



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DELLA
Tuscia



Dipartimento di economia, ingegneria, società e impresa (DEIM)

Dipartimento di scienze agrarie e forestali (DAFNE)

Dottorato in

Engineering for Energy and Environment

Curriculum: Biosystem and Environment

XXXII- Ciclo

Smart drying: Qualità e sostenibilità nei processi di disidratazione

Settore Scientifico Disciplinare AGR/09 – Meccanica Agraria

Coordinatore e Tutor

Prof. Danilo Monarca

Co-Tutor

Prof. Riccardo Massantini

Dottoranda

Dott.ssa Serena Ferri

Anno accademico 2019/2020

Sommario

1.0 Introduzione	1
1.1 Disidratazione	1
1.2 Tecniche di disidratazione	2
1.3.1 Metodi di essiccamento in cui l'acqua è rimossa per evaporazione	3
1.3.2 Disidratazione per convezione	3
1.3.4 Disidratazione per irraggiamento	5
1.3.5 Disidratazione per sublimazione (liofilizzazione o freeze-drying)	5
1.3.6 Disidratazione per osmosi	6
2.0 Pretrattamenti alla disidratazione	6
2.1 Immersione in soluzioni (dipping)	7
2.2 Pretrattamenti di scottatura (Blanching)	7
2.3 Impregnazione sottovuoto (Vacuum impregnation technology)	8
2.4 Film edibili	9
3.0 Effetti della disidratazione sulla qualità dell'alimento	9
3.1 Caratteristiche fisiche	10
3.2 Capacità di reidratazione	12
3.3 Caratteristiche chimiche	13
3.3.1 Attività dell'acqua e stabilità chimica	14
3.4 Caratteristiche nutrizionali	17
3.4.1 Analisi sensoriale	18
4.0 Tecnologie smart drying	18
4.1 Modelli matematici: <i>Costruzione dei modelli di disidratazione</i>	19
4.2 Modelli matematici per la disidratazione a strato sottile	21
4.3 Modelli semi-teorici usati nelle sperimentazioni	23
5.0 Scopo	24
6.1 Preparazione dei campioni	25
6.2 Pretrattamenti	26
6.2.1 Attività 1: carote varietà Romance	26
6.2.2 Attività 2:	26
6.2.3 Attività 3	28
6.3 Processo di disidratazione	29
6.3.1 Attività 1	30
6.3.2 Attività 2	30
6.3.3 Attività 3	30
6.4 Campionamenti	30
6.5 Determinazioni analitiche	31
6.5.1 Metodiche analitiche	32
6.5.2 Analisi del processo di reidratazione	35
6.6 Analisi statistica	35
7.0 Risultati e discussione	40
7.1 Attività 1	40
7.1.1 Analisi del test di blanching e inattivazione enzimatica	40
7.1.2 Analisi d'immagine a seguito dell'effetto del trattamento di blanching	43
7.1.3 Contenuto di carotenoidi a seguito dell'effetto del trattamento di Blanching	43

7.1.4 Risultati disidratazione.....	46
7.1.5 <i>Contenuto dei carotenoidi</i>	51
7.1.6 Sviluppo dei modelli di regressione.....	52
7.2 Attività 2	74
7.2.1 Analisi del processo di disidratazione.....	74
7.2.2 Sviluppo di modelli semi teorici del processo di disidratazione.....	77
7.2.3 Reidratazione delle rondelle di carota.....	79
7.2.4 Contenuto in fenoli totali	82
7.2.6 Analisi colorimetrica.....	87
7.3 Attività 3	90
7.3.1 Effetti dei pretrattamenti sui campioni non disidratati (Tempo zero).....	90
7.3.2 Effetti dei pretrattamenti sui campioni disidratati.....	98
7.3.3 Effetti dei pretrattamenti sul processo di disidratazione	105
8.0 Conclusioni	108
8.1 Attivita1	108
8.2 Attività 2	109
8.3 Attività 3	110
9.0 Pubblicazioni prodotte	112
9.1 Real-Time Monitoring of organic carrot (var. Romance) during hot-air drying using Near-Infrared Spectroscopy.....	112
9.2 Real-time monitoring of organic apple (var. Gala) during hot-air drying using near infrared spectroscopy	137
9.3 Effects of hot-water and steam blanching of sliced potato on polyphenol oxidase activity.....	162
10.0 Pubblicazioni in fase di stesura	179
10.1 Application of low-cost RGB sensor to detect basil (<i>Ocimum basilicum</i> L.) nutritional status at pilot scale level	179
10.2 Preliminary investigation on systems for the preventive diagnosis of agricultural operating machines	207
11.0 Bibliografia	216

1.0 Introduzione

Per assecondare le nuove esigenze del settore alimentare, sempre più in crescente espansione, come la richiesta di maggior sicurezza e la necessità di prolungare i tempi di conservazione degli alimenti, o il bisogno di facilitare i trasporti, i processi di disidratazione si sono rivelati una valida proposta. Tali processi, si avvalgono di caratteristiche dinamiche e non lineari, influenzate dalla matrice alimentare di riferimento e dalle proprietà operative ed ambientali a cui si opera. Ovviamente, questi fattori hanno un impatto sulle caratteristiche qualitative ed organolettiche, nutrizionali e funzionali e, di conseguenza, hanno un impatto sul giudizio finale ad opera dei consumatori. Inoltre, il processo di disidratazione richiede una notevole quantità di energia, causando, inevitabilmente, una contribuzione al cambiamento climatico. Per questo motivo, sempre più studiosi stanno cercando di trovare delle valide soluzioni che possano minimizzare la richiesta di energia da parte del processo, senza inficiarne le normali condizioni operative. Lo “smart dryng” è una tecnica di disidratazione emergente, che mira proprio ad attenuare il problema della cospicua richiesta di energia da parte della disidratazione classica, tramite l’uso di sensori e tecnologie non distruttive, che mirano a migliorare l’efficienza del processo stesso. Il progetto di dottorato mira proprio ad implementare sistemi “smart” di monitoraggio e controllo dei parametri di disidratazione (temperatura, velocità dell’aria ed umidità relativa) e della qualità del prodotto durante il processo, basati sull’impiego di tecnologie non distruttive quali l’analisi di immagine e la spettroscopia Vis-NIR (puntiforme ed iperspettrale). Tale approccio sarà applicato alla disidratazione di alcuni prodotti ortofrutticoli di origine biologica. Il fine sarà quello di ottimizzare il processo di disidratazione, riducendo il consumo energetico e massimizzando la qualità del prodotto finito. A tale scopo, verranno [1] individuati pretrattamenti prodotto specifici per stabilizzare il prodotto durante il processo e [2] monitorati i cambiamenti chimici, fisici e fisico chimici del prodotto (contenuto di umidità, attività dell’acqua, solidi solubili, acidità titolabile, contenuto fenolico, attività antiossidante, consistenza e cambiamenti di colore) durante il processo, in funzione dei pretrattamenti selezionati e dei parametri di processo adottati (temperatura, velocità dell’aria e umidità relativa). L’attività progettuale si occuperà inoltre del trasferimento del sistema di monitoraggio e controllo su un prototipo di essiccatore.

1.1 Disidratazione

Tra i metodi più antichi di conservazione degli alimenti si annovera la disidratazione, un’operazione unitaria che, con l’applicazione di un flusso termico in condizioni controllate, permette la rimozione della maggior parte di acqua contenuta in un alimento (Fellows P. J., 2000).

Obiettivo principale del processo di disidratazione è il prolungamento della shelf-life dell'alimento, tramite la riduzione del contenuto di acqua. Infatti, diminuendo l'umidità dell'alimento si inibiscono la crescita e la riproduzione dei microrganismi, si riduce l'attività enzimatica e si rallentano così eventuali reazioni di degradazione. Altri vantaggi di un processo di essiccazione riguardano la riduzione del peso, del volume e delle dimensioni del prodotto finito. Ciò ne facilita il trasporto e lo stoccaggio e comporta una riduzione dei costi di packaging ed una diversificazione alimentare, offrendo un'alternativa al consumo di prodotti freschi (Guine R. P. F., 2008; Lewicki P. P., 2006; Fellows P. J., 2000).

Tra gli svantaggi del processo di disidratazione si elencano: variazione della forma (shrinkage), variazione del colore (imbrunimento), del flavour, della texture, delle proprietà nutrizionali e della capacità di reidratazione dell'alimento. Per minimizzare tali aspetti negativi ed ottenere un prodotto disidratato di qualità, bisogna definire le condizioni operative ottimali e quindi è necessario conoscere il meccanismo con cui avviene il processo (Guine R. P. F., 2006; Lewicki P. P., 2006). Il processo, spesso molto complesso, si divide in due fasi che avvengono contemporaneamente:

- trasferimento di calore, caratterizzato da un flusso termico (per convezione, conduzione, irraggiamento o un mix di questi) proveniente dall'ambiente esterno e diretto verso l'alimento, che provoca l'evaporazione dell'acqua, fino al raggiungimento dell'equilibrio;
- trasferimento di materia, caratterizzato da un flusso di acqua che permea attraverso la matrice solida (in forma liquida o vapore) fino alla superficie dell'alimento, verso l'ambiente esterno (sottoforma di vapore acqueo).

Questi due processi di trasferimento di energia e di massa influenzano fortemente la velocità del processo di disidratazione. Il movimento dell'acqua all'interno dell'alimento dipende dalle sue caratteristiche fisiche (porosità, densità, ecc.) e chimiche (es. contenuto di umidità), nonché dalle condizioni operative del processo (es. temperatura) (Fellows P. J., 2000).

1.2 Tecniche di disidratazione

Esistono varie tecniche di essiccamento, che possono essere classificate in funzione dei cambiamenti fisici cui è sottoposta l'acqua che lascia il prodotto; si distinguono quindi tre metodi in cui l'acqua è rimossa, rispettivamente, per evaporazione, per sublimazione e allo stato liquido, ovvero senza passaggio di fase (López L. M., 2006).

1.3.1 Metodi di essiccamento in cui l'acqua è rimossa per evaporazione

Si fornisce all'alimento la quantità necessaria di calore sensibile e latente affinché acqua e vapore acqueo si muovano dall'interno verso la superficie del prodotto, per evaporare verso l'ambiente circostante. I metodi che rientrano in questa categoria differiscono, sostanzialmente, per il mezzo essiccante (Brennan, J.G. (1994)).

1.3.2 Disidratazione per convezione

È il metodo industriale più economico, più utilizzato e più semplice. Durante l'essiccamento per convezione di un corpo solido umido, il mezzo essiccante è l'aria calda che fornisce la quantità di calore sensibile e latente necessaria per rimuovere l'acqua, ma agisce anche da carrier per il vapore acqueo formatosi, trasportandolo lontano dalla superficie esterna che sta essiccando e permettendo l'ulteriore evaporazione (Brennan, J.G. (1994)).

La velocità di essiccamento, almeno nel primo periodo, è tanto maggiore quanto maggiore è la velocità di circolazione dell'aria e più alta la temperatura. Per ottenere prodotti di qualità a costi operativi ragionevoli, la disidratazione dovrebbe essere condotta in maniera rapida, per ridurre i tempi di produzione. Ma ciò, soprattutto nel caso di frutta e vegetali, potrebbe comportare la formazione di una crosta superficiale dura ed impermeabile (fenomeno di case hardening) che ostacola la disidratazione completa del prodotto (Mujumdar A. S., 2010). I sistemi di disidratazione basati su questa metodologia rientrano l'essiccazione al sole, a letto fluido, ecc. e, nel caso di alimenti in forma liquida, lo spray drying.

Essiccamento al sole (essiccamento naturale)

Fin dai tempi antichi, l'energia solare è stata impiegata per essiccare e preservare le riserve agricole in surplus. L'essiccamento al sole era, ed è tutt'ora, il mezzo più economico di conservazione degli alimenti. Ad oggi, questo metodo è ancora ampiamente utilizzato nei paesi in via di sviluppo, per essiccare principalmente frutta e vegetali (Mujumdar A. S., 2006). La tecnica di essiccamento naturale consiste nell'esporre al sole e all'aria gli alimenti, per un lungo periodo di tempo (settimane o mesi), fino al loro totale essiccamento. Questo metodo ha però molti aspetti negativi (Fellows P. J., 2000; Mujumdar A. S., 2006): non è in grado di assicurare sempre i corretti standard di igiene (polvere, inquinanti, insetti, microrganismi, ecc possono interferire durante l'esposizione del prodotto all'aria), non offre la possibilità di controllo delle condizioni operative (che sono sottoposte all'imprevedibilità delle condizioni climatiche) ed infine i lunghi tempi necessari per far avvenire la disidratazione possono comportare un'indesiderata variazione delle caratteristiche

fisiche ed organolettiche del prodotto, ma anche un suo eccessivo deperimento chimico, enzimatico e microbiologico.

Essiccamento a letto fluido

In questo tipo di essiccamento l'aria calda è inviata dal basso e fatta passare attraverso un letto di particelle di alimento, ad una velocità tale da superare le forze gravitazionali, in modo da mantenere le particelle in uno stato di sospensione (stato fluidizzato). La fluidizzazione è un metodo molto efficace perché si massimizza la superficie di scambio necessaria all'essiccamento, riducendo così i tempi di processo senza provocare eccessivi danni al prodotto.

La velocità dell'aria per ottenere la fluidizzazione del letto varia con le dimensioni e con la densità del materiale da essiccare. Il trasporto termico in un letto fluido è favorito dall'alta velocità dell'aria, ma c'è il rischio che le particelle più piccole siano trasportate al di fuori del letto, aumentando il grado di vuoto e riducendo, di conseguenza, l'efficienza volumetrica dell'apparecchiatura (Mujumdar A., 2006).

Spray drying

Lo spray drying è il metodo più utilizzato per l'essiccazione di prodotti fluidi. Consiste nel far passare l'alimento dallo stato fluido attraverso un atomizzatore in modo da nebulizzarlo all'interno di una camera, in cui circola aria filtrata e riscaldata, per ottenere particelle di prodotto solide ed essiccate. Le gocce di fluido nebulizzate, durante la caduta verso il basso, si essiccano e si depositano, come polvere, sul fondo dell'apparecchiatura, per poi essere trasportate all'esterno dal flusso stesso dell'aria. Tra i vantaggi di questo metodo si citano: il tempo di trattamento ridotto e la produzione in continuo, su larga scala; tra gli svantaggi: gli elevati costi operativi (specialmente costi d'energia legati alla rimozione di acqua) e di manutenzione (Fellows P. J., 2000; Mujumdar A. S., 2006).

1.3.3. Disidratazione per conduzione

Mettendo un materiale solido umido a contatto con una superficie calda (ferma o in movimento), si ha trasferimento di calore sensibile e latente per conduzione, dal corpo più caldo a quello più freddo (seguendo il secondo principio della termodinamica), e l'essiccamento ha luogo.

Questa tecnica, rispetto all'essiccazione per convezione con aria calda, ha principalmente due vantaggi (Fellows P. J., 2000): non richiede il riscaldamento di grandi volumi di aria prima del processo e può avvenire in assenza di ossigeno, limitando le reazioni di ossidazione.

L'essiccazione per conduzione può essere eseguita a pressione atmosferica o sottovuoto. Nel primo caso, per ridurre i tempi di processo e, quindi, i danni termici è conveniente operare con uno strato sottile di materiale da mettere a contatto con la superficie riscaldante. Se, invece, il processo è condotto a pressione ridotta, e dunque è ridotto il punto di ebollizione dell'acqua, si può operare a temperature più basse ottenendo comunque alte velocità di essiccamento ed un prodotto di qualità (López L. M., 2006). L'essiccazione sottovuoto è da preferire, soprattutto per alimenti fortemente termolabili. (Mujumdar A. S., 2006).

1.3.4 Disidratazione per irraggiamento

In questa tecnica di disidratazione l'alimento è esposto ad un flusso radiante. Tre tipi di radiazione elettromagnetica possono essere usate: dielettrica, microonde e ad infrarossi. La disidratazione con infrarossi (lunghezza d'onda tra 0.7 e 300 μm) è particolarmente utilizzata per rimuovere piccole quantità di acqua da materiali granulari come farine, spezie e amidi. Il riscaldamento dielettrico è effettuato nel range di frequenze da 1 a 100 MHz, mentre il riscaldamento tramite microonde avviene nell'intervallo tra 300 MHz e 300 GHz. L'applicazione di queste onde provoca degli effetti a livello molecolare all'interno del materiale (conduzione ionica e polarizzazione dipolare) che convertono l'energia elettromagnetica in calore (López L. M., 2006). Il vantaggio principale dell'applicazione dell'energia elettromagnetica è il rapido ed uniforme riscaldamento all'interno del materiale che consente di ridurre notevolmente i tempi di essiccazione perché si realizzano condizioni di trattamento HTST (high temperature - short time). Questo minimizza le perdite di nutrienti ed evita possibili alterazioni strutturali degli alimenti trattati (Mujumdar A. S., 2006; Askari G. R. et al., 2004).

1.3.5 Disidratazione per sublimazione (liofilizzazione o freeze-drying)

Il freeze-drying (o liofilizzazione) è un processo che si svolge in due fasi:

1. Rapido congelamento, in modo da ottenere la formazione di piccoli cristalli di ghiaccio all'interno della matrice vegetale;
2. Disidratazione, mediante sublimazione ($P = 4,58 \text{ mmHg}$ e $T = 0^\circ\text{C}$) del ghiaccio formatosi nella matrice vegetale in vapore, in condizioni sottovuoto. La struttura interna dell'alimento, a sublimazione avvenuta, è caratterizzata da un alto numero di pori e, quindi, da una grande capacità di reidratazione.

