrigerazione dell'acqua prima di effettuare il lavaggio e il dipping (attualmente il processo è condotto a circa 2° C). La riduzione del contenuto di acido ascorbico endogeno ed esogeno nel processo combinato US*DIPP, dimostra che è necessario indagare ulteriori combinazioni a differenti percentuali in soluzione di acido ascorbico per ridurre o contrastare le perdite (si potrebbe ipotizzare un aumento in soluzione, un successivo dipping post trattamento US*DIPP, o un tempo di sosta in vasca post trattamento). L'esperimento, inoltre, a 5 fattori e 2 livelli andrebbe riproposto per misurare le altre variabili di risposta, oggetto di studio della prima fase sperimentale. La variazione in contenuto di acido ascorbico richiede, inoltre, ulteriori approfondimenti per meglio comprendere i meccanismi chimici, fisici o biochimici che ne accelerano la degradazione. Gli ultrasuoni si confermano tecnologia

promettente per la IV gamma ma di complessa regolazione, che richiede ulteriori studi di approfondimento dei meccanismi e delle relazioni tra i molteplici parametri di processo coinvolti.

RINGRAZIAMENTI

Desidero esprimere il mio più sincero e profondo ringraziamento a tutte le persone che hanno contribuito, con il loro supporto e la loro presenza, alla realizzazione di questo lavoro di ricerca. In primo luogo, un sentito ringraziamento al mio tutor, il Prof. Luciano Cinquanta, per la guida, i preziosi consigli e l'incoraggiamento costante che mi ha fornito nel corso di questi anni. Le sue intuizioni e il suo approccio critico hanno rappresentato una fonte inesauribile di crescita professionale e personale.

Un grazie altrettanto grande al mio co-tutor, il Prof. Pellegrino Conte il cui contributo ha arricchito le mie conoscenze e stimolato la mia ricerca. La sua disponibilità e i suoi suggerimenti pratici sono stati fondamentali. Ringrazio di cuore anche il coordinatore del dottorato, Prof. Vincenzo Bagarello, per la sua infinita disponibilità, la gentilezza e il supporto ricevuto durante tutto il percorso. Un sentito grazie anche alla dr.ssa Francesca Mazza per la disponibilità, l'aiuto, la pazienza, la comprensione e i preziosi consigli. Supporto fondamentale al raggiungimento degli obiettivi.

Desidero inoltre esprimere la mia gratitudine al Professore Stefano Barone, il cui supporto metodologico mi hanno permesso di affrontare con maggiore consapevolezza e competenza le sfide statistiche del mio lavoro. I suoi consigli sono stati determinanti per la solidità dei risultati ottenuti.

Un sincero ringraziamento va all'Università di Valencia, e, in particolare, al Professore José Garcia-Perez per avermi offerto l'opportunità di svolgere questa ricerca in un ambiente così stimolante e internazionale, che ha ampiamente contribuito al mio percorso di crescita accademica. Desidero esprimere la mia gratitudine all'Azienda Campo d'Oro, e al Sig. Paolo Licata, per avermi ospitata e per aver reso possibile la realizzazione di questo progetto e arricchito le mie conoscenze pratiche e professionali. Vorrei, infine, ringraziare le persone a me più care: chi mi ha incitato a non arrendermi; i miei amici, la mia famiglia e mio marito che si sono occupati, non senza fatica dei miei tre figli, mentre ero intenta a studiare e soggiornare all'estero. Ringrazio i miei figli per aver spesso rinunciato alle attenzioni della mamma.

A tutti loro questo lavoro è dedicato.