Vantaggio del processo è la minimizzazione dello shrinkage, poiché la rimozione dell'umidità non passa attraverso una fase liquida e, quindi, la struttura del prodotto rimane più integra. Considerato poi che la fase di essiccamento dello freeze-drying avviene a temperature meno elevate rispetto

agli altri metodi, consente di raggiungere una degradazione termica minima nel prodotto. Tra i principali svantaggi di questa tecnica si riportano costi di impianto e di processo elevati e necessità di utilizzo di metodi sofisticati di imballaggio del prodotto, per evitare fenomeni di ossidazione e di riassorbimento dell'umidità (Mujumdar A. S., 2006).

1.3.6 Disidratazione per osmosi

La disidratazione osmotica è un processo di rimozione dell'acqua che consiste nell'immersione del materiale da essiccare in una soluzione ipertonica. Questo processo è caratterizzato da una pressione più alta (pressione osmotica della soluzione) ed una più bassa, di conseguenza si stabilisce una forza spingente tra la soluzione e l'alimento, che consente il trasporto dell'acqua dal tessuto vegetale alla soluzione. La parete cellulare dell'alimento agisce come una membrana semipermeabile, ma essendo questa parzialmente selettiva il processo è sempre caratterizzato da un flusso diffusivo di acqua, dall'alimento alla soluzione, e dalla contro diffusione di qualche soluto dalla soluzione verso l'alimento. Questa metodologia è spesso impiegata come pretrattamento per altri processi al fine di ottenere un alimento ad umidità intermedia con caratteristiche di shelf-life migliori, oppure come pretrattamento per ridurre i consumi energetici e/o il danno termico nei processi tradizionali di disidratazione. La disidratazione osmotica, rispetto ad altri metodi comporta un minor danno termico, meno variazioni di colore ed aroma e minori costi energetici, visto che l'acqua è rimossa senza cambiamento di fase. Principale svantaggio della disidratazione per osmosi è l'impossibilità di essiccare completamente il prodotto e la conseguente necessità, in caso si voglia ottenere una completa rimozione di acqua, di aggiungere uno stabilizzante per allungare la shelf-life degli alimenti trattati (Park K. J. et al., 2002; Mujumdar A. S., 2006).

2.0 Pretrattamenti alla disidratazione

Durante i processi di disidratazione gli alimenti subiscono alcune variazioni delle proprietà nutrizionali (ad es.: perdita di vitamine) ed organolettiche (aroma, colore e texture), che riducono l'accettabilità del prodotto da parte del consumatore. L'impatto di tali cambiamenti dipende dalla cura con cui si preparano gli alimenti prima dell'essiccazione, dal metodo utilizzato per essicarli e dalle condizioni di processo utilizzate. Per limitare tali indesiderate variazioni del prodotto e per migliorare il processo di essiccazione, i frutti ed i vegetali sono spesso soggetti a dei pretrattamenti, antecedenti all'operazione di disidratazione vera e propria, la cui funzione è, in primis, inibire gli enzimi e prevenire eventuali alterazioni dei caratteri sensoriali durante l'essiccazione (Sablani S. S., 2006; Mujumdar A. S., 2006).

2.1 Immersione in soluzioni (dipping)

Il dipping consiste nell'immersione del prodotto in specifiche soluzioni, alcaline, acide o zuccherine. Le soluzioni alcaline di carbonato di sodio facilitano l'essiccamento procurando fratture fini alla buccia o allo strato più superficiale dell'alimento (Mujumdar A.S., 2006).

Le soluzioni acide (contenenti ad esempio acido citrico o ascorbico) permettono di ridurre il pH del prodotto e sono in grado di diminuire significativamente la velocità delle reazioni di imbrunimento non enzimatico (reazioni di Maillard). In particolare, l'acido ascorbico preserva il colore dei frutti essiccati, inibendo l'imbrunimento causato dalle polifenolossidasi (riduce gli o-chinoni a complesse sostanze incolori, probabilmente idrossichinoni) (Sablani S. S., 2006). L'acido citrico e gli altri acidi carbossilici, oltre a ridurre il pH e a rallentare le reazioni di imbrunimento, agisce da chelanti per limitare la disponibilità di rame e ferro necessari all'attivazione delle polifenolossidasi. Uno degli svantaggi dell'utilizzo di soluzioni acide è il rischio di rendere troppo malleabile l'alimento, rendendo così fragile la sua texture (Dipersio P. A. et al., 2005; Zhu Y. Et al., 2007;).

Le soluzioni zuccherine, soprattutto ad elevate concentrazioni, riducono l'attività degli enzimi che catalizzano le reazioni di ossidazione. Permettendo di mantenere il colore e le microstrutture dell'alimento e di ridurre il fenomeno di shrinkage, migliorando anche la capacità di reidratazione (Lewicki P. P., 2006).

2.2 Pretrattamenti di scottatura (Blanching)

Il blanching consiste in una scottatura (o parziale cottura) dell'alimento, in vapore o in acqua calda. Lo scopo principale del blanching è la denaturazione degli enzimi che catalizzano reazioni indesiderate quali l'imbrunimento e l'ossidazione, che possono avvenire durante la disidratazione ed il successivo stoccaggio del prodotto (Mujumdar A. S., 2006). L'efficacia di questo trattamento è valutata in base al grado di inibizione enzimatica raggiunto, per tale indagine si analizza nei frutti e nei vegetali l'attività residua delle polifenolossidasi, delle perossidasi e delle pectin-metilsterasi (Lewicki P. P., 2006). Altri vantaggi offerti da questo pretrattamento sono: rimozione di aria intercellulare dei tessuti, con annessa limitazione delle reazioni di ossidazione, riduzione del tempo di essiccamento, grazie all'aumento della permeabilità dell'acqua legata alla maggior malleabilità della superficie, riduzione della carica microbica superficiale, la stabilizzazione della texture e del colore, limitazione della perdita di carotene e di acido ascorbico e riduzione della formazione degli off-flavour. Il blanching presenta anche degli inconvenienti legati alla scelta della temperatura e dei tempi di processo, ovvero può verificarsi: rammollimento eccessivo,

perdita di nutrienti, come vitamine idrosolubili (vitamina C, tiamina, ecc.) e sali minerali, per diffusione degli stessi nell'acqua, effetti di formazione o rimozione di composti odorosi. Questi inconvenienti dipendono dalle modalità con cui si opera la scottatura e dalle condizioni di processo adottate (Lewicki P. P., 2006; Mujumdar A. S., 2006; Sablani S. S., 2006). Il blanching è effettuato solitamente per immersione in acqua calda, tale metodo offre una soluzione a basso costo, ma richiede un eccessivo consumo di acqua, che porta alla produzione di grossi volumi di acque residue. La scottatura a vapore, nonostante sia più costosa e più lenta, comporta una minore perdita di composti idrosolubili e riduce maggiormente la carica microbica superficiale. La scottatura può essere realizzata anche per mezzo di onde elettromagnetiche ad elevata frequenza (ad esempio nei forni a microonde). L'assenza di un bagno liquido e la rapidità di riscaldamento all'interno del prodotto sono condizioni operative favorevoli che possono compensare in alcuni casi la maggiore onerosità del processo (Mujumdar A. S., 2006).

2.3 Impregnazione sottovuoto (Vacuum impregnation technology)

La tecnologia di impregnazione sottovuoto (vacuum impregnation technology) è una tecnica non distruttiva basata sul trasferimento di massa tra un mezzo liquido e un alimento solido poroso in modo da riempire grandi volumi di spazi intercellulari nei tessuti di frutta e verdura modificando così le proprietà fisico-chimiche e gli attributi sensoriali dei prodotti.

Questa tecnica è spesso equivocata con la *disidratazione osmotica*, pur essendo queste tecniche completamente diverse. Infatti, nel caso di impregnazione sottovuoto il trasferimento di massa si verifica a causa della differenza di pressione meccanica indotta, mentre nella disidratazione osmotica si basa sulla differenza di concentrazione tra il liquido intracellulare nel materiale alimentare e la soluzione (la disidratazione osmotica richiede l'utilizzo di soluzioni ipertoniche e il processo avviene a pressione atmosferica). Quando il prodotto solido, immerso in un liquido, viene sottoposto a pressioni sub-atmosferiche, il gas occluso nel solido subisce un'espansione per equilibrare le pressioni raggiunte. Ciò implica da una parte una degassificazione della struttura porosa a seconda della pressione applicata e, dall'altra parte, una penetrazione di liquido negli spazi liberi dei capillari del materiale quando l'equilibrio pressorio viene raggiunto (Zhao and Xie, 2004).

Questo metodo può essere utilizzato, per esempio, per ridurre il pH e l'attività dell'acqua del prodotto, modificare le proprietà termiche, migliorare la struttura, il colore, il gusto e l'aroma del prodotto. Inoltre, composti bioattivi possono essere introdotti insieme a soluzioni impregnanti, migliorando così le proprietà che promuovono la salute del prodotto o facilitano la produzione di alimenti funzionali.

2.4 Film edibili

I film edibili (edible coatings) sono dei rivestimenti alimentari (a base di proteine, lipidi o polisaccaridi) che vengono applicati sulla superficie dell'alimento prima della sua disidratazione. I film edibili sono sottili strati di materiale commestibile che, applicati alla superficie dell'alimento, creano una barriera selettiva al trasporto dei gas come l'ossigeno (Fakhouri et al., 2007). Presentano, inoltre, una scarsa barriera al vapore acqueo e vengono utilizzati per ridurre al minimo le reazioni ossidative nei prodotti alimentari durante il processo di disidratazione convettiva. A tal proposito, sono da menzionare due lavori: quello di (Lago-Vanzela et al. 2013) che ha mostrato come la zucca rivestita con una soluzione di amido presentava un maggiore contenuto di trans- α -carotene e trans- β -carotene, oltre ad un migliore colore dopo l'essiccazione convettiva rispetto ai campioni non coperti e quello di (Garcia et al. 2014), che ha mostrato come il rivestimento di pectina ha ridotto le perdite di vitamina C durante l'essiccamento convettivo di fette di papaia, rispetto ai campioni non coperti.

3.0 Effetti della disidratazione sulla qualità dell'alimento

La frutta secca è un'ottima risorsa di energia, sali minerali e vitamine. Durante il processo di essiccazione l'alimento subisce modifiche chimiche e fisiche che influenzano la qualità del prodotto finito. L'entità di tali cambiamenti dipende dalla composizione chimica della materia prima, dall'eventuale pretrattamento effettuato, dalle condizioni operative, dal tipo di essiccamento, dall'imballaggio utilizzato e dalle condizioni di stoccaggio. Lo scopo principale delle nuove tecnologie di essiccamento consiste nel minimizzare questi cambiamenti e nel massimizzare l'efficienza del processo (Perera C. O., 2005; Sablani S. S., 2006).

I parametri impiegati per valutare la qualità di un alimento essiccato possono essere classificati secondo (Perera C. O., 2005):

- caratteristiche fisiche (colore, porosità, texture, capacità di reidratazione, forma, dimensione, ecc.);
- caratteristiche chimiche (flavour, off-flavour, attività dell'acqua e stabilità chimica);
- caratteristiche biologiche (carico microbico e presenza di pesticidi o altri contaminanti);
- caratteristiche nutrizionali (ritenzione di vitamine, sali minerali, zuccheri).

3.1 Caratteristiche fisiche

Colore

Il colore viene definito come la percezione soggettiva generata da uno stimolo oggettivo, rappresentato dalla luce, che, in modo diretto o indiretto, colpisce la retina dell'occhio umano e, attraverso il nervo ottico, giunge al cervello per creare la sensazione di colore (Boscarol M., 2007). Quando la luce colpisce un oggetto può essere riflessa, assorbita o rifratta. Il colore dell'oggetto è determinato dalla quantità di luce riflessa e dipende quindi dalla sorgente luminosa, dalla posizione dell'osservatore e dalle caratteristiche fisiche dell'oggetto (forma, dimensione, ecc.). Mediante appositi strumenti standardizzati è possibile rendere oggettiva la misura del colore per poter utilizzare quest'ultimo come indice di qualità dell'alimento (Mohammadi A. et al., 2008). Ci sono diverse cause di variazione del colore nei prodotti disidratati. La disidratazione modifica le caratteristiche superficiali dell'alimento e, quindi, ne altera sia le proprietà di riflettività che il colore. Nei frutti e nei vegetali le modifiche chimiche durante l'essiccamento sono a danno dei composti colorati presenti, ovvero carotenoidi e clorofille. Preservare questi pigmenti è importante per rendere il prodotto finale "attraente" ed accettabile per il consumatore. I colori finali dei prodotti, quali verde, giallo, rosso ed arancione sono prevalentemente dovuti a due tipi di pigmenti: i carotenoidi e la clorofilla. I carotenoidi, responsabili delle colorazioni giallo, rosso ed arancione, sono suscettibili ai cambiamenti ossidativi, a causa dell'alto grado di insaturazione che caratterizza la loro struttura chimica. La clorofilla, responsabile della colorazione verde, è abbastanza stabile nei sistemi alimentari a basso contenuto di umidità (Raponi F. et al., 2017). Il più noto meccanismo di degradazione della clorofilla è la trasformazione in feofitine, che avviene in presenza di acidi. Tale degradazione è funzione della temperatura, del pH, dell'attività residua enzimatica, dell'ossigeno e della luce (Mujumdar A. S., 2006; Fellows P. J., 2000). Oltre alle reazioni di degradazione dei pigmenti, durante l'essiccamento il colore della frutta può variare a causa di imbrunimento enzimatico o non enzimatico (reazioni di Maillard, caramellizzazione ed ossidazione dell'acido ascorbico). L'imbrunimento enzimatico è dovuto all'ossidazione enzimatica di fenoli e chinoni che polimerizzano formando pigmenti bruni e melanina. La reazione è catalizzata dalle polifenolossidasi (PPO) ed è favorita in presenza di ossigeno. Mediante pretrattamenti quali, ad esempio, il blanching ed il dipping in soluzione acide o di zucchero è possibile ridurre l'imbrunimento enzimatico, in quanto si inattivano le PPO o si rallenta la reazione (Zhu Y. Et al., 2007; Mujumdar A. S., 2006). Mediante dipping in acido citrico si ha l'abbassamento del pH e quindi il rallentamento della reazione di imbrunimento; inoltre, l'acido citrico agisce da chelante limitando la disponibilità di rame e ferro necessari all'attivazione delle polifenolossidasi. Uno degli svantaggi dell'utilizzo di soluzioni acide è relativo alla texture, cioè

si rischia di rendere troppo soffice l'alimento (Dipersio P. A. et al., 2005; Zhu Y. et al., 2007; Mujumdar A. S., 2006). L'imbrunimento non enzimatico, noto anche come reazione di Maillard, è un processo chimico causato dalla reazione tra i gruppi carbonilici degli zuccheri riducenti con i gruppi amminici di proteine ed amminoacidi, seguita da una serie di altre reazioni più complesse, tra cui rientrano la caramellizzazione degli zuccheri e l'ossidazione dell'acido ascorbico. Nella frutta, l'imbrunimento del tipo Maillard è indesiderato, non solo perché conferisce una colorazione non naturale, ma anche perché gli alimenti suscettibili acquistano sapore amaro o, più in generale, flavour indesiderati e perdita di valore nutrizionale (riduzione di amminoacidi essenziali e di vitamine). L'imbrunimento non enzimatico è favorito da alte concentrazioni di reagenti, pH leggermente alcalino (7-10), alta temperatura, luce, presenza di ossigeno e attività dell'acqua compresa tra 0,65 e 0,75.

Porosità

La porosità è un parametro fisico di grande rilevanza per un alimento disidratato. È un indice del volume di spazio vuoto (legato al numero e alla dimensione dei pori) rispetto al volume totale del materiale. Quando un alimento viene essiccato, la sua struttura collassa e si ha una variazione della porosità: questi cambiamenti influiscono in modo significativo sui parametri qualitativi, in particolare sulla texture e sulla capacità di reidratazione. La porosità è anche un indice con cui quantificare lo shrinkage, che si verifica durante l'essiccazione di un alimento (ed è linearmente proporzionale al contenuto di umidità presente nell'alimento in esame) e da cui dipendono forma e dimensione del prodotto finale (Perera C. O., 2005, Raponi F. et al., 2017).

Texture

La texture di un alimento è definita come una sensazione umana, e quindi soggettiva, legata al comportamento reologico del prodotto, alla masticazione e alla deglutizione (Steffe J. F., 1996). La texture è dunque un insieme di proprietà meccaniche, strutturali e sensoriali dell'alimento. Durante l'essiccamento della frutta avvengono reazioni chimiche e biologiche molto complesse, che influiscono sulla microstruttura e sulla texture del tessuto vegetale.

La perdita di acqua e le alte temperature che caratterizzano un processo di essiccamento hanno influenza sulla texture dell'alimento, comportando danni alla struttura cellulare che causano tessuti vegetali diventano flaccidi e con texture gommosa. La perdita di acqua, a livello microscopico, interessa soprattutto i vacuoli della matrice vegetale e, solo in misura minore, il citoplasma e la parete cellulare. Questi si contraggono proprio a causa del gradiente che si crea tra interno ed esterno, per far avvenire il trasporto di acqua (Raponi, 2017).