Caterina Li Citra

BIBLIOGRAFIA

- Abe K., Watada, A.E., (1991). Ethylene absorbent to maintain quality of lightly processed fruits and vegetables. *Journal of Food Science*, 56, 1589–1592.
- Adal E., (2020). Microbial inactivation by ultrasound in the food industry Technological Developments in Food Preservation, Processing, and Storage. *IGI Global*, 2020, 86–96.
- Aguayo, E., Escalona, V., Artés, F., (2006). Metabolic Behavior and Quality Changes of Whole and Fresh Processed Melon. *Journal of Food Science*, 69, SNQ148–SNQ155. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb06356.x>.
- Akram N.A., Shafiq F., Ashraf M., (2017). Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 8, 613.
- Almeida D. P. F., Huber D. J., (1999). Apoplastic pH and inorganic ion levels in tomato fruit: A potential means for regulation of cell wall metabolism during ripening. *Physiologia Plantarum*, 105(3), 506–512. <https://doi.org/https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.105316.x>.
- Altekruse S. F., Cohen M. L., Swerdlow, D. L., (1997). Emerging foodborne diseases. *Emerging infectious diseases*, 3(3), 285–293. <https://doi.org/10.3201/eid0303.970304>.
- Amiot M. J., Tacchini M., Aubert S., Nicolas J., (1992). Phenolic Composition and Browning Susceptibility of Various Apple Cultivars at Maturity. *Journal of Food Science*, 57(4), 958–962. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb14333.x>.
- Andani Z., Jaeger S.R., Wakeling I., Macfie H.J.H., (2001). Mealiness in apples: towards a multilingual consumer vocabulary. *Sensory and Nutritive Qualities of Food* 66, 872–879.
- Arnold M., Gramza-Michałowska A., (2022). Enzymatic browning in apple products and its inhibition treatments: A comprehensive review. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 21(6), 5038–5076. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13059>.
- Azoubel M., Baima M.d.A.M., Amorim M.d.R., Oliveira S.S.B., (2010). Effect of ultrasound on banana cv Pacovan drying kinetics, *Journal of Food Engineering* 97, 194–198.
- Batth R., Singh K., Kumari S., Mustafiz A., (2017). Transcript profiling reveals the presence of abiotic stress and developmental stage specific ascorbate oxidase genes in plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 198.

- Beaulieu J.C., Lea J.M., (2007). Quality changes in cantaloupe during growth, maturation, and in stored fresh-cut cubes prepared from fruit harvested at various maturities. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132, 720–728.
- Beaulieu J., (2011). *Factors Affecting Sensory Quality of Fresh-Cut Produce*, 115–143. <https://doi.org/10.1201/b10263-6>.
- Bett K. L., Ingram D. A., Grimm C. C., Lloyd S. W., Spanier A. M., Miller J. M., Gross K. C., Baldwin E. A., Vinyard B. T., (2001). Flavor of fresh-cut gala apples in barrier film packaging as affected by storage time. *Journal of Food Quality*, 24(2), 141–156. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2001.tb00597.x>.
- Bi X., Hemar Y., Balaban M. O., Liao X., (2015). The effect of ultrasound on particle size, color, viscosity and polyphenol oxidase activity of diluted avocado puree. *Ultrasonics Sonochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.04.011>
- Bondonno N. P., Bondonno C. P., Ward N. C., Hodgson J. M., Croft K. D., (2017). The cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. isolated compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 243–256. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.012>.
- Boyette M. D., Ritchie D. F., Carballo S. J., Blankenship S. M., Sanders, D. C., (1993). Chlorination and Postharvest Disease Control. *HortTechnology Horttech*, 3(4), 395–400. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.3.4.395>.
- Bradford M. M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Brennen C.H., (1995). Phase change, nucleation and cavitation. in cavitation and bubble dynamics. *Oxford University Press*, 15–47.
- Caleb O. J., Mahajan P. V., Al-Said F. A.-J., Opara, U. L., (2013). Modified atmosphere packaging technology of fresh and fresh-cut produce and the microbial consequences—A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(2), 303–329. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0932-4>.
- Cárcel P.J., Garcia-Perez, J., Riera E., Mulet A., (2011). Improvement of convective drying of carrot by applying power ultrasound—influence of mass load density, *Drying Technology*, 29, 174–182.
- Cavicchi T.J, O'Brien W.D., (1985). Heating distribution colour graphics for homogenous lossy spheres. *Transactions on Sonics and Ultrasonics*, 32(1), 17–25;
- Clover D., Atwill, E., (1997). Research and reason can minimize foodborne and waterborne illnesses. *California Agriculture*, 51, 8–14. <https://doi.org/10.3733/ca.v051n02p8>.