Il distacco cellulare, o cell debonding, consiste nel distacco della lamella mediana e in una perdita di adesione tra le varie cellule. Questo fenomeno è dovuto sia alla degradazione delle sostanze pectiche presenti nella lamella mediana circostante la parete cellulare, sia ai microstress prodotti nel tessuto cellulare per la rimozione dell'acqua. Le sostanze pectiche sono responsabili dell'adesione tra le cellule del tessuto vegetale ed è quindi intuibile che la loro degradazione influisca sia sulle proprietà meccaniche del prodotto sia sulla porosità del materiale a causa degli spazi intercellulari formatisi. L'entità delle modifiche cellulari e strutturali che possono verificarsi durante l'essiccamento e, di conseguenza, avere effetti sulla texture e sulla capacità di reidratazione, dipendono da molti fattori: eventuali pretrattamenti adottati, metodo di essiccazione, condizioni di processo (temperatura, umidità relativa, velocità dell'aria, ecc.), struttura fisica (porosità) e composizione chimica della matrice da trattare, ecc. In generale, un essiccamento rapido e a temperature elevate causa cambiamenti più evidenti nella struttura degli alimenti rispetto ad un essiccamento condotto a velocità e temperature più basse (Fellows P. J., 2000).

Tra le modifiche strutturali subite dall'alimento durante l'essiccazione, rientra il fenomeno di case hardening, definito come la cristallizzazione dei soluti disciolti, per lo più zuccheri, trasportati, insieme all'acqua che evapora, in superficie. La crosta superficiale formata ostacola l'evaporazione dell'acqua, aumentando la resistenza al trasporto di materia e rallentando il processo di essiccazione. Di conseguenza si rischia di ottenere un prodotto finito duro e secco in superficie, ma ancora umido all'interno e, quindi, particolarmente esposto a eventuali attacchi microbici. L'essiccato così ottenuto ha anche ridotte capacità di reidratazione. È possibile minimizzare il fenomeno di case hardening scegliendo condizioni operative tali da prevenire la creazione di gradienti di umidità eccessivamente elevati tra l'interno e la superficie dell'alimento (Fellows P. J., 2000; Barta J., 2006).

3.2 Capacità di reidratazione

La reidratazione è un processo molto complesso finalizzato a ricostituire le proprietà dell'essiccato, mediante il contatto con acqua. Dopo la reidratazione, il prodotto è caratterizzato da colore, aroma, dimensione, forma e texture il più possibile simili a quelli del prodotto fresco. Per tale motivo velocità e capacità di reidratazione sono dei parametri molto importanti per la valutazione della qualità di un alimento (Lewicki P. P., 2006; Barta J., 2006). La capacità di reidratazione di un essiccato è influenzata dal grado di rotture cellulari e strutturali a cui l'alimento è soggetto durante il processo di essiccazione. Le rotture che hanno luogo all'interno del tessuto vegetale, così come le dislocazioni, sono irreversibili e determinano la perdita di integrità strutturale del prodotto, che finisce per essere costituito da un ammasso di capillari secchi e

collassati. Con tale conformazione finale, il prodotto ha una scarsa capacità idrofila e, di conseguenza, limitata capacità di reidratazione, dovuta all'elevata resistenza al trasporto di acqua all'interno della matrice vegetale (Falade K. O. & Abbo E. S., 2007; Mujumdar A. S., 2006). Per ottenere un essiccato con una buona capacità di reidratazione, è preferibile essiccare più lentamente oppure pretrattare la materia prima con sostanze che limitano le modifiche strutturali e cellulari, quali sali e zuccheri (Fellows P. J., 2000; Mujumdar A. S., 2006).

3.3 Caratteristiche chimiche

L'accettabilità di un prodotto disidratato dipende strettamente dalle sue caratteristiche aromatiche. Ogni alimento è caratterizzato da sostanze odorose naturalmente presenti che, però, durante le varie operazioni di pretrattamento, essiccazione e stoccaggio subiscono molte modifiche e rischiano di essere perse.

In genere la perdita del flavour naturale è causata dall'esposizione dell'alimento alla luce, dalle alte temperature e dal contatto con sostanze chimiche (Mujumdar A. S., 2006). Tra le cause principali della perdita di aromi nel prodotto finale rispetto a quello di partenza, la quantità di energia termica assorbita dal prodotto sotto forma di calore sensibile e latente per la vaporizzazione dell'acqua riveste un ruolo chiave. Infatti, il flusso termico causa una netta perdita dei componenti volatili dell'alimento. L'entità di tale perdita dipende dalla temperatura e dal contenuto di umidità dell'alimento, ma anche da tensione di vapore e da solubilità nel vapore d'acqua dei composti volatili. Le sostanze caratterizzate da volatilità e diffusività alte sono perse nelle fasi iniziali del processo di essiccamento, dove la temperatura è più alta e il processo diffusivo più veloce. Molti composti aromatici sono persi in questa fase perché dissolti nell'acqua che evapora. Gli alimenti che hanno un alto valore aggiunto per le loro caratteristiche aromatiche devono essere essiccati a basse temperature, per ridurre la perdita dei volatili. La riduzione di aroma non è dovuta solo alla perdita dei composti volatili, ma anche a reazioni chimiche quali l'ossidazione e l'imbrunimento non-enzimatico (reazioni di Maillard). Altra possibile causa della perdita di aromi è da ricercarsi nell'ossidazione dei composti volatili e dei lipidi durante lo stoccaggio del prodotto, in cui può avvenire la penetrazione dell'ossigeno nei pori. La velocità di deterioramento aromatico è determinata dalla temperatura di stoccaggio e dall'attività dell'acqua dell'alimento. La maggior parte dei frutti e dei vegetali contengono solo piccole quantità di lipidi, ma l'ossidazione degli acidi grassi insaturi in idroperossidi, che a loro volta reagiscono per polimerizzazione, disidratazione o ossidazione dando luogo ad aldeidi, chetoni ed acidi, è causa di rancidità e off-flavours. Quindi durante il processo di essiccazione, le alte temperature possono comportare perdita di sostanze odorose caratterizzate da basso peso molecolare ed alta diffusività e solubilità.

Invece durante lo stoccaggio del prodotto essiccato, oltre a preoccuparsi della ritenzione degli aromi, bisogna prevenire le reazioni degradative che causano rancidità e off-flavours. Le variazioni aromatiche durante lo stoccaggio possono essere ridotte con particolari accorgimenti come l'imballaggio sottovuoto, basse temperature di conservazione, esclusione della luce visibile ed ultravioletta, basso contenuto di umidità, addizione di antiossidanti naturali o sintetici.

Metodi per la ritenzione degli aromi includono: il recupero dei composti volatili e la loro successiva addizione al prodotto essiccato; l'inoculo o l'attivazione di enzimi naturalmente presenti che fungano da precursori aromatici all'interno dell'alimento (Fellows P. J., 2000; Mujumdar A. S., 2006).

3.3.1 Attività dell'acqua e stabilità chimica

La stabilità fisica, chimica e microbiologica di un alimento non è collegata al contenuto totale di umidità, bensì all'acqua libera ovvero a quella parte di acqua, presente nell'alimento, non impegnata in legami con altre molecole e trattenuta negli spazi interstiziali solamente grazie alla tensione superficiale. Il parametro che permette di quantificare la disponibilità di acqua libera nei diversi alimenti è l'attività dell'acqua (a_w), definita dall'equazione (a):

$$a_w = \frac{P_a}{P_0}$$

dove:

- P_a è la tensione di vapore dell'acqua nell'alimento;
- P_0 è la tensione di vapore dell'acqua pura alla stessa temperatura del prodotto.

In base al valore di a_w , gli alimenti possono essere classificati in secchi ($a_w < 0,6$), a contenuto intermedio di umidità ($0,6 < a_w < 0,9$) e ad alto contenuto di umidità ($a_w > 0,9$). L'attività dell'acqua è correlata al deterioramento della qualità di un alimento perché relazionata alla crescita microbica. La figura 1 mostra le reazioni chimiche e microbiologiche, possibili cause di deterioramento di un alimento, in funzione dell'attività dell'acqua. C'è un valore critico di attività dell'acqua al di sotto del quale nessun microorganismo può crescere; per la maggior parte degli alimenti tale valore è compreso nell'intervallo $0,6 \div 0,7$. In generale per alti valori di a_w è favorito lo sviluppo di microrganismi e, quindi, il verificarsi di reazioni degradative quali l'imbrunimento, l'idrolisi, le reazioni enzimatiche, ecc. L'imbrunimento non enzimatico consiste nella reazione tra i gruppi carbonilici degli zuccheri riducenti ed i gruppi amminici di proteine ed amminoacidi, seguita da una serie di altre reazioni più complesse.

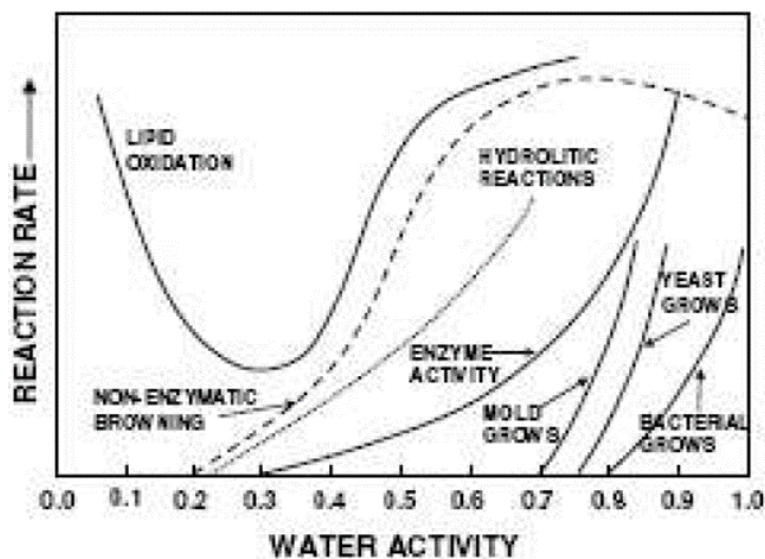


Figura 1 Velocità di deterioramento degli alimenti in funzione dell'attività dell'acqua.

L'intero processo porta alla formazione di pigmenti scuri e conferisce all'alimento sapore e aroma indesiderati. Inoltre, si osservano rilevanti perdite del valore nutrizionale dell'alimento, in particolare delle vitamine C e K. Dalla figura 1 si nota che la velocità di imbrunimento aumenta rapidamente con l'attività dell'acqua e raggiunge un massimo in corrispondenza di $a_w = 0,55 \div 0,7$, per poi decrescere. Questa decrescita è probabilmente dovuta ad un'eccessiva diluizione del sistema che causa un abbassamento significativo delle concentrazioni dei reagenti. È interessante osservare che l'attività dell'acqua può essere espressa anche mediante l'equazione:

$$a_w = X_a * \gamma_A$$

Dove:

- x_A è la frazione molare di acqua nell'alimento;
- γ_A è il coefficiente di attività dell'acqua.

Si può quindi migliorare la conservabilità di un alimento aumentando la concentrazione dei soluti al suo interno, così come si fa tramite un processo di essiccazione; in tal modo, infatti, decresce il valore di x_A e quindi di a_w . La prima espressione di a_w costituisce anche la definizione dell'umidità relativa (RH) di una miscela aria-vapore. Risulta, infatti, valida l'equazione:

$$RH = \frac{P_w}{P_w^*}$$

Quando un solido umido è in equilibrio con l'atmosfera circostante, la sua attività eguaglia l'umidità relativa dell'atmosfera stessa. La relazione di equilibrio tra il contenuto di umidità di un prodotto e la corrispondente attività dell'acqua, ad una data temperature, è descritta dall'isoterma di adsorbimento (figura 2).

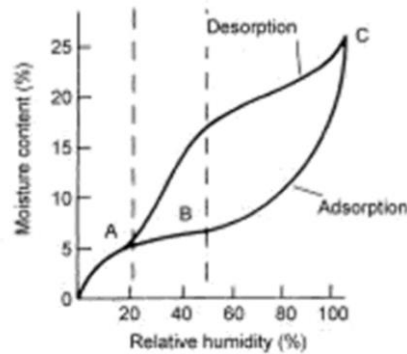


Figura 2 Isoterma di adsorbimento

Osservando la curva qualitativa (figura 2), si distinguono tre zone principali:

- Regione A: Per valori di $a_w < 0.2$, le molecole di acqua sono saldamente legate al solido tramite legami idrogeno o interazioni elettrostatiche tra le stesse molecole di acqua e gruppi fortemente polari (amminici, carbonilici od ossidrilici). In tali condizioni l'acqua non è disponibile per favorire lo sviluppo microbico o la comparsa di reazioni chimiche che producano delle alterazioni.
- Regioni B e C: le molecole di acqua sono gradualmente sempre meno impegnate nei legami con il substrato, ovvero l'acqua è in forma libera e quindi possono essere favorite le reazioni di degradazione.

Il grafico in figura 2 evidenzia, inoltre, il fenomeno dell'isteresi, presente in quasi tutti i processi di adsorbimento in misura variabile con la natura e lo stato del substrato: la curva di desorbimento non coincide con quella di adsorbimento (in genere giace al di sopra), cioè l'alimento, a parità di a_w , rilascia una quantità minore di acqua rispetto a quella adsorbita nelle medesime condizioni.

Per valori crescenti di temperatura si osserva una traslazione verso destra dell'isoterma, che evidenzia come, per un fissato valore di a_w , la quantità di acqua che l'alimento assorbe fino a portarsi in condizioni di equilibrio decresca con il progressivo aumento della temperatura (figura 3).

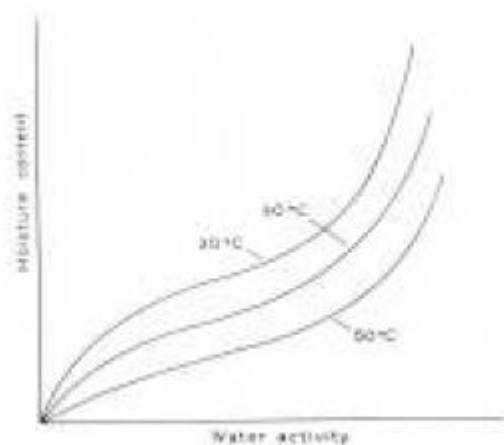


Figura 3 Effetto della temperatura sull'isoterma di assorbimento

3.4 Caratteristiche nutrizionali

La frutta disidratata è un'ottima risorsa di energia, sali minerali e vitamine. Tra i costituenti più rilevanti ai fini della determinazione della qualità di un prodotto disidratato si annoverano l'acido ascorbico, la vitamina C, il β -carotene e la provitamina A (Raponi et al. 2017). È quindi molto importante studiare l'effetto del processo di disidratazione su tali nutrienti. Il valore nutrizionale del prodotto disidratato varia moltissimo con le procedure di preparazione degli alimenti, con gli eventuali pretrattamenti effettuati, con il tempo e con la temperatura di essiccazione e con le condizioni di stoccaggio. Nei frutti e nei vegetali, in genere, le perdite di nutrienti avvengono soprattutto in fase di preparazione, e solo in misura minore durante l'essiccamento. La maggior parte delle vitamine presenti nella frutta si degradano, durante le varie fasi del processo di essiccamento e durante il successivo stoccaggio, a causa di differenti fattori: alte temperature, esposizione alla luce e presenza di ossigeno. L'acido ascorbico si degrada per ossidazione e con le alte temperature. Questa degradazione rientra nel complesso insieme di reazioni di imbrunimento non enzimatico. I carotenoidi presenti nel tessuto vegetale (vitamina A e betacarotene), sono suscettibili all'ossidazione indotta dalla luce, dalla temperatura, dall'ossigeno e dall'attività enzimatica. Per ridurre la perdita di vitamine si possono effettuare pretrattamenti di dipping in soluzioni acide, mediante cui abbassare il pH ed inattivare gli enzimi che catalizzano le reazioni di degradazione (reazioni di Maillard), oppure il blanching che consente anche di rimuovere l'aria intercellulare dai tessuti sfavorendo le reazioni di ossidazione.

Le perdite durante lo stoccaggio si riducono abbassando la concentrazione di ossigeno e la temperatura di conservazione ed evitando l'esposizione diretta alla luce. L'utilizzo di metodi di essiccazione quali microonde o sottovuoto, riduce le perdite di acido ascorbico grazie ai bassi livelli di ossigeno presente (Mujumdar S., 2006; Fellows P. J., 2000).

3.4.1 Analisi sensoriale

L'analisi sensoriale è una disciplina scientifica che, mediante test strutturati condotti secondo precisi protocolli, quantifica in maniera oggettiva le percezioni umane basate sui sensi e, quindi, soggettive. È uno strumento molto utilizzato per individuare l'accettabilità di un prodotto da parte del consumatore medio. L'analisi sensoriale ha inizio con l'impatto visivo del prodotto essiccato, sono quindi di fondamentale importanza parametri come il colore, la forma e l'omogeneità di presentazione del prodotto. Successivamente, al momento del consumo, con l'assaggio, si percepiscono i sapori, la texture e gli aromi. Tutte queste informazioni contribuiscono a comporre la percezione globale della qualità di un alimento.

4.0 Tecnologie smart drying

Il processo di disidratazione rappresenta un'operazione complessa, dinamica, non lineare ed imprevedibile dovuta al simultaneo trasferimento di calore e massa, alla veloce evaporazione di umidità e alla presenza di reazioni chimico-fisiche. Tale complessità aumenta in caso di alimenti eterogenei e non uniformi. Oltre ciò, tale operazione richiede una quantità di energia considerevole, che influenza negativamente l'ambiente per via delle emissioni di gas serra. Da qui l'esigenza di effettuare processi sostenibili, avvalendosi dell'ausilio di tecnologie "alleate" che includono hardware e software informatici avanzati e controlli di processo smart.

I processi di disidratazione così detti smart si basano sul monitoraggio di diversi parametri qualitativi del prodotto alimentare sotto esame (umidità, colore, forma, sapore, odore del prodotto) e delle condizioni in cui avviene la disidratazione (velocità dell'aria, temperatura, umidità dell'aria). Questi parametri non sono costanti durante il processo di disidratazione, bensì subiscono continue variazioni durante tutto il tempo del processo. Per poter acquisire tutte le oscillazioni dei parametri sotto osservazione in tempo reale, la tecnologia smart si avvale di sensori, trasduttori e sistemi di controllo. Tale tecnologia può essere economicamente conveniente nel rilevare e monitorare questi parametri qualitativi variabili, controllando in tal modo le condizioni di essiccazione e la qualità dei prodotti (particolarmente importante per i prodotti di alta qualità che hanno stringenti vincoli qualitativi). Alcune importanti categorie di tecnologia smart drying sono: sistemi biomimetici, computer vision technology, electrostatic sensor technology, spettroscopia

NIR, risonanza magnetica per immagini (MRI), tecniche ad ultrasuoni, spettroscopia a microonde/dielettrica (Su, Y., Zhang, M., & Mujumdar, A.S. (2015).)

4.1 Modelli matematici: *Costruzione dei modelli di disidratazione*

Curve di disidratazione dei prodotti ortofrutticoli

Per descrivere il comportamento dei prodotti ortofrutticoli durante il processo di disidratazione ci si può avvalere delle curve di disidratazione, che descrivono la variazione del contenuto di umidità e, di conseguenza, la velocità del processo in funzione dell'umidità (figura 4 (a)) oppure del tempo (figura 4 (b)). Nelle curve riportate in figura 4a e figura 4b è mostrata la velocità di uno stesso processo in funzione dell'umidità e del tempo (fig.4).

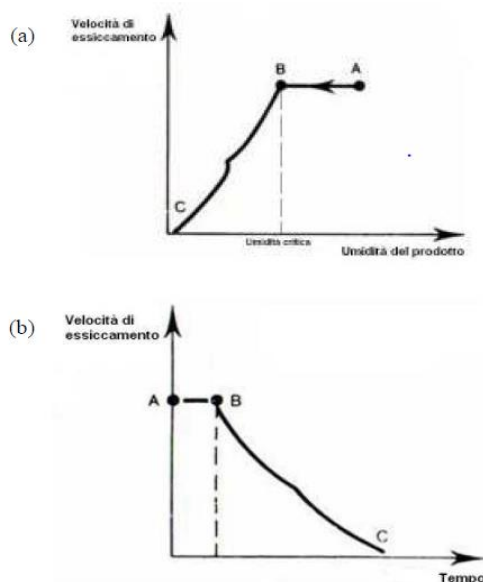


Figura 4 Velocità di essiccamento in funzione del contenuto d'acqua del prodotto (a) e del tempo (b).

La disidratazione dei prodotti ortofrutticoli tramite corrente di aria calda può generalmente essere descritta tramite quattro fasi distinte (Fig.4):

1. **Initial drying period** (periodo iniziale di disidratazione)
2. **Constant rate period** (fase di velocità costante)
3. **1st falling rate period** (prima fase di caduta della velocità)
4. **2nd falling rate period** (seconda fase di caduta della velocità)

1. **Initial drying period** (fase A–B): rappresenta la fase iniziale di riscaldamento (warming up) nella quale il calore ricevuto dall'alimento viene impiegato per aumentare la sua temperatura da quella iniziale fino al punto in cui l'acqua inizia ad evaporare. La fase rappresenta solamente circa lo 0.25% di tutto il periodo di disidratazione e, per tale motivo, viene spesso trascurata nel computo generale).
2. **Constant rate period** (fase B–C): rappresenta un tempo limitato dove la velocità di disidratazione si mantiene costante. In questa fase viene rimossa l'acqua non legata (acqua libera) dal prodotto che viene vaporizzata, diffusa nell'aria e portata fuori dalla corrente d'aria calda convettiva. La fase continua finché la quantità di acqua evaporata eguaglia la quantità di acqua movimentata sulla superficie del prodotto alimentare.
Il *punto C* corrisponde al **Critical Moisture Content (CMC)** o Contenuto di Umidità Critico e rappresenta il valore critico in cui non c'è più abbastanza acqua sulla superficie dell'alimento in disidratazione tale da mantenere un valore di attività dell'acqua (a_w) pari a 1, ossia tale da mantenere un film continuo d'acqua.
3. **First falling drying rate period** (C–D): rappresenta la fase di primo calo della velocità di disidratazione ed inizia quando la velocità di disidratazione del prodotto inizia a decrescere ed il suo contenuto di umidità si ritrova al di sotto del CMC. Durante questo periodo la velocità con cui l'acqua si sposta verso la superficie del prodotto è minore della velocità di evaporazione che si verifica sulla superficie stessa, che diviene continuamente impoverita di acqua liquida.
Il *punto D* corrisponde all'**Equilibrium Moisture Content (EMC)** o Contenuto di Umidità all'Equilibrio e rappresenta il valore in cui la pressione del vapore dell'umidità nel prodotto è uguale alla pressione parziale del vapore nell'aria. A questo punto la superficie del prodotto è completamente disidratata.
4. **Second falling drying rate period** (D–E): rappresenta la seconda fase di calo della velocità di disidratazione ed inizia quando la superficie del prodotto è divenuta completamente privata dell'acqua (punto D). In questa fase il trasporto di massa e calore diviene più lungo in quanto il contenuto di umidità continua a diminuire. Infine, la pressione del vapore nel prodotto diviene uguale alla pressione parziale del vapore nell'aria di disidratazione e non si verifica più alcuna disidratazione.

4.2 Modelli matematici per la disidratazione a strato sottile

La disidratazione a strato sottile (*thin-layer drying*) si riferisce generalmente alla disidratazione di uno strato sottile (*thin-layer*) di prodotti ridotti a pezzetti o a fette sottili dove la temperatura di disidratazione può essere assunta uniforme.

I modelli matematici di disidratazione a strato sottile (*mathematical thin-layer drying models*) sono stati dimostrati essere molto utili per simulare e per stimare il comportamento di vari tipi di prodotti durante la disidratazione. Questo grazie dell'impiego di *equazioni matematiche*, utilizzate per la previsione delle cinetiche di disidratazione (curve di disidratazione) di molti tipi di materiali porosi, alimentari e non.

I modelli di disidratazione a strato sottile (*thin-layer drying models*) che descrivono il processo disidratativi dei prodotti agroalimentari ricadono principalmente in tre categorie: *teorica*, *semi-teorica* ed *empirica*.

1. **Modelli teorici:** prendono in considerazione sia le resistenze esterne che quelle interne al trasferimento dell'umidità. Essi coinvolgono la geometria del materiale, la sua diffusività di massa e la conducibilità del materiale (Cihan ed Ece 2001). Nella disidratazione a strato sottile dei prodotti alimentari, l'analisi del processo di disidratazione è calcolata usando un modello di diffusione basato sulla seconda legge di Fick (Duc et al, 2011).
2. **Modelli semi-teorici:** sono generalmente derivati dalla seconda legge di Fick (modelli teorici) e da modificazioni delle sue forme semplificate, o da analogie con la legge del raffreddamento di Newton. I fattori che possono determinare l'applicazione di questi modelli includono la temperatura di disidratazione, la velocità dell'aria di disidratazione, lo spessore del materiale, il contenuto di umidità iniziale e l'umidità relativa (Panchariya and others, 2002; Erbay and Icer, 2010). Tali modelli, diversamente da quelli teorici, prendono in considerazione solo le resistenze esterne al trasferimento dell'umidità tra il prodotto e l'aria di disidratazione.
3. **Modelli empirici:** forniscono una diretta relazione tra il contenuto medio di umidità ed il tempo di disidratazione. La principale limitazione all'applicazione dei modelli empirici nella disidratazione a strato sottile è che questi trascurano i principi fondamentali del processo di disidratazione; i loro parametri non hanno un'interpretazione fisica e le loro applicazioni sono specifiche alle condizioni di disidratazione degli esperimenti. Tuttavia, a causa della complessa natura della diffusione dell'umidità all'interno dei prodotti agroalimentari, i modelli empirici sono

ancora ampiamente utilizzati per descrivere le caratteristiche di disidratazione di questi prodotti.

In figura 5, sono stati presentati alcuni dei modelli thin-layer semi-teorici ed empirici utilizzati per stimare le cinetiche disidratative dei prodotti ortofrutticoli.

No	Model name	Model	Reference
1	Newton	$MR = \exp(-kt)$	El-Beltagy and others (2007)
2	Page	$MR = \exp(-kt^n)$	Akoy (2014)
3	Modified page	$MR = \exp[-(kt)^n]$	Vega and others (2007)
4	Henderson and Pabis	$MR = a \exp(-kt)$	Hashim and others (2014)
5	Logarithmic	$MR = a \exp(-kt) + c$	Kaur and Singh (2014)
6	Two term	$MR = a \exp(-k_0t) + b \exp(-k_1t)$	Sacilik (2007)
7	Wang and Singh	$MR = 1 + at + bt^2$	Omolola and others (2014)
8	Verma and others	$MR = a \exp(-kt) + (1-a) \exp(-gt)$	Akpinar (2006)
9	Thompson	$t = a \ln(MR) + b [\ln(MR)]^2$	Pardeshi (2009)
10	Peleg	$MR = 1 - t/(a + bt)$	Da Silva and others (2015)

Figura5 Modelli thin-layer per la disidratazione di frutta e verdura (adattato da Onwude et al., 2016).

Nella figura a , b , c , k , k_0 , k_1 corrispondono a costanti empiriche, n è il numero delle costanti, MR (*moisture ratio*) rappresenta il rapporto di umidità e t è il tempo (min).

4.3 Modelli semi-teorici usati nelle sperimentazioni

Nella sperimentazione sono stati usati quattro diversi modelli semi-teorici: il *Newton model* e il *Page model*, derivati dalla legge del raffreddamento di Newton, l'*Henderson and Pabis model* e il *Logarithmic model*, derivati dalla seconda legge di Fick.

- **Newton model**

$$MR = \frac{(M-M_e)}{(M_o-M_e)} = \exp(-k^t) \quad (\text{No 1})$$

- **Page model**

$$MR = \frac{(M-M_e)}{(M_o-M_e)} = \exp(-kt^n) \quad (\text{No 2})$$

- **Henderson and Pabis model**

$$MR = \frac{(M-M_e)}{(M_o-M_e)} = a \exp(-kt) \quad (\text{No4})$$

- **Logarithmic model**

$$MR = \frac{(M-M_e)}{(M_o-M_e)} = a \exp(-kt) + c \quad (\text{No5})$$

5.0 Scopo

Scopo della presente sperimentazione è il monitoraggio e la conseguente ottimizzazione del processo di disidratazione a flusso di aria calda, considerando come prodotti carote biologiche (cv. *Romance* e *Carvejo*). Al fine di conseguire lo scopo prefisso sono stati investigati gli effetti di alcuni pretrattamenti (termici, dipping e tecniche di vacuum impregnations) atti a ridurre il tempo di disidratazione e a migliorare la qualità finale delle matrici vegetali sottoposte al processo. Le tecniche analitiche impiegate per l'analisi sono state: il saggio di attività enzimatica della perossidasi (POD), l'analisi colorimetrica, la determinazione del contenuto in fenoli totali, l'estrazione e la quantificazione dei carotenoidi, l'analisi del processo di reidratazione e la determinazione del contenuto in sostanza secca. Il monitoraggio dei cambiamenti chimico-fisici dei prodotti (es. contenuto di umidità, attività dell'acqua, solidi solubili, acidità titolabile, contenuto fenolico, contenuto di carotenoidi, consistenza e cambiamenti di colore) è stato condotto tenendo conto dei parametri operativi che influenzano la disidratazione (temperatura, velocità dell'aria e umidità relativa). Inoltre, sono stati impiegati quattro modelli matematici per descrivere le cinetiche di disidratazione. Fine ultimo dell'attività progettuale è il trasferimento del sistema di monitoraggio e controllo su un prototipo di essiccatore.

6.0 Materiali e metodi

La presente sperimentazione è incentrata sul monitoraggio e la conseguente ottimizzazione del processo di disidratazione a flusso di aria calda, impiegando come prodotti carote biologiche (cv. Romance e *Carvejo*). Le carote sono state selezionate poiché sono una cultura che presenta un elevato contenuto in vitame, b-carotene e fibre. Inoltre, le carote disidratate sono materia prima largamente utilizzata nella produzione di piatti pronti, minestroni in polvere ed in mix di condimenti che sono diventati di uso comune tra i consumatori. Gli effetti negativi del processo di essiccazione potrebbero poi essere limitati dall'applicazione di pretrattamenti specifici.

La sperimentazione è stata suddivisa in tre attività:

Attività 1: Sviluppo di modelli predittivi per il controllo della qualità di carote (var. Romance) durante la disidratazione,

Attività 2: Studio di alcuni pretrattamenti per la ottimizzazione della disidratazione di carote (var. Romance) biologiche,

Attività 3: Impatto del blanching e dell'impregnazione sottovuoto in trealosio e/o the' verde sulle caratteristiche fisico-chimiche di rondelle di carota.

Di seguito verranno descritte tutte le fasi operative precisandone i parametri utilizzati in tutte le fasi.

6.1 Preparazione dei campioni

I prodotti ortofrutticoli utilizzati nella sperimentazione sono stati acquistati da un rivenditore di prodotti biologici locale e conservati a 4 ± 1 °C nelle celle presenti nei laboratori dell'Università degli Studi della Toscana fino al momento della lavorazione.

Prima del loro utilizzo, sono stati selezionati campioni di carote uniformi tra loro e allo stesso grado di maturazione; poi sono stati tenuti a temperatura ambiente fin quando non hanno raggiunto una temperatura di circa 20 °C nel cuore. Successivamente sono stati tagliati con utensili provvisti di lama in ceramica (coltello e pelapatate). Le carote, dopo la rimozione dell'epicarpo, sono state affettate in rondelle dallo spessore di 5 mm ciascuna. I campioni così preparati sono stati sottoposti a pretrattamenti specifici e ad un processo di disidratazione. Inoltre, i campioni sono stati sottoposti a determinazioni analitiche, sia dopo il pretrattamento che durante e dopo la disidratazione, con lo scopo di individuare l'andamento del processo di disidratazione e valutare il mantenimento delle caratteristiche qualitative. Tutti i passaggi di ciascuna sperimentazione sono descritti in dettaglio nei seguenti paragrafi.

6.2 Pretrattamenti

Prima di essere disidratati, i campioni sono stati sottoposti a dei pretrattamenti per mantenere le loro caratteristiche nutrizionali.

6.2.1 Attività 1: carote varietà Romance

le rondelle di carota cv Romance sono state sottoposte a:

➤ Scottatura in acqua calda (blanching)

Il trattamento di blanching in acqua calda è stato effettuato in acqua deionizzata ad una temperatura di 95 °C, utilizzando un gruppo termostatico per bagnomaria mod. Astor 800/D (Astori Tecnica, Poncarale (BS), Italia). Per il trattamento termico è stata scelta la combinazione temperatura /tempo 95°C per 1.5 minuto poiché era la più appropriata per l'inattivazione enzimatica. Al termine di ogni trattamento, il campione è stato raffreddato in acqua distillata con ghiaccio per 3 minuti. Per ciascun trattamento è stato impiegato il campione controllo rappresentato dal tempo di blanching pari a 0 min, ossia dal campione fresco, non sottoposto a blanching.

6.2.2 Attività 2:

Le rondelle di carota cv Romance sono state sottoposte a:

➤ Scottatura in acqua calda (blanching)

Il trattamento di blanching è stato effettuato immergendo i campioni di carota per 1.5 minuti in acqua deionizzata, portata alla temperatura di 95 °C tramite un gruppo termostatico per bagnomaria modello Astor 800D (Astori Tecnica s.n.c., Brescia, Italia). Per il trattamento termico è stata scelta la combinazione temperatura/tempo 95 °C e 1.5 minuti dimostratasi, dopo il confronto con diverse prove di combinazione, la più idonea per l'inattivazione dell'attività perossidasi (POD) con le costanti di velocità di inattivazione (k) e di tempo di riduzione decimale (D) più basse rispetto alle altre combinazioni (rispettivamente di 1.60 min⁻¹ e 1.44 min) (Moscetti et al., 2017). Dopo il trattamento di blanching, i campioni sono stati raffreddati in acqua distillata con ghiaccio per 3 minuti, al fine di rallentare e ritardare i fenomeni alterativi indotti dal trattamento termico.

➤ **Blanching in una soluzione di acido citrico**

Il trattamento di blanching è stato effettuato immergendo i campioni per 2 minuti in una soluzione di acqua deionizzata ed acido citrico al 2% (p/v), portata alla temperatura di 70 °C con lo stesso gruppo termostatico.