- Cocci E., Rocculi P., Romani S., Dalla Rosa M., (2006). Changes in nutritional properties of minimally processed apples during storage. *Postharvest Biol. Technol.* 39, 265–271.
- Colelli G., Elia A., (2009). I prodotti ortofrutticoli di IV gamma: Aspetti fisiologici e tecnologici. *Italus Hortus*, 16, 55–78.
- Costa M.G.M., Fonteles T.V., de Jesus A.L.T., Almeida F.D.L., de Miranda M.R.A., Fernandes F.A.N., Rodrigues S., (2013). High-intensity ultrasound processing of pineapple juice, *Food Bioprocess Technology*, 6, 1997–1006.
- Degl'Innocenti E., Guidi L., Pardossi A., Tognoni F., (2006). Biochemical study of leaf browning in minimally processed leaves of lettuce (*Lactuca sativa* l. var. *Acephala*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9980–9984. <https://doi.org/10.1021/jf050927o>.
- Dehghani M.H., (2005). Effectiveness of ultrasound on the destruction of *E. coli*. *American Journal of Environmental Sciences*, 1, 187–189.
- Demirdoven A., Baysal T., (2008). The use of ultrasound and combined technologies in food preservation, *Food Reviews International*. 25(1), 1–11.
- Deutch C. E., (2018). Browning in apples: Exploring the biochemical basis of an easily-observable phenotype. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 46(1), 76–82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bmb.21083>.
- Didenko Y.T, Suslick K.S., (2002). The energy efficiency of formation of photons, radicals, and ions during single bubble cavitation. *Nature* 418, 394–397.
- El-Shimi N.M. (1993). Control of enzymatic browning in apple slices by using ascorbic acid under different conditions. *Plant Foods for Human Nutrition*, 43(1):71-6. doi: 10.1007/BF01088098. PMID: 8464847.
- Farris G. A., Gobbetti M., Neviani E., Vincenzini M., (2012) *Microbiologia dei prodotti alimentari. Casa Editrice Ambrosiana.*
- Foyer C.H., Halliwell B., (1976). Presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts—Proposed role in ascorbic-acid metabolism. *Planta*, 133, 21–25.
- Fuente-Blanco de la S., Riera-Franco de Sarabia E., Acosta-Aparicio V.M., Blanco-Blanco A., Gallego-Juárez J.A., (2006). Food drying process by power ultrasound. *Ultrasonics*, 44(1), 523-527.
- Gamboa-Santos J., Montilla A., Cárcel J.A., Villamiel M., Garcia-Perez J.V., (2014) Airborne ultrasound application in the convective drying of strawberry. *Journal of Food Engineering* 128, 132–139.

- Garcia E, Barrett D., (2002). Preservative Treatments for Fresh-Cut Fruits and Vegetables. 10.1201/9781420031874.ch9.
- Garrett E. H., Gorny J. R., Beuchat L. R., Farber J. N., Harris L. J., Parish M. E., Suslow T. V, Busta F. F., (2003). Microbiological safety of fresh and fresh-cut produce: description of the situation and economic impact. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 13–37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00029.x>.
- Giacalone G., Chiabrandò V., (2018). Fresh-cut apple: Effect of CaCl₂ dips on firmness and quality. *Acta Horticulturae*, 1209, 95–102. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1209.14>.
- Gil M. I., Aguayo E., Kader A. A., (2006). Quality changes and nutrient retention in fresh-cut versus whole fruits during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4284–4296. <https://doi.org/10.1021/jf060303y>.
- Gomes B. A. F., Alexandre A. C. S., de Andrade G. A. V., Zanzini, A. P., de Barros, H. E. A., dos Santos Ferraz e Silva L. M., Costa P. A., de Barros Vilas Boas E. V., (2023). Recent advances in processing and preservation of minimally processed fruits and vegetables: A review – Part 2: Physical methods and global market outlook. *Food Chemistry Advances*, 2, 100304. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100304>.
- Gómez-López Vicente, Orsolani, L., Martínez-Yépez, A., Tapia, Maria. (2010)., Microbiological and sensory quality of sonicated calcium-added orange juice. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 808-813.
- Gross J., (1987). Carotenoids: Pigments in fruits (London, UK: London Academic Press).
- Guo X., Li Q., Luo T., Han D., Zhu D., Wu Z., (2023) Postharvest Calcium Chloride Treatment Strengthens Cell Wall Structure to Maintain Litchi Fruit Quality. *Foods* (Basel, Switzerland), 12(13), 2478. <https://doi.org/10.3390/foods12132478>.
- Hang G., Chen S., Dai C., Sun L., Sun W., Tang Y., Xiong F., He R., Ma H., (2017) Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. *Ultrasonics Sonochemistry* 37, 144-149. ISSN 1350-4177, <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.12.018>.
- Harker F. R., Sutherland, P. W., (1993). Physiological changes associated with fruit ripening and the development of mealy texture during storage of nectarines. *Postharvest Biology and Technology*, 2(4), 269–277. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0925-5214\(93\)90032-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0925-5214(93)90032-X).
- Harker F.R., Redgwell R.J., Hallett I.C., Murray S.H., Carter G., (1997). Texture of fresh fruit. *Horticulture-Reviews*. 20, 121–224.

- Harker F.R., Stec M.G.H., Hallett I.C., Bennett C.L., (1997b). Texture of parenchymatous plant tissue: a comparison between tensile and other instrumental and sensory measurements of tissue strength and juiciness. *Postharvest Biology and Technology* 11, 63–72.
- Hodges D., Toivonen, P., (2008). Quality of fresh-cut fruits and vegetables as affected by exposure to abiotic stress. *Postharvest Biology and Technology*, 48, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.10.016>.
- Holderbaum D., Kon, T., Kudo, T., Guerra M., (2010). Enzymatic browning, polyphenol oxidase activity, and polyphenols in four apple cultivars: dynamics during fruit development. *HortScience*, 45, 1150–1154. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.8.1150>
- Hosek G., Lechinsky D., Irons S., Safranek T.J., (1996). Multidrug-resistant Salmonella serotype Typhimurium–United States, *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 46, 308–310.
- Hrazdina G., Wagner G.J., (1985). Compartmentation of plant phenolic compounds: Sites of synthesis and accumulation. *Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*. 25, 133–199.
- Hutchings J. B., (1977). The importance of visual appearance of foods to the food processor and the consumer. *Journal of Food Quality*, 1(3), 267–278. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.1977.tb00945.x>.
- Iqbal A., Murtaza A., Marszałek K., Iqbal M. A., Chughtai M. F. J., Hu W., (2020). Inactivation and structural changes of polyphenol oxidase in quince (*Cydonia oblonga* Miller) juice subjected to ultrasonic treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10229>.
- Islam M.N., Zhang M., Adhikari B., (2014). The inactivation of enzymes by ultrasound—a review of potential mechanisms. *Food Reviews International* 30, 1–21.
- Iwasa, M., Makino S.I., Asakura H., Kobori H., Morimoto Y., (1999). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 from musca domestica (diptera: muscidae) at a cattle farm in japan. *Journal of Medical Entomology*, 36(1), 108–112. <https://doi.org/10.1093/jmedent/36.1.108>.
- Jambrak A.R., Šimunek M., Evačić S., Markov K., Smoljanić G., Frece J., (2018). Influence of high-power ultrasound on selected moulds, yeasts and Alicyclobacillus acidoterrestris in apple, cranberry and blueberry juice and nectar, *Ultrasonics* 83, 3–17.
- Jang, J.H, Kim, S.T., Moon D., (2009). Inhibitory Effects of Ultrasound in Combination with Ascorbic Acid on Browning and Polyphenol Oxidase Activity of Fresh-cut Apples. *Food Science and Biotechnology*. 18. 1417-1422.