Dopo l'immersione, il campione è stato raffreddato in acqua distillata con ghiaccio per 3 minuti. Prima della sperimentazione sono state condotte prove di immersione a differenti tempi di immersione; rispettivamente di 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5 e 10 minuti. Si è poi preferito utilizzare l'intervallo di tempo di 2 minuti in quanto, rispetto agli altri intervalli temporali, è stato quello in grado di garantire la migliore diminuzione dell'attività perossidasi (POD).

➤ **Immersione in una soluzione di pectine**

Il trattamento di immersione è stato effettuato immergendo i campioni per 1 minuto in una soluzione di acqua deionizzata e pectine all' 1% (p/v). Le pectine (da agrumi) sono state aggiunte all'acqua deionizzata, preriscaldata ad 80 °C, tramite un agitatore magnetico a piastra riscaldante mod. Steromag (Steroglass S.r.l., Perugia, Italia). La temperatura elevata ha consentito alle pectine una completa dissociazione in acqua. La soluzione di acqua e pectina disciolta è stata infine, ancor prima di essere utilizzata correttamente per il trattamento di immersione, lasciata raffreddare a temperatura ambiente.

Terminato il trattamento, le rondelle di carota pretrattate sono state sottoposte ad asciugatura all'aria per 3 minuti.

➤ **Immersione in una soluzione di pectine con tecnica dell'impregnazione sottovuoto**

Il trattamento di immersione è stato condotto immergendo le rondelle di carota in una soluzione di acqua deionizzata e pectine all' 1% (p/v). Immediatamente dopo l'immersione i campioni sono stati soggetti ad impregnazione sottovuoto, condotta ad una pressione di 734 mBar esercitata per mezzo di una pompa da vuoto mod. DC1/1K (KNF, Neuberger GmbH, Germania) (Figura 10) e della durata di 10 secondi. Dopo il trattamento, i campioni sono stati sottoposti ad asciugatura all'aria per 3 minuti, prima di procedere con il processo di disidratazione.

Al termine della prima attività sperimentale, così come per le altre due attività, è stato condotto un confronto, tramite il *controllo*: ossia il riferimento rappresentato da campioni di carota non trattati, ma semplicemente immersi in acqua deionizzata alla temperatura ambiente.

6.2.3 Attività 3

Le rondelle di carota cv Carvejo sono state sottoposte a:

➤ **Scottatura in acqua calda (blanching)**

Il trattamento di blanching è stato effettuato immergendo i campioni di carota per 3 minuti in acqua deionizzata, portata alla temperatura di 90°C utilizzando il bagnetto termostato (*Klarstein Pentola Elettrica Slowcooker 550W, Germania*), (*Fig. 10*). I campioni trattati termicamente sono stati inseriti in apposite buste, immediatamente raffreddati in ghiaccio per 3 min e successivamente sono stati scolati e asciugati delicatamente con carta assorbente.

➤ **Scottatura in soluzione di trealosio al (4% p/v)**

Il trattamento di blanching è stato effettuato immergendo i campioni per 3 minuti in una soluzione di trealosio al 4% (p/v), portata alla temperatura di 90 °C con lo stesso bagnetto termostato. I campioni trattati termicamente sono stati inseriti in apposite buste, immediatamente raffreddati in ghiaccio per 3 minuti e successivamente sono stati scolati e asciugati delicatamente con carta assorbente.

➤ **Impregnazione sottovuoto (Vacuum Impregnation)**

Il pretrattamento ha previsto l'immersione delle rondelle di carote in diverse soluzioni all'interno delle campane. Le diverse soluzioni con cui è stato eseguito il pretrattamento sono:

- acqua deionizzata;
- thè verde 0.25% (p/v);
- trealosio 10% (p/v);
- thè verde 0.25% (p/v) e trealosio 10% (p/v).

I campioni immersi sono stati soggetti ad impregnazione sottovuoto esercitata per mezzo di una pompa da vuoto mod. Dc1/1k (*knf, neuberger GmbH, Germania*).

Dopo che i campioni hanno raggiunto la pressione del vuoto, sono stati lasciati per circa 10 min in immersione, facendo risalire gradualmente la pressione, fin quando non si raggiungono i 990 mbar (equivalenti alla pressione atmosferica). Le varie combinazioni dei pretrattamenti di scottatura e di impregnazione sottovuoto, effettuate durante la sperimentazione sono state riportate nella tabella seguente (*Figura6*):

Blanching 90°C - 3 min	Vacuum impregnation	
	Trealosio	Thè verde
Fresco	-	-
Trealosio 0%	-	-
Trealosio 0%	0.0%	0.25%
Trealosio 0%	10%	0.0%
Trealosio 4%	0.0%	0.25%
Trealosio 4%	10%	0.0%
Trealosio 4%	-	-
Trealosio 4%	10%	0.25%
Trealosio 0%	0.0%	0.0%
Trealosio 4%	0.0%	0.0%
Trealosio 0%	10%	0.25%

Figura 6 Combinazione dei pretrattamenti

Controllo

Il campione di controllo (Fresco) non ha subito nessun pretrattamento ma è stato processato in maniera analoga agli altri campioni trattati.

6.3 Processo di disidratazione

Il processo di disidratazione è stato svolto posizionando i campioni pretrattati e il controllo di ogni attività all'interno di un disidratatore a flusso di aria orizzontale mod. Biosec Domus B5 (Tauro Essiccatori s.r.l., Vicenza, Italia), sopra dei vassoi forati in plastica in dotazione col disidratatore stesso.

6.3.1 Attività 1

Il processo è stato testato effettuando dei test di screening a 40, 50 e 60°C per 8 ore di disidratazione. Le temperature di 50 e 60 °C sono state scartate dalla possibilità di impiego, in quanto non idonee ad ottenere un giusto processo di disidratazione del prodotto. Conseguentemente, tutti i test di disidratazione sono stati effettuati a 40°C.

Le analisi sui campioni sono state eseguite a 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 ore di disidratazione. Per ogni tempo sono stati prelevati 20 campioni.

6.3.2 Attività 2

La temperatura del disidratatore è stata fissata a 40 °C perché ritenuta, a seguito di precedenti test di screening condotti da 40 °C a 60 °C, la più idonea all'ottenimento di un adeguato processo di disidratazione (Moscetti et al 2017).

I campioni sono stati mantenuti a tale temperatura fino al raggiungimento del 16% del peso iniziale, che è stato rilevato appena prima dell'inserimento dei campioni nel disidratatore. La durata del processo di disidratazione ha spaziato dalle 6 alle 12 ore, in virtù del trattamento e delle condizioni di umidità dell'ambiente al momento della sperimentazione. Ogni ora, e fino al raggiungimento del peso finale corrispondente a circa il 16% di quello iniziale, sono state effettuate le pesate: sono stati estratti i vassoi contenenti i campioni dal disidratatore, sono stati prontamente pesati con una bilancia elettronica mod. E42S (Gibertini Elettronica s.r.l., Milano, Italia) e sono stati immediatamente messi a disidratare a 40 °C. Per ogni pesata sono state prelevati i primi 12 campioni del vassoio.

6.3.3 Attività 3

La temperatura fissata per il processo di disidratazione è di 60 °C.

I campioni sono stati mantenuti a tale temperatura fino al raggiungimento del peso finale pari al 15% del peso iniziale. La variazione di peso durante la disidratazione è stata monitorata tramite una bilancia elettronica mod. E42S (*Gibertini Elettronica s.r.l., Milano, Italia*) e una telecamera, capace di registrare ogni 5 secondi le variazioni di peso, posta davanti al display della bilancia sulla quale è disposto il disidratatore. Il processo di disidratazione è durato tra le 5 e le 7 ore, in virtù del trattamento e delle condizioni di umidità dell'ambiente al momento della sperimentazione.

6.4 Campionamenti

I campionamenti sono stati eseguiti per tutte e tre le attività sperimentali sia appena effettuato il pretrattamento che durante e alla fine del processo di disidratazione. Tutti i campioni raccolti sono

stati congelati, liofilizzati per 48 ore mediante liofilizzatore (modello *Virtis, Advantage*, in dotazione ai laboratori *Unitus*), confezionati sottovuoto e riposti immediatamente in congelatore a -80 °C.

6.5 Determinazioni analitiche

I campioni raccolti sono stati sottoposti a determinazioni analitiche, schematizzate in Tabella (Figura 7) per ogni attività sperimentale.

Determinazioni analitiche	Attività 1 Carote Romance	Attività 2 Carote Romance	Attività3 Carote carvejo
Saggio di attività enzimatica della perossidasi (POD)	X	X	X
Analisi colorimetrica	X	X	X
Determinazione del contenuto in fenoli totali		X	X
Estrazione e quantificazione dei carotenoidi	X	X	X
Analisi del contenuto di umidità e della velocità di disidratazione	X	X	X
Analisi del processo di reidratazione		X	X
Determinazione consistenza			X
Determinazione attività dell'acqua	X		X
Contenuto solidi solubili	X		X
Analisi dei modelli matematici per la disidratazione a strato sottile		X	
Spettrofotometria NIR	X		

Figura 7 Schema delle determinazioni analitiche

6.5.1 Metodiche analitiche

In questo paragrafo sono descritti i protocolli utilizzati durante le attività sperimentali.

Saggio di analisi enzimatica della perossidasi (POD)

Per determinare l'attività della perossidasi (POD) sono stati triturati 1.5 grammi di campione, prelevato dal congelatore a -80 °C, in 20 mL di Tampone fosfato salino (PBS 0.1 M, pH 6.5). La triturazione è avvenuta per mezzo dell'omogeneizzatore Ultra Turrax® mod. T25 a 3000 rpm (IKA, Staufen, Germania) ed è durata 60 secondi al fine di agevolare l'estrazione. Al campione triturato sono stati aggiunti 0.37 grammi di Polivinilpirrolidone (PVPP) al 2.5% (p/v) e 20 µL di TritonX-100, prima di essere centrifugato a 15.000 rpm per 20 minuti a 4 °C con una centrifuga mod. J2-21 (Beckman Analytical S.p.a., Milano, Italia) (Figura 12). Il surnatante ottenuto è stato prelevato conservato a 4°C prima di essere impiegato per il saggio enzimatico.

Per la registrazione dell'attività enzimatica è stato utilizzato lo spettrofotometro Lambda 25 UV-Vis (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) (Figura 13), tarato a 460 nm contro un bianco composto da 0.05 mL di estratto e 3.45 mL PBS. Per la lettura del campione sono stati invece utilizzati 0.05 mL di estratto, 1 mL di guaiacolo allo 0.25% (p/v), 0.5 mL di acqua ossigenata allo 0.75% v/v e 1.95 mL di PBS (0.1 mM, pH 6.5).

L'attività della POD è stata quindi misurata per 3 minuti, ed è stata espressa come unità di cambiamento d'assorbanza (0.01) a 460 nm/min.

$$Att. POD = \frac{A_{min} - A_0}{min * 0.01}$$

Analisi colorimetrica

L'analisi colorimetrica è stata eseguita per mezzo di un colorimetro mod. DM-2600d (Minolta, Osaka, Giappone). Le acquisizioni sono state eseguite ad inizio e fine disidratazione, eseguendo un'acquisizione per lato delle rondelle di carota.

Le rivelazioni al colorimetro sono state impiegate per il monitoraggio dei cambiamenti del colore dei campioni durante l'intero processo di disidratazione.

I risultati di queste sono stati espressi nello *spazio colorimetrico CIElab* (Fig. 15), il quale viene identificato da tre coordinate colorimetriche: L^* (z [0 ÷ +100]), che definisce la *luminosità*, a^* (x [-127 ÷ +128]) e b^* (y [-127 ÷ +128]), che corrispondono alle *coordinate di cromaticità*. Queste coordinate sono state adoperate poi per la determinazione dell'*Angolo di colore* o *Tinta* ($h = \arctang b^* a^{*-1}$) e del *Croma* o *Saturazione* ($C^* = [a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$) di ciascun campione.

A valori positivi e negativi di a^* corrispondono rispettivamente toni cromatici tendenti al rosso ed al verde, mentre i valori positivi e negativi di b^* rappresentano rispettivamente tonalità cromatiche gialle e blu. Il valore della luminosità L^* è compreso tra 0 (nero) e 100 (bianco).

Il valore di h definisce la *tinta* del colore in esame ed assume tutti i valori compresi nell'angolo giro (360°), mentre il valore della saturazione (C^*) è prossimo a 0 per i toni pressoché acromatici ed aumenta all'aumentare della brillantezza.

I cambiamenti di viraggio del colore nello spazio colorimetrico CIElab sono stati infine misurati con il White Index (WI) che rappresenta l'*indice di bianco* ed indica il grado di biancore complessivo raggiunto dai prodotti alimentari, da collegarsi all'entità della perdita di colore subita dai prodotti durante la disidratazione (Hsu et al. 2003, Rhim et al. 1999).

$$WI = \sqrt{(100 - L^{*2}) + a^{*2} + b^{*2}}$$

Acquisizioni mediante scanner piano

Le scansioni sono state eseguite con l'obiettivo di ottenere una visione dettagliata dei cambiamenti di colore riscontrati sulla superficie di ciascun campione. Le acquisizioni sono state effettuate prima e dopo ogni pretrattamento e durante le 8 ore di disidratazione durante le fasi di screening a 40, 50 e 60°C. Allo scopo è stato impiegato il software Vuescan v9.2.11 PE (Hamrick software). Ogni immagine è stata ottenuta come media di 3 scansioni, ad una risoluzione pari a 2230×1900 pixels (600 dpi) ed una profondità di colore di 24 bits (pari a 8 bits per canale sRGB). Le scansioni sono state salvate nel formato lossless RAW-Tagged Image File Format (TIFF).

Determinazione del contenuto in fenoli totali

Per la determinazione dei fenoli totali è stato pesato 1 g di carota liofilizzata di ogni pretrattamento per ogni tempo di campionamento. A questi sono stati aggiunti 15 mL di etanolo all'80% (v/v); il preparato ottenuto è stato mantenuto in agitazione per 1 ora al buio ed è stato quindi centrifugato a 15000 giri a 4 °C per 15 minuti. Dopo la centrifugazione è stato prelevato il surnatante che è stato posto in frigorifero per un suo pronto impiego.

Per la preparazione del campione sono stati utilizzati 1.58 mL di acqua distillata, 20µL di surnatante, 100 µL di reattivo di *Folin-Ciocalteu* e 300µL di carbonato disodico (Na_2CO_3) al 7.5% (p/v); per la preparazione del bianco sono stati utilizzati 2 mL di acqua distillata. Il tutto è stato incubato per 30 minuti a 45 °C nel gruppo termostatico per bagnomaria modello Astor 800D. Le misure sono state effettuate contro bianco utilizzando lo spettrofotometro Lambda 25 UV-Vis impostato alla lunghezza d'onda di 760 nm.

La concentrazione di fenoli totali è stata quindi espressa come mg di acido gallico equivalente (GAE) su 100 g di prodotto secco (DW), sulla base di una retta di taratura ottenuta utilizzando concentrazioni crescenti (da 1 mL a 2.5 mL) di acido gallico.

Estrazione e quantificazione dei carotenoidi

Per la procedura sono stati pesati 50 mg di carota liofilizzata di ogni pretrattamento e, per ogni tempo di campionamento, sono state eseguite due repliche. I campioni pesati sono stati messi in 10 mL di solvente estraente (costituito da 250 mL di n-esano, 125 mL di acetone e 125 mL di etanolo, in rapporto 2:1:1).

Le soluzioni sono state poi omogeneizzate con l'omogenizzatore Ultra Turrax mod. T25 a 3000 rpm; una volta omogeneizzati, i campioni sono stati disposti su un rotatore mod. CERTOMAT®R (Sartorius S.p.a., Gottinga, Germania) overnight a 150 rpm.

Dopo la notte, sono stati aggiunti ai campioni 5 mL di acqua distillata per ottenere la separazione di fase dei carotenoidi, che sono stati estratti dopo un'attesa di 20 minuti prelevando il surnatante. La procedura di estrazione è avvenuta in condizioni di assenza di luce diretta, poiché i carotenoidi sono pigmenti fotosensibili alla luce solare. Per la lettura dei campioni, è stato tarato lo spettrofotometro Lambda 25 UV-Vis impostato da 300 nm a 600 nm (range di lunghezza d'onda dove si collocano i carotenoidi) ed è stata fatta partire la lettura contro bianco, costituito da etanolo 96%, e contro campione, costituito da 2.000 µL di etanolo 96% e 1.000 µL di surnatante.

Ad ognuno dei due tempi di campionamento dei rispettivi pretrattamenti sono state effettuate quattro repliche.

Analisi spettrofotometrica NIR

Le scansioni NIR sono state eseguite utilizzando lo spettrofotometro Luminar 5030 (Brimrose, Sparks, Maryland, USA).

Gli spettri sono stati acquisiti in riflettanza diffusa, nel range elettromagnetico compreso tra i 1100 e 2300 nm, ad una risoluzione di 2 nm. Ogni spettro acquisito era il risultato della media di 10 scansioni consecutive eseguite in automatico dallo strumento. I dati ottenuti sono stati convertiti in assorbanza direttamente dal software di acquisizione SNAP! v2.04, in dotazione con lo strumento.

Lo spettro medio di ciascun campione è stato ottenuto dalla media di 4 acquisizioni, 2 per ogni lato della rondella.