- Jang, J.H., Moon, K.D., (2011). Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid. *Food Chemistry*. 124, 444–449.
- Jeong, J., Brecht, J.K., Huber, D.J., Sargent, S.A., (2004). 1-Methylcyclopropene (1-MCP) for maintaining texture quality of fresh-cut tomato. *Hort Science* 39, 1359–1362.
- Kaintz, C., Mauracher, S. G., Rompel, A., (2014). Chapter One - Type-3 Copper Proteins: Recent Advances on Polyphenol Oxidases. In C. Z. Christov (Ed.), *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 97, 1–35. Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.07.001>.
- Karaseva E., Metelitzka D., (2006). Stabilization of glucoso-6-phosphate dehydrogenase by its substrate and cofactor in an ultrasonic field, Russ. *Journal of Bioorganic Chemistry*. 32, 436–443.
- Kolodziejczyk, K., Milala, J., Sójka, M., Kosmala, M., Markowski, J., (2010). Polyphenol oxidase activity in selected apple cultivars. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 18, 1–11.
- Lanciotti, R., Corbo, M. R., Gardini, F., Sinigaglia, M., Guerzoni, M. E., (1999). Effect of hexanal on the shelf life of fresh apple slices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), 4769–4776. <https://doi.org/10.1021/jf990611e>.
- Langer S., Marina M., Burgos J., Martínez G., Civello P., Villarreal N., (2019). Calcium chloride treatment modifies cell wall metabolism and activates defense responses in strawberry fruit (*Fragaria × ananassa*, Duch) *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99.
- Lauterborn W., Bolle H., (1975). Experimental investigations of cavitation-bubble collapse in the neighbourhood of a solid boundary. *Journal of Fluid Mechanics*, 72, 391–399.
- Lee S. K., Kader A. A., (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20(3), 207–220. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00133-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00133-2).
- León J., Rojo E., Sánchez-Serrano, J. J., (2001). Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 52(354), 1–9. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.354.1>.
- Lešková E., Kubíková J., Kováčiková E., Košická M., Porubská J., Holčíková, K., (2006). Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(4), 252–276. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.04.014>.
- Li Y., Chu Z.N., Luo J.Y., Zhou Y.H., Cai Y.J., Lu Y.G., Xia J.H., Kuang H.H., Ye Z.B., Ouyang B., (2018). The C₂H₂ zinc-finger protein SlZF3 regulates asa synthesis

- and salt tolerance by interacting with CSN5B. *Plant Biotechnology. Journal.*,16, 1201–1213.
- Liu S., Liu Y., Huang X., Yang W., Hu W., Pan, S., (2017). Effect of ultrasonic processing on the changes in activity, aggregation and the secondary and tertiary structure of polyphenol oxidase in oriental sweet melon (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(4), 1326–1334. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7869>.
- Lozowicka B., Jankowska M., Hrynko I., Kaczynski P., (2016). Removal of 16 pesticide residues from strawberries by washing with tap and ozone water, ultrasonic cleaning and boiling, *Environmental Monitoring and Assessment*. 188, 51.
- Magri A., Cice D., Capriolo G., Petriccione M., (2022). Effects of Ascorbic Acid and Melatonin Treatments on Antioxidant System in Fresh-Cut Avocado Fruits During Cold Storage. *Food and Bioprocess Technology*, 15, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02892-3>.
- Mason T.J., Paniwnyk L., Chemat F., (2003). Ultrasound as a preservation technology. *Food Preservation Techniques*, 303–337.
- Mccabe C., Kim D., King K., (2018). Improving Present Practices in the Visual Display of Interactions. *Advances in Methods and Practices in Psychological Science*. 1. 10.1177/2515245917746792.
- Mehta R.A., Parsons B.L., Mehta A.M., Nakhasi H.L., Mattoo A.K., (1991). Differential protein metabolism and gene expression in tomato fruit during wounding stress. *Plant and Cell Physiology*, 32, 1057–1065.
- Mellidou I.; Koukounaras A., Kostas, S., Patelou, E., Kanellis A.K., (2021). Regulation of vitamin C accumulation for improved tomato fruit quality and alleviation of abiotic stress. *Genes*, 12, 694.
- Miano A. C., Ibarz A., Duarte Augusto P.E., (2016). Mechanisms for improving mass transfer in food with ultrasound technology: Describing the phenomena in two model cases. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 413-419.
- Min, K., Chen, K., Arora, R. A., (2020).Metabolomics study of ascorbic acid-induced in situ freezing tolerance in spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Direct*, 4.
- Muzaffar S., Ahmad M., Wani S.M., Gani A., Baba W.N., Shah U., Khan A.A., Masoodi F.A., Gani A., Wani T.A., (2016). Ultrasound treatment: effect on physicochemical, microbial and antioxidant properties of cherry (*Prunus avium*). *Journal of Food Science and Technology*, 53(6), 2752-9. doi: 10.1007/s13197-016-2247-3.