6.5.2 Analisi del processo di reidratazione

I campioni sottoposti ai pretrattamenti e disidratati sono stati pesati e reidratati tramite un'immersione in acqua, avvalendosi del gruppo termostatico per bagnomaria modello Astor 800D. La temperatura dell'acqua di reidratazione è stata fissata a 50 °C e la durata dell'immersione è stata di 50 minuti, effettuando in questo lasso di tempo dei campionamenti delle rondelle di carota (9 alla volta) dopo 10, 20, 30, 40 e 50 minuti e registrandone la variazione di peso (Maskan, 2000).

La determinazione dell'umidità è stata eseguita in una stufa a convezione naturale serie FN 400 (Nüve, Ankara, Turchia) (Figura 19) ponendovi i campioni (prelevati a fine disidratazione e subito pesati) a 105 °C per 48 ore, ossia fino al raggiungimento di un peso costante.

Terminate le 48 ore, i campioni sono stati ripesati ed il valore di umidità su peso secco è stato ottenuto tramite l'impiego della seguente formula:

$$Umidità = \frac{p_0 - p_f}{p_f}$$

p_0 = peso iniziale (g) del campione umido

p_f = peso finale (g) del campione secco

6.6 Analisi statistica

Attività 1:

Analisi della varianza (ANOVA) e confronto a coppie

L'ANOVA ad una via è stata applicata per valutare ed identificare significativi cambiamenti nel contenuto in umidità, solidi solubili, sostanza secca, contenuto in carotenoidi ed acqua libera durante i 9 tempi di disidratazione. Lo stesso approccio statistico è stato utilizzato per l'analisi dei cambiamenti di colore osservati nelle tre componenti del colore (L^* , a^* e b^*), nell'angolo di colore (h) e nel croma (C^*).

Il confronto a coppie tra tempi di disidratazione è stato effettuato mediante Tukey's test per un valore di significatività (α) pari a 0.05.

Per l'ANOVA ed il Tukey's test è stato utilizzato il software R v3.2.4 in abbinamento al pacchetto 'agricolae' v1.2-3.

Chemometria

L'analisi chemometrica è stata effettuata mediante l'impiego del software Matlab v2015a (Mathworks, Natick, Massachusetts, USA) in combinazione con il pacchetto pls_toolbox v8.1 (Eigenvector, Manson, WA, USA).

Nel dettaglio, è stato sviluppato un algoritmo iterativo per la selezione delle migliori combinazioni di pretrattamenti spettrali, tra una loro selezione. La selezione dei pretrattamenti è stata effettuata in base all'impatto degli stessi sull'errore di predizione del modello in sviluppo.

Pretrattamento degli spettri

L'attività di pretrattamento degli spettri è stata effettuata per estrapolare la massima informazione possibile dai dati, riducendo al minimo l'errore di misurazione dovuto a fenomeni di “scattering” (effetto additivo e moltiplicativo sullo spettro) ed all'errore strumentale.

La varianza informativa contenuta negli spettri è stata quindi massimizzata testando tutte le combinazioni possibili dei seguenti pretrattamenti (Fig.8):

- Multiplicative Scatter Correction (MSC)

$$^{msc}R_{ik} = a_i + b_i \bar{R}_k + e_{ik}$$

- Standard Normal Variate (SNV)

$$^{snv}R_{ik} = (R_{ik} - \mu_i) \cdot \sigma_i^{-1}$$

- Filtro Savitzky-Golay
- Smoothing a 5, 9 e 13 punti (rispettivamente S5, S9 e S13)
- Trasformazioni in derivata prima (D1f) e seconda (D2f) degli spettri
- Normalizzazione tramite Mean centering (MC)

$$^{mc}R_{ik} = R_{ik} - \mu_k$$

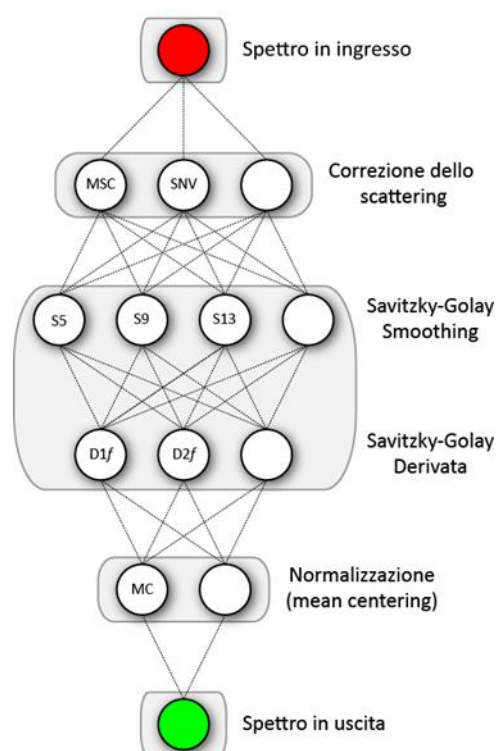


Figura8 pretrattamenti degli spettri

Sviluppo dei modelli di regressione

Il dataset in uscita dagli step di pretrattamento è stato utilizzato per lo sviluppo ed il test di modelli di regressione PLS (Partial Least Squares), mirati a predire l'umidità, il contenuto di carotenoidi, i solidi solubili, l'attività dell'acqua ed i cambiamenti di colore osservati durante la disidratazione. La scelta del numero di variabili latenti (LV) impiegate in ciascun modello è stata ponderata mediante cross-validazione "venetian blind", in quanto la più adeguata nella stima delle prestazioni di modelli ottenuti da serie temporali.

Le performance di ciascun modello sono state valutate in termini di (1) RMSE (radice dell'errore quadratico medio o Root Mean Square Error) che fornisce informazioni riguardo la discrepanza fra i valori osservati e quelli stimati; (2) BIAS (errore sistematico) che mostra la distorsione del valore atteso da quello stimato; (3) R^2 (coefficiente di determinazione) che indica la frazione della varianza della variabile dipendente espressa dalla regressione.

A partire dal miglior modello PLS è stata successivamente eseguita una selezione stepwise-forward di un massimo di 10 lunghezze d'onda tramite algoritmo iPLS (interval PLS). Le prestazioni dei modelli iPLS sono state confrontate con il miglior modello SIMPLS, basato sull'impiego dello spettro completo.

Sviluppo dei modelli di classificazione

Nello sviluppo dei modelli di classificazione, il dataset è stato suddiviso in 3 classi sia per il dataset del controllo che per i campioni trattati al microonde. La suddivisione in cluster è stata effettuata utilizzando l'algoritmo K-means, impiegando i dati provenienti dalle analisi distruttive di ciascun trattamento. Il numero ottimale dei cluster è stato individuato mediante l'identificazione del minimo locale descritto dal numero di cluster ed il logaritmo della differenza della somma dei quadrati dell'errore tra la misurazione attuale e 250 dataset simulati.

Sulla base dei cluster individuati dall'algoritmo K-means, sono stati elaborati dei modelli predittivi in grado di indentificare le fasi di disidratazione sulla base dell'informazione contenuta negli spettri NIR. I modelli di analisi discriminanti sono stati sviluppati basandosi sull'impiego (1) degli spettri completi mediante algoritmo PLSDA e (2) da 1 a 10 lunghezze d'onda mediante algoritmo iPLSDA (selezione stepwise-forward). Le prestazioni dei modelli sono state valutate utilizzando le seguenti metriche:

- Sensitività, rapporto tra il numero di elementi correttamente classificati come appartenenti ad una specifica classe ed il totale degli elementi appartenenti alla classe in questione;

$$\text{Sensitività} = \frac{\text{Veri Positivi}}{\text{Veri Positivi} + \text{Falsi Negativi}}$$

- Selettività, rapporto tra il numero di elementi correttamente classificati come appartenenti all'insieme delle altre classi ed il totale degli elementi appartenenti alle altre classi;

$$\text{Selettività} = \frac{\text{Veri Negativi}}{\text{Falsi Positivi} + \text{Veri Negativi}}$$

- Falso positivo, rapporto tra il numero di elementi erroneamente classificati come appartenenti ad una specifica classe ed il totale degli elementi appartenenti alla classe in questione;

$$\text{Falso Positivo} = \frac{\text{Falsi Positivi}}{\text{Falsi Positivi} + \text{Veri Negativi}}$$

- Falso negativo, rapporto tra il numero di elementi erroneamente classificati come appartenenti all'insieme delle altre classi ed il totale degli elementi appartenenti alle altre classi.

$$\text{Falso Negativo} = \frac{\text{Falsi Negativi}}{\text{Veri Positivi} + \text{Falsi Negativi}}$$

- Accuratezza, proporzione degli elementi correttamente classificati nell'intera popolazione in esame.

$$\text{Accuratezza} = \frac{\text{Veri Positivi} + \text{Veri Negativi}}{\text{Totali Positivi} + \text{Totali Negativi}}$$

Attività 2

I dati ottenuti da tutte le analisi qualitative condotte sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA, Analysis of Variance), ovvero ad una tecnica statistica di tipo parametrico che permette il confronto tra due o più gruppi di dati confrontando la variabilità interna a questi gruppi con la variabilità tra questi.

In particolar modo l'analisi della varianza mira a verificare contemporaneamente se le medie di più gruppi sono uguali rispondendo alla domanda: l'interazione trattamento-tempo è significativamente differente tra i gruppi?

L'ANOVA ad una via (One-way ANOVA) è stata impiegata per identificare significativi cambiamenti nelle analisi del contenuto di carotenoidi totali, della velocità di reidratazione, del rapporto tra contenuto di umidità e velocità di disidratazione (MC/DR) ed analisi colorimetrica, prendendo in considerazione la sola variabile indipendente pretrattamento.

L'ANOVA a due vie (Two-way ANNOVA) è stata impiegata per identificare cambiamenti significativi nelle analisi di attività enzimatica della perossidasi (POD), contenuto in fenoli totali ed isomerizzazione dei carotenoidi, prendendo in considerazione la variabile indipendente pretrattamento e la variabile dipendente tempo di disidratazione.

I risultati dell'ANOVA positivi sono stati quindi utilizzati per la determinazione della differenza significativa onesta (Honest Significant Difference, HSD) tramite il Tukey's test ad un valore soglia di significatività α di 0.05.

Per l'ANOVA ed il Tukey's test è stato utilizzato il software R v3.2.4 in abbinamento al pacchetto 'agricolae' v1.2-3.

Attività 3

I dati ottenuti da tutte le analisi condotte sono stati elaborati tramite l'analisi della varianza (ANOVA, Analysis of Variance), un insieme di tecniche statistiche facenti parte della statistica inferenziale che permettono di confrontare due o più gruppi di dati confrontando la variabilità interna a questi gruppi con la variabilità tra i gruppi. Inoltre, consente di verificare ipotesi relative a differenze tra le medie di due o più popolazioni.

È possibile classificare i diversi modelli di ANOVA in base al numero di variabili indipendenti e dipendenti:

- i modelli che prevedono una sola variabile indipendente definiscono un'analisi della varianza univariata;
- i modelli che prevedono due o più variabili indipendenti vengono definiti disegni fattoriali definiscono un'analisi della varianza multivariata.

L'ANOVA ad una via (One-way ANOVA) è stata impiegata per identificare significativi cambiamenti nell'analisi di attività enzimatica della perossidasi (POD) e della velocità di disidratazione, prendendo in considerazione la variabile tempo di disidratazione.

L'ANOVA a due vie (Two-way ANNOVA) è stata impiegata per identificare cambiamenti significativi nell'analisi di reidratazione, prendendo in considerazione la variabile pretrattamento e la variabile tempo di disidratazione. Inoltre, è stata impiegata per identificare cambiamenti significativi nelle analisi colorimetrica, dell'attività dell'acqua, del contenuto dei carotenoidi totali, del contenuto dei fenoli totali, della consistenza, del contenuto di umidità e dei solidi solubili totali.

I risultati dell'ANOVA positivi sono stati quindi utilizzati per la determinazione della differenza significativa onesta (Honest Significant Difference, HSD) tramite il Tukey's test ad un valore soglia di significatività α di 0.05.

Le elaborazioni statistiche e grafiche sono stati eseguite utilizzando il software R.

7.0 Risultati e discussione

In questo capitolo verranno discussi i risultati provenienti dalle tre attività.

7.1 Attività 1

7.1.1 Analisi del test di blanching e inattivazione enzimatica

Per evitare l'imbrunimento dovuto alla presenza degli enzimi ossidativi e degradativi nei confronti dei carotenoidi durante il processo di disidratazione, è stato eseguito il pretrattamento di blanching in acqua calda. Lo scopo del pre-trattamento è stato quello di individuare la giusta combinazione tra temperatura e tempo di trattamento di blanching in grado di inattivare completamente l'attività enzimatica dell'enzima perossidasi (POD). L'enzima POD è stato utilizzato come enzima marker in quanto è il più termostabile tra gli enzimi presenti nella matrice. Ciò significa che inattivando tale enzima è possibile asserire che anche gli altri enzimi sono stati denaturati. Il pretrattamento di blanching in acqua calda è stato testato alle seguenti temperature: 70°C, 80°C, 90°C e 95°C da 0.5 a 20 min. Nel grafico sottostante (Fig. 9) viene riportata la regressione lineare esistente tra il tempo di blanching e l'attività enzimatica residua della POD (espresso su scala logaritmica) per le differenti temperature di trattamento impiegate: ad una pendenza maggiore della retta mostra corrisponde una inattivazione enzimatica più rapida.

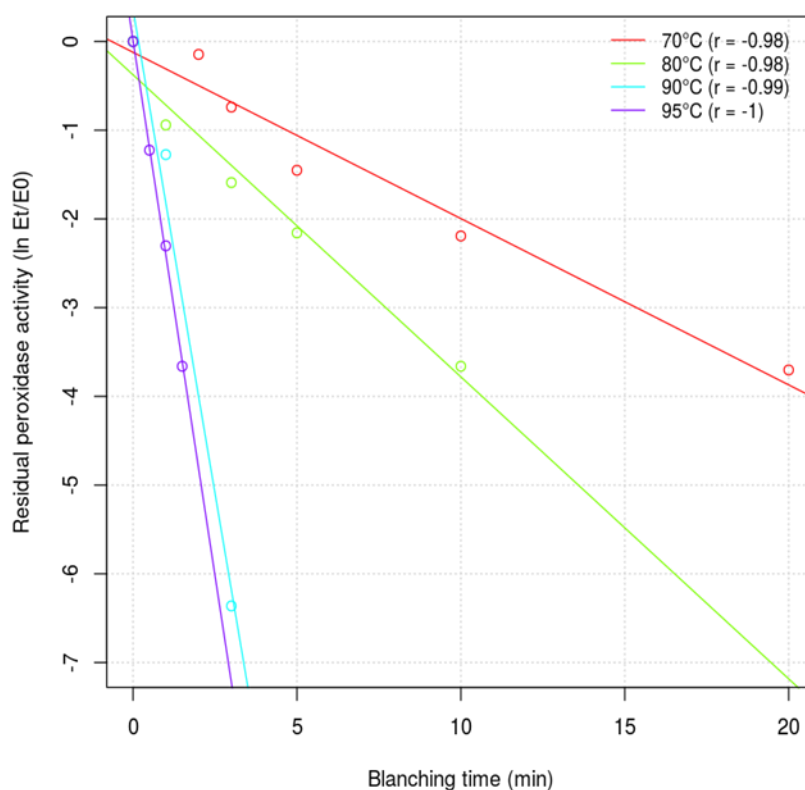


Figura 9 Andamento dell'attività enzimatica residua della POD durante trattamenti di blanching in acqua calda a 70°, 80°, 90° e 95°C.

I dati ottenuti sono stati impiegati per determinare la costante di inattivazione ed il tempo di dimezzamento ($t_{1/2}$ o half-life) dell'enzima POD per ogni temperatura di trattamento (figura 10). Il $t_{1/2}$ è il tempo necessario per ridurre del 50% l'attivazione dell'enzima. Come mostrato in tabella, la temperatura di trattamento più efficace è risultata essere pari a 95°C, pari ad un $t_{1/2}$ di 0.29 min.

Blanching temperature (°C)	Deactivation constant E-2 (min ⁻¹)	Half-life, $t_{1/2}$ (min)	Correlation coefficient, r
70	20.28	3.42	0.98
80	56.71	1.22	0.98
90	169.78	0.41	0.99
95	239.78	0.29	1.00

Figura 10 Valori della costante di inattivazione enzimatica, del tempo di dimezzamento dell'attività enzimatica e del coefficiente di correlazione alle temperature di blanching di 70°,80°, 90° e 95°C.

Successivamente, il tempo di dimezzamento è stato utilizzato per definire l'andamento dell'attività enzimatica residua al variare del tempo, per ogni temperatura di blanching, utilizzando la formula seguente:

$$E_t = E_0 \left(\frac{1}{2} \right)^{\frac{t}{t_{1/2}}}$$

L'andamento dell'attività enzimatica residua della POD è riportato in Fig. 11. È possibile osservare che le temperature di blanching a 90 e 95°C comportino, a parità di tempo una diminuzione dell'attività enzimatica residua nettamente maggiore rispetto alle temperature di 70° e 80°C.