- Nguyen-the C., Carlin, F., (1994). The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(4), 371–401. <https://doi.org/10.1080/10408399409527668>.
- Nicolas J.J., Richard-Forget F.C., Goupy P.M., Amiot M.J., Aubert S.Y., (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(2), 109–157.
- Ojha K.S., Mason T.J., O'Donnell C.P., Kerry J.P., Tiwari B.K., (2017). Ultrasound technology for food fermentation applications, *Ultrasonics Sonochemistry*. 34, 410–417.
- Pagnossa P., Rocchetti G., Ribeiro A.C., Piccoli R.H., Lucini L., (2020). Ultrasound: Beneficial biotechnological aspects on microorganisms-mediated processes, *Current Opinion in Food Science*, 31, 24–30.
- Pathare P. Opara U., Al Said F., (2013). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food and Bioprocess Technology*. 10.1007/s11947-012-0867-9.
- Paul R.E., Chen W., (1997). Minimal processing of papaya (*Carica papaya L.*) and the physiology of halved fruit. *Postharvest Biology Technology*, 12, 93–99.
- Perin E.C., Messias R.D., Borowski J.M., Crizel R.L., Schott I.B., Carvalho I.R., Rombaldi C.V.; Galli V., (2019). Aba-dependent salt and drought stress improve strawberry fruit quality. *Food Chemistry*, 271, 516–526.
- Petriccione M., Pagano L., Forniti R., Zampella L., Mastrobuoni F., Scortichini M., Mencarelli F., (2018). Postharvest treatment with chitosan affects the antioxidant metabolism and quality of wine grape during partial dehydration. *Postharvest Biology and Technology*, 137, 38–45. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.11.010>.
- Pizzocaro F., Torreggiani D., Gilardi G., (1993). Inhibition of apple polyphenoloxidase by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride. *Journal of Food Processing and Preservation*, 17, 21–30.
- Ponting J., Jackson R., Watters G., (2006). Refrigerated apple slices: Preservative effects of ascorbic acid, calcium and sulfites. *Journal of Food Science*, 37, 434-436.
- Pollard J., Kirk S. F. L., Cade J. E., (2002). Factors affecting food choice in relation to fruit and vegetable intake: a review. *Nutrition Research Reviews*, 15(2), 373–387. <https://doi.org/DOI: 10.1079/NRR200244>.
- Portela S., Cantwell M., (2001). Cutting blade sharpness affects appearance and other quality attributes of fresh-cut cantaloupe melon. *Journal of Food Science*, 66, 1265–1270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15199.x>.

- Portenlänger G., Heusinger H., (1997). The influence of frequency on the mechanical and radical effects for the ultrasonic degradation of dextrans. *Ultrasonics Sonochemistry* 4(2), 127–130.
- Putnik P., Bursać Kovačević D., Herceg K., Levaj B., (2017). Influence of antibrowning solutions, air exposure, and ultrasound on color changes in fresh-cut apples during storage. *Journal of Food Process and Preservation* 41. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13288>.
- Ordonez-Santos L. E, Martinez-Giron J., Arias-Jaramillo M.E., (2017) Effect of ultrasound treatment on visual color, vitamin C, total phenols, and carotenoids content in Cape gooseberry juice. *Food Chemistry*, 233, 96–100.
- Queiroz C., Silva A., Lopes M. L. M., Fialho E., Valente-Mesquita V. L., (2011). Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) after processing. *Food Chemistry*, 125, 128-132.
- Ragaert P., Verbeke W., Devlieghere F., Debevere J., (2004). Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits. *Food Quality and Preference*, 15(3), 259–270. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(03\)00066-1](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(03)00066-1)
- Rajewska K., Mierzwa D., (2017). Influence of ultrasound on the microstructure of plant tissue. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 43, 117–129.
- Rajamma S. B., Kalampalath Raj A, V., Eapen S.J., (2021) Elucidation of Antibacterial Effect of Calcium Chloride against *Ralstonia Pseudosolanacearum* Race 4 Biovar 3 Infecting Ginger (*Zingiber Officinale* Rosc.). *Archives of Microbiology* 203, 66.
- Riera E., Golas Y., Blanco A., Gallego J., Blasco M., Mulet A., (2004). Mass transfer enhancement supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry* 11, 241–244.
- Rodríguez O., Santacatalina J.V., Simal S., Garcia-Perez J.V., Femenia A., Rosselló C., (2014). Influence of power ultrasound application on drying kinetics of apple and its antioxidant and microstructural properties, *Journal Food Engineering*, 129, 21-29.
- Roig M.G., Rivera Z.S., Kennedy J.F., (1995) A model study on rate of degradation of L-ascorbic acid during processing using home-produced juice concentrates. *International journal of food sciences and nutrition*, 46(2): 107–115.
- Rosen J.C., Kader A.A., (1989). Postharvest physiology and quality maintenance of sliced pear and strawberry fruits. *Journal of Food Science* 54, 656–659.

- Rupasinghe H.P.V., Murr D.P., DeEll J.R., Odumeru J., (2005). Influence of 1-methylcyclopropene and NatureSeal on the quality of fresh-cut “*Empire*” and “*Crispin*” apples. *Journal of Food Quality* 28, 289–307.
- Seymour J.D., Gupta R.B., (1997). Oxidation of aqueous pollutants using ultrasound: Salt-induced enhancement. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 36(9), 3453– 3457.
- Shackel, K. A., Greve C., Labavitch J. M., Ahmadi H., (1991). Cell Turgor Changes Associated with Ripening in Tomato Pericarp Tissue. *Plant Physiology*, 97(2), 814–816. <https://doi.org/10.1104/pp.97.2.814>.
- Smirnoff N., (2018), Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 116–129.
- Soliva-Fortuny R.C., Grigelmo-Miguel N., Odriozola-Serrano I., Gorinstein S., MartínBelloso O., (2001). Browning evaluation of ready-to-eat apples as affected by modified atmosphere packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3685–3690.
- Soliva-Fortuny R.C., Oms-Oliu G., Martín-Belloso O., (2002). Effects of ripeness stages on the storage atmosphere, color, and textural properties of minimally processed apple slices. *Journal of Food Science*, 67(5), 1958–1963;
- Soliva-Fortuny R.C., Grigelmo-Miguel, N., Hernando I., Lluch M.A., Martin-Belloso O., (2002). Effect of minimal processing on the textural and structural properties of fresh-cut pears. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture*, 82, 682–1688;
- Soliva-Fortuny R., Martin-Belloso, O. (2003). New advances in extending the shelf-life of fresh-cut fruits: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 14, 341–353. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(03\)00054-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(03)00054-2).
- Sun Y., Zhong L., Cao L., Lin W., Ye X., (2015). Sonication inhibited browning but decreased polyphenols contents and antioxidant activity of fresh apple (*Malus pumila* mill, cv. Red Fuji) juice, *Journal of Food Science and Technolgy* 52.
- Tiehm A., Nickel K., Zellhorn M., Neis U., (2001). Ultrasonic waste activated sludge disintegration for improving anaerobic stabilization. *Water Research*, 35(8), 2003–2009.
- Toivonen P. M. A., Brummell, D. A., (2008). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 48(1), 1–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.09.004>
- Truffault V., Fry S.C., Stevens R.G., Gautier H., (2017). Ascorbate degradation in tomato leads to accumulation of oxalate, threonate and oxalyl threonate. *The Plant Journal*, 89, 996–1008.