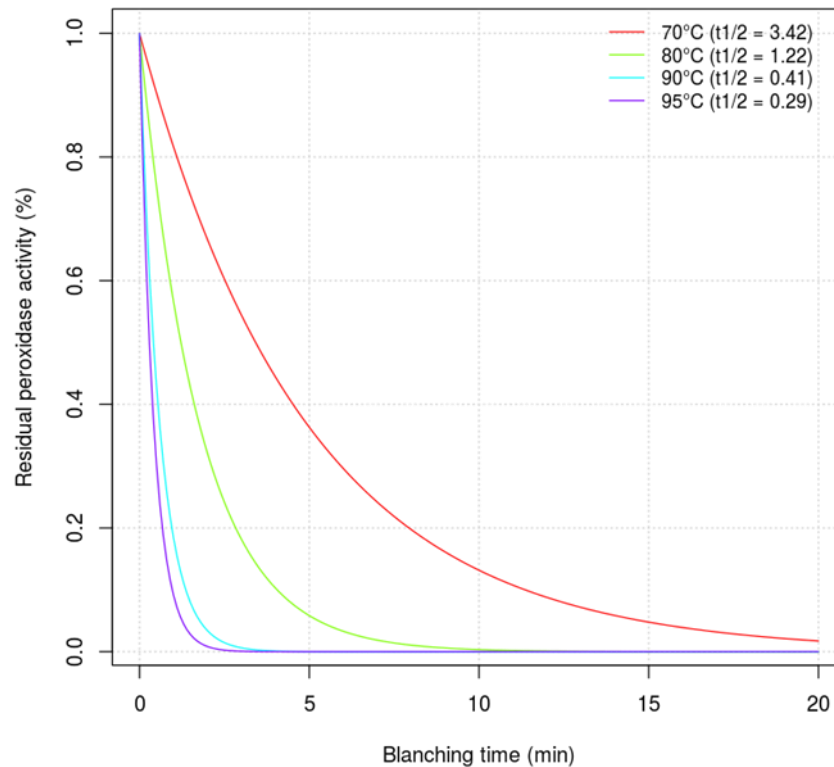


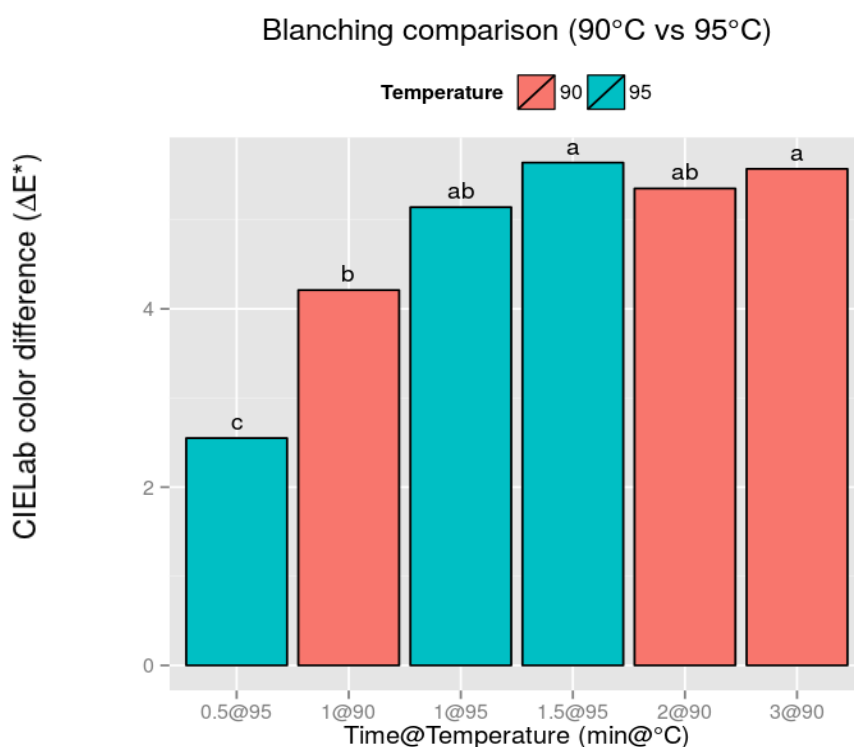
Figura 11 *Variazione dell'attività enzimatica residua della POD in funzione del tempo di blanching.*

Poiché le temperature di 90°C e 95 °C inattivavano quasi completamente l'enzima POD in breve tempo, la selezione del miglior trattamento è stata effettuata valutando l'impatto delle due temperature in questione sul colore del prodotto.

7.1.2 Analisi d'immagine a seguito dell'effetto del trattamento di blanching

Il grafico in Fig. 12 mostra le variazioni osservate nella differenza di colore CIELab durante i pretrattamenti di blanching a 90° e 95°C. È possibile asserire che al termine dei due trattamenti il colore tra campioni non differisse. Conseguentemente, il trattamento di blanching a 95°C per 1.5 min è stato ritenuto migliore, in quanto permetteva di ottenere la quasi completa inattivazione enzimatica, senza arrecare cambiamenti di colore che fossero differenti dagli altri trattamenti di blanching.

Figura 12 *Variazione di colore nello spazio CIELab a temperature di 90° e 95°C*



7.1.3 Contenuto di carotenoidi a seguito dell'effetto del trattamento di Blanching

Le temperature di blanching di 90 e 95°C sono state valutate andando a determinare anche i cambiamenti nel contenuto di carotenoidi a seguito dell'esposizione del prodotto alle alte temperature. L'analisi è stata eseguita mediante metodica spettrofotometrica. I profili spettrali scansionati durante le analisi sono stati utilizzati per definire i minimi

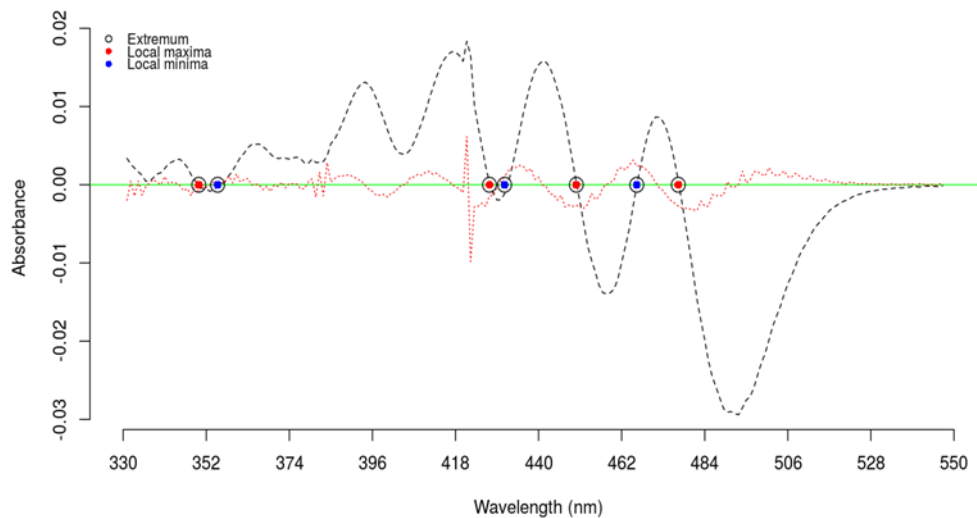


Figura 13 Profilo spettrale del contenuto di carotenoidi a diverse lunghezze d'onda.

ed i massimi locali dello spettro tipico dei carotenoidi, mediante il calcolo delle derivate I e II (Fig.13):

- a valori della derivata I pari a 0 sono corrisposti massimi e minimi locali dello spettro dei carotenoidi;
- a valori della derivata II superiori a 0 sono corrisposti dei minimi locali, mentre per valori inferiori a 0 sono stati identificati i massimi locali dello spettro.

Le lunghezze d'onda identificate come massimi locali sono risultate pari a 350 nm, 427 nm, 450 nm, 477 nm (Fig. 14). Tale elaborazione matematica è stata effettuata utilizzando il software statistico R.

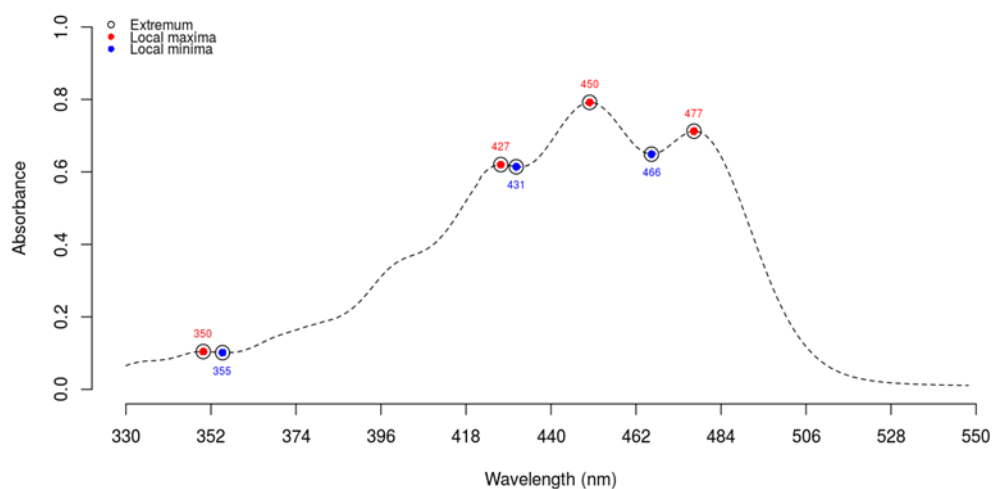


Figura 14 Profilo spettrale del contenuto di carotenoidi associato ai massimi e minimi locali.

I valori di assorbanza dei massimi locali sono stati impiegati per stimare il contenuto in carotenoidi nel prodotto trattato e non trattato. In figura 13 sono riportati i valori di assorbanza dei massimi locali, confrontati tra loro in funzione dei tempi e delle temperature di trattamento: 90°C per 1, 2 e 3 min e 95°C per 0.5, 1 e 1.5 min. In base a quanto riportato in tabella (fig. 15 è possibile notare che non vi sono differenze significative nel campione di controllo, in funzione del tempo, per le lunghezze d'onda di 450 e 477 nm. Sui campioni trattati osserviamo un incremento del contenuto in carotenoidi sia ad una temperatura di 90°C per 1 e 2 min di trattamento, sia per un blanching a 95°C per 0.5 e 1 min di immersione in acqua calda. Inoltre, effettuare il blanching a 90 per 3 min ed a 95°C per 0.5 min comporta in entrambi i casi una diminuzione nel contenuto di carotenoidi e quindi un impoverimento nutrizionale del prodotto. In base a ciò ed in funzione dei cambiamenti colorimetrici osservati e precedentemente valutati, la temperatura di 95°C è stata selezionata per i test successivi della sperimentazione. La motivazione della scelta risiede nel fatto che non vi sono sostanziali differenze qualitative nel prodotto a seguito dei trattamenti a 90 e 95°C. Ciò ha comportato che i 95°C fossero preferibili per via del minor tempo necessario ad inattivare l'enzima POD.

CONTROL (3 MIN)	Time (min)	Abs@350	Abs@427	Abs@450	Abs@477
	1	0.08 ns	0.49 ns	0.63 ns	0.56 ns
	2	0.07 ns	0.47 ns	0.61 ns	0.55 ns
	3	0.05 ns	0.45 ns	0.60 ns	0.54 ns
90°C (3 MIN)	Time (min)	Abs@350	Abs@427	Abs@450	Abs@477
	1	0.10 b	0.66 a	0.85 a	0.77 a
	2	0.11 a	0.61 b	0.77 b	0.69 b
	3	0.09 b	0.52 c	0.65 c	0.59 c
CONTROL (1.5 MIN)	Time (min)	Abs@350nm	Abs@427	Abs@450	Abs@477
	0.5	0.08 b	0.54 b	0.70 ns	0.63 ns
	1	0.11 a	0.64 a	0.80 ns	0.72 ns
	1.5	0.09 ab	0.60 ab	0.78 ns	0.71 ns
95°C (1.5 MIN)	Time (min)	Abs@350	Abs@427	Abs@450	Abs@477
	0.5	0.08 b	0.53 b	0.69 b	0.63 b
	1	0.10 a	0.69 a	0.91 a	0.83 a
	1.5	0.08 b	0.48 c	0.60 c	0.53 c

Figura 15 Effetto sul contenuto di carotenoidi sui campioni trattati e di controllo a seguito del pretrattamento del blanching.

7.1.4 Risultati disidratazione

I test di disidratazione sono stati effettuati a 40° C per 8 ore. I risultati dell'analisi statistica dei dati ottenuti monitorando la variazione nel contenuto di umidità, acqua libera, solidi solubili, colore e contenuto di carotenoidi sono di seguito riportati.

Contenuto di umidità

I grafici delle figure 16 mostrano la variazione del contenuto di umidità durante le 8 ore di disidratazione nei campioni di controllo ed in quelli pretrattati tramite blanching. Nel controllo, durante le prime due ore di disidratazione, non si osservano differenze significative nel contenuto di umidità dei campioni; successivamente il prodotto comincia a perdere gradualmente peso sino alla 8^a ora di disidratazione. L'andamento osservato per il controllo induce ad ipotizzare che siano necessarie più di 8 ore di disidratazione per ottenere una efficace disidratazione dell'alimento. Per quanto riguarda il trattamento di blanching, la perdita di acqua da parte delle carote sembra molto più veloce e l'andamento della stessa è di tipo sigmoidale, raggiungendo valori minimi nel contenuto di umidità a partire dalla 6^a ora di processo. Ai tempi 6, 7 e 8 i risultati sono statisticamente uguali tra i campioni trattati con blanching. Riguardo alla variabilità dei risultati, questo fenomeno si può attribuire alle fasi di misurazioni, dalla dimensione e dalla forma dei campioni, dalla variabilità intrinseca del lotto di carote e dalla disposizione dei tasselli nel disidratatore. Assunto ciò, è opportuno attendersi delle misurazioni con dei leggeri scostamenti dalla situazione ideale, ossia dalla condizione in cui il contenuto di umidità del prodotto diminuisca secondo un andamento perfettamente sigmoidale.

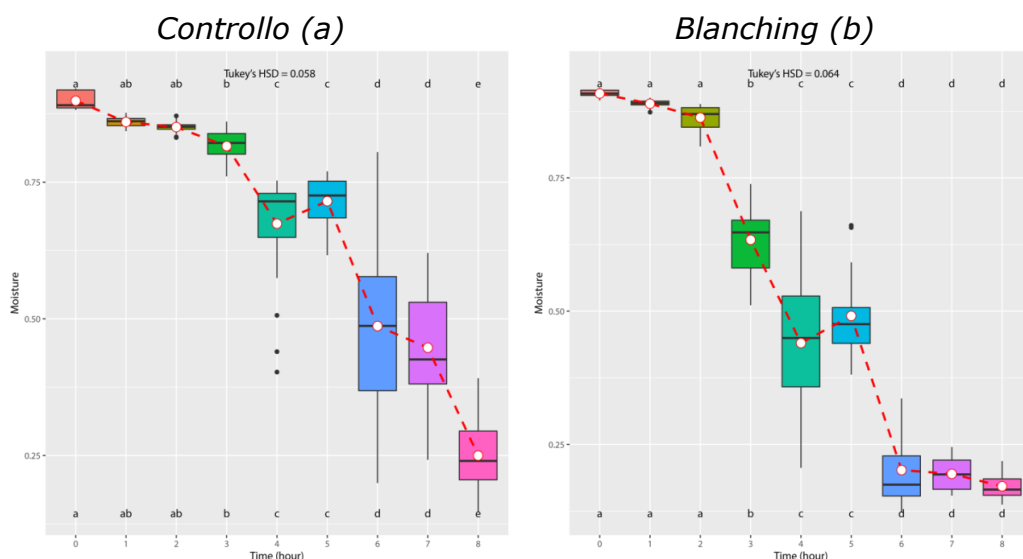


Figura 14 Variazione del contenuto di umidità durante le 8 ore di disidratazione nel controllo (16a) e nei campioni pretrattati con blanching (16b) Attività dell'acqua (a_w).

Attività dell'acqua

L'andamento dell'attività dell'acqua rispecchia quanto già esposto nel paragrafo relativo alla perdita di umidità dei campioni. Ciò è particolarmente evidente per il trattamento di controllo (Fig.16). L'analisi conferma che 8 ore di disidratazione non sono stati sufficienti a disidratare il prodotto in modo efficace, in quanto l'attività dell'acqua assume valori prossimi a 0.55 e quindi non soddisfacenti. Nel caso delle carote soggette a blanching, l'analisi mostra chiaramente che 8 ore di disidratazione sono necessarie e sufficienti per ridurre l'attività dell'acqua a valori inferiori a 0.4. Di conseguenza, è possibile affermare che il trattamento di blanching favorisce la perdita di acqua durante il processo di disidratazione, impattando considerevolmente sulla durata del processo e quindi su consumi energetici e conservabilità finale dell'alimento.