- Turatti A., (2007). Sanitation design of fresh-cut processing and plant processing. *Acta Horticulturae*, 746, 147–158. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.746.17>.
- Vieira R., Alves de Sousa K., Monteiro A., Pinto L., Castro-Gamboa I., (2021). Induction of metabolic variability of the endophytic fungus *Xylaria* sp. by OSMA approach and experimental design. *Archives of Microbiology*, 203. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02283-w>.
- Vollmer A.C., Kwakye S., Halpern M., Everbach E.C., (1998). Bacterial stress responses to 1-megahertz pulsed ultrasound in the presence of microbubbles. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 64(10), 927–931.
- Wang F., Wang Y., Ji M., (2005). Mechanisms and kinetics models for ultrasonic waste activated sludge disintegration. *Journal of Hazardous Materials*, 123(1–3), 145–150.
- Waldron K. W., Parker M. L., Smith A. C., (2003). Plant cell walls and food quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 101–119.
- Walker J. R. L., (1977). Enzymatic browning in foods. Its chemistry and control. *Food Technology, NZ*, 12, 19-25.
- Waqas Iqbal, M., Iqbal Malik, A., Babar Ramzan M., Saad Memon M., Irshad Mari S., Salman Habib M., (2024). Consumer response to adjustable price and shelf-life of fresh food products under effective preservation policy. *Computers & Industrial Engineering*, 188, 109897. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cie.2024.109897>.
- Wheeler G.L., Jones M.A., Smirnoff N. (1998). The biosynthetic pathway of vitamin c in higher plants. *Nature*, 393, 365–369.
- Wu S., Nie Y., Zhao J., Fan B., Huang X., Li X., Sheng J., Meng D., Ding Y., Tang X., (2018). The synergistic effects of low-concentration acidic electrolyzed water and ultrasound on the storage quality of fresh-sliced button mushrooms, *Food and Bioprocess Technology*, 11, 314–323.
- Xu Y., Wang D., Zhao W., Zheng Y., Wang Y., Wang P., Ma Y., Zhao, X., (2022). Low frequency ultrasound treatment enhances antibrowning effect of ascorbic acid in fresh-cut potato slices. *Food chemistry*, 380, 132190. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132190>
- Yeoh W.K., Ali A., (2017). Ultrasound treatment on phenolic metabolism and antioxidant capacity of fresh-cut pineapple during cold storage, *Food Chemistry*, 216, 247–253.
- Yildiz G., Izli G., Aadil R.M., (2020). Comparison of chemical, physical, and ultrasound treatments on the shelf life of fresh-cut quince fruit (*Cydonia oblonga* Mill.). *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(3), 14366.
- Yu Y.B., Yang, S. F.. (1980). Biosynthesis of Wound Ethylene 1. *Plant Physiology*, 66(2), 281–285. <https://doi.org/10.1104/pp.66.2.281>.

Zhi H., Liu Q., Xu J., Dong Y., Liu M., Zong W., (2017). Ultrasound enhances calcium absorption of jujube fruit by regulating the cellular calcium distribution and metabolism of cell wall polysaccharides. *Journal of the science of food and agriculture*, 97(15), 5202–5210.



La borsa di dottorato è stata cofinanziata con risorse del
Programma Operativo Nazionale Ricerca e Innovazione 2014-2020, risorse FSE REACT-EU
Azione IV.4 “Dottorati e contratti di ricerca su tematiche dell’innovazione”
e Azione IV.5 “Dottorati su tematiche Green”