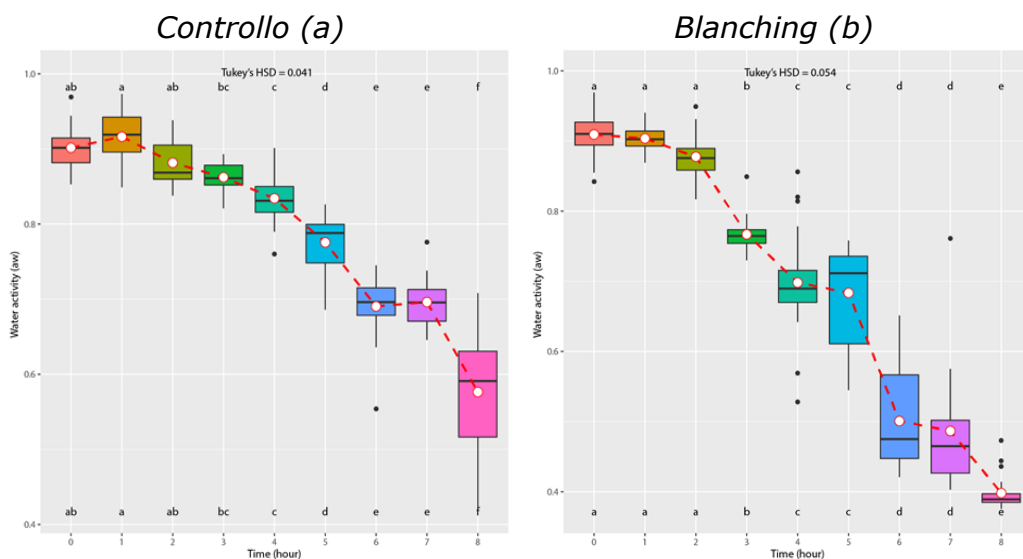


Figura 16 Variazione dell'attività dell'acqua durante le 8 ore di disidratazione nel controllo (16a) e nei campioni pretrattati con blanching (16b).

Solidi solubili totali (SSC)

I grafici riportati nelle figure 17 mostrano l'andamento nel contenuto di solidi solubili totali nelle carote a seguito del processo di disidratazione a cui sono state sottoposte. L'andamento del contenuto di SSC cambia notevolmente tra trattamenti. Infatti, la lenta disidratazione del controllo si ripercuote sull'andamento del contenuto di SSC durante il processo. I dati ottenuti permettono di definire un andamento che risulta in linea con quanto osservato per i valori di umidità ed attività dell'acqua riscontrati. Lo stesso può essere affermato per i campioni trattati con blanching: caratterizzati da un contenuto di SSC più elevato in quanto soggetti ad una maggiore perdita di acqua durante la disidratazione. Ciò è particolarmente evidente a partire 6° ora di disidratazione: fase durante la quale il contenuto in SSC è molto superiore rispetto a quanto osservato nel controllo. È quindi opportuno attendersi un impatto del trattamento sul sapore finale del prodotto.

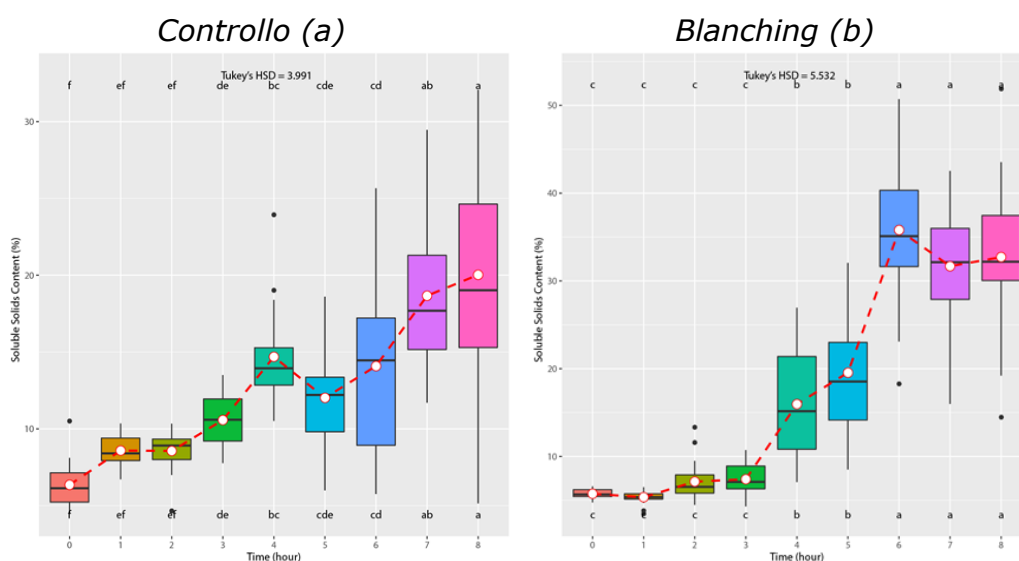


Figura 17 Variazione del contenuto di solidi solubili totali durante le 8 ore di disidratazione nel controllo (17a) e nei campioni pretrattati con blanching (17b).

Analisi colorimetrica

L'analisi colorimetrica durante la disidratazione mette in evidenza dei cambiamenti di colore totalmente differenti tra campioni di controllo e blanching. Nel caso del controllo i cambiamenti di colore più evidente corrispondono ad un incremento dei valori di luminosità (L^*) del prodotto. Per le carote trattate con blanching il cambiamento di colore riscontrato riguarda una diminuzione graduale nel tempo dei valori di tinta (h). Per le altre coordinate di colore non sono state osservate delle variazioni tali da poter essere considerate utili per la valutazione dell'andamento del processo di disidratazione.

CIELab – L^* (Luminosità)

La figura 18 riporta l'andamento della luminosità associato ai diversi tempi di disidratazione. I valori di L^* mostrano un incremento fino alla 6° ora di disidratazione, per poi diminuire significativamente nelle ore successive. Il fenomeno dello “sbiancamento” delle carote è dovuto all'azione dell'enzima fenilalanina ammonio-liasi (PAL) responsabile della produzione di suberina da parte delle cellule danneggiate dal taglio e quindi del cambiamento di colore del tessuto. La risposta fisica è un cambiamento di colore della superficie a causa della disidratazione reversibile (L. Cisneros-Zevallos, M.E. Saltveit, J. M. Krochta). Dopo la disidratazione prolungata, le carote non riacquisiranno il loro colore originale. Il rapido aumento dell'attività PAL nel floema secondario delle carote pretrattate rispetto a quella di controllo, suggerisce una risposta fisiologica

come un risultato di abrasione. La disidratazione e le alterazioni strutturali degli strati di cellule più superficiali sono state le principali cause di sbiancamento nelle carote che non è dipesa da accumulo di lignina, ma piuttosto dalla sintesi di composti fenolici non strutturali (Ventrella, C. Marília, Moretti, L. Celso, Carnellosi, A.G. Marcelo, Puschmann, Rolf).

Il fenomeno è ampiamente documentato e quanto osservato è perfettamente plausibile che sia dovuto all'effetto dell'attività enzimatica durante le prime ore di disidratazione.

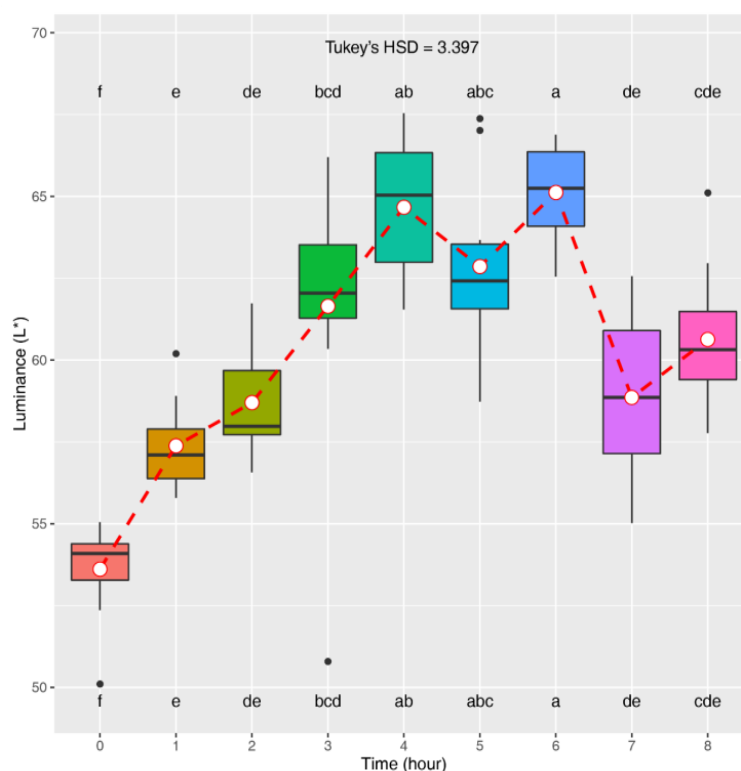


Figura 18 Variazione della coordinata L* durante le 8 ore di disidratazione sui campioni di controllo.

CIELab – *h* (angolo di colore)

Nei campioni pretrattati, la coordinata *h* tende a decrescere quasi linearmente durante tutta la disidratazione (Fig.19). Tuttavia, l'analisi dell'ANOVA mostra un decremento significativo a partire dalla 3° ora di processo, per poi raggiungere una colorazione stabile dalla 6° ora in poi di disidratazione.

È quindi durante le fasi di maggiore perdita di acqua da parte del tessuto che è stato possibile osservare i cambiamenti di colore più elevati. Il risultato di ciò è stato evidente anche ad occhio nudo, in quanto la colorazione arancio delle carote appena tagliate ha subito un viraggio verso una tinta più violacea nell'arco delle 8 ore. Nessun fenomeno di sbiancamento delle carote è stato osservato, in quanto nel campione pretrattato l'attività enzimatica risultava ridotta al minimo, se non inesistente.

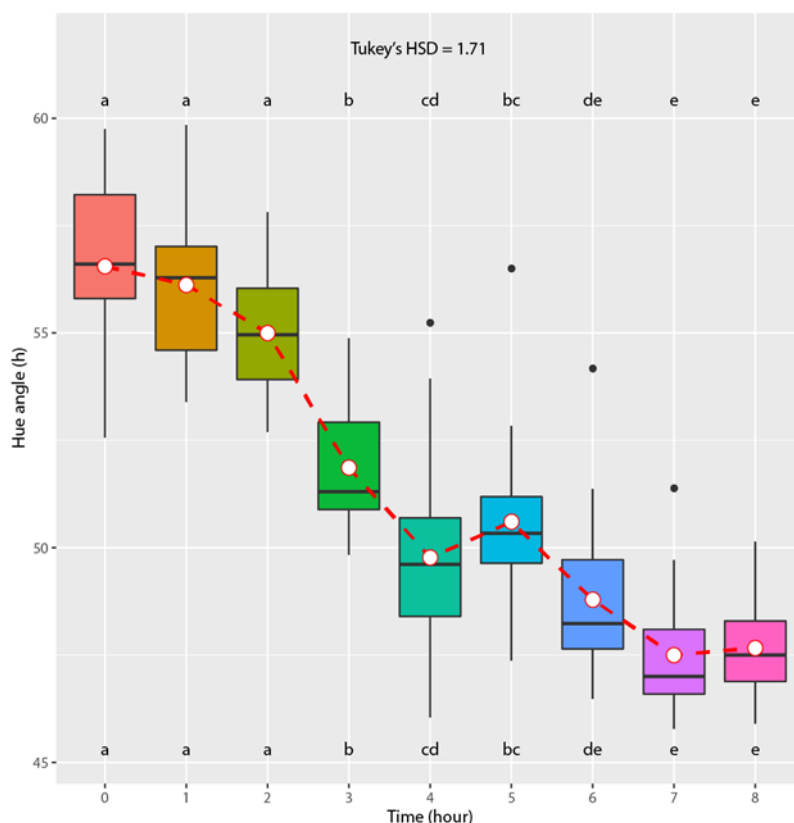


Figura 19. Variazione della coordinata h durante le 8 ore di disidratazione sui campioni pretrattati.

7.1.5 Contenuto dei carotenoidi

A seguito della perdita di acqua nei campioni, sia il trattamento di controllo che il blanching mostrano un tendenziale aumento nella concentrazione dei carotenoidi durante la disidratazione. L'andamento è pressoché simile tra i due trattamenti durante le prime 7 ore di processo. Alla ottava ora di disidratazione la tendenza si inverte mostrando un brusco calo nel contenuto in carotenoidi nel campione di controllo (Fig. 20), portando ad ipotizzare ad una perdita in carotenoidi totali dovuta alla degradazione indotta dal processo termico. Nelle carote trattate con blanching il contenuto in carotenoidi aumenta a seguito della perdita di acqua, raggiungendo una concentrazione stabile a partire dalla 6° ora di disidratazione. L'ANOVA dei dati ottenuti mostra

un significativo aumento nella concentrazione dei carotenoidi a partire dalla 3° ora di disidratazione per entrambe le tipologie di trattamento testate.

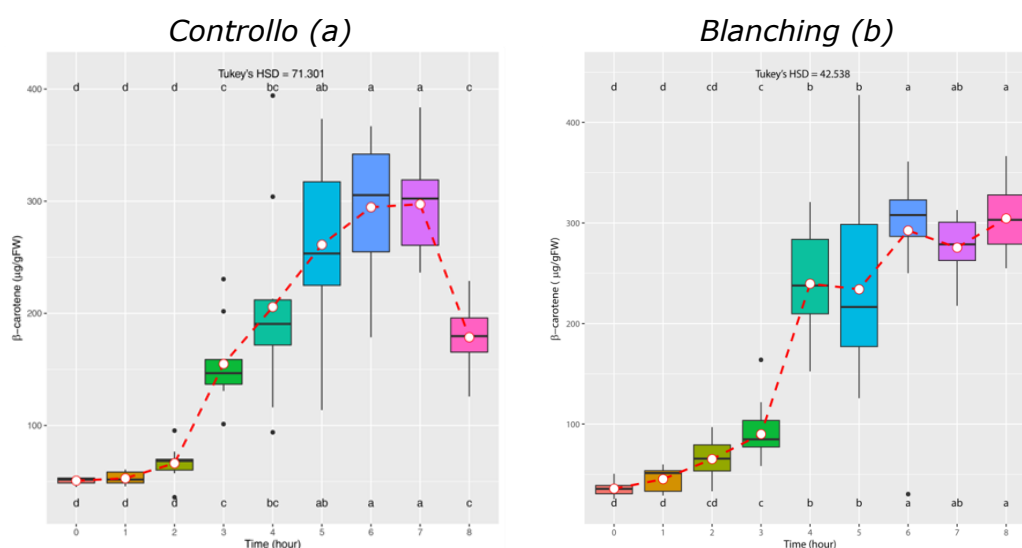


Figura 20 Variazione del contenuto di carotenoidi durante le 8 ore di disidratazione nel controllo (20a) e nei campioni pretrattati con blanching (20b).

7.1.6 Sviluppo dei modelli di regressione

I valori di acqua libera, umidità, SSC, colore e carotenoidi sono stati correlati agli spettri NIR tramite algoritmo PLS, allo scopo di valutarne l'andamento durante il processo di disidratazione. L'algoritmo PLS è stato utilizzato per sviluppare modelli predittivi sia a partire da tutte le 601 lunghezze d'onda (modello PLS), sia utilizzando un numero ridotto di lunghezze d'onda (modello iPLS). L'accuratezza dei modelli è stata valutata tramite le metriche (1) RMSE, (2) BIAS e (3) R^2 .

Umidità

La predizione del contenuto di umidità nei campioni di controllo durante la disidratazione è risultata estremamente performante mediante spettroscopia NIR. I modelli PLS (Fig. 21) ed iPLS (Fig. 22) presentano ottime prestazioni predittive e sono caratterizzati da delle metriche molto simili tra loro (figura 23). Conseguentemente, il modello iPLS è da considerare il migliore tra i due, poiché basato su un numero ridotto di lunghezze d'onda e quindi più semplicemente

trasferibile su un processo on-line. Infatti, tale modello utilizza solo 5 lunghezze d'onda, pari a: 1100, 1396, 1558, 1726 e 1930 nm.

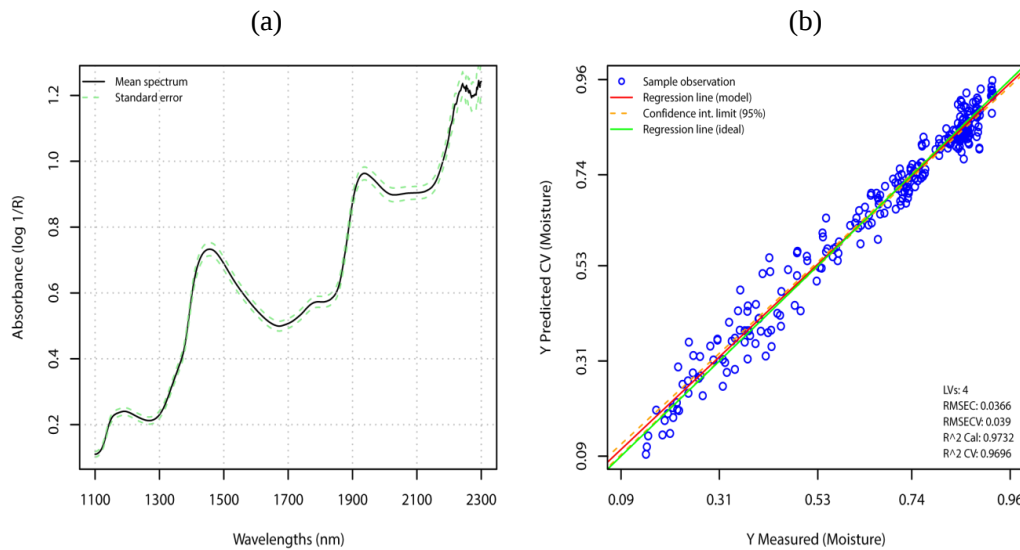


Figura 21 Modello PLS basato sulle 601 lunghezze d'onda della predizione sul contenuto di umidità ottenuto durante disidratazione sui campioni di controllo.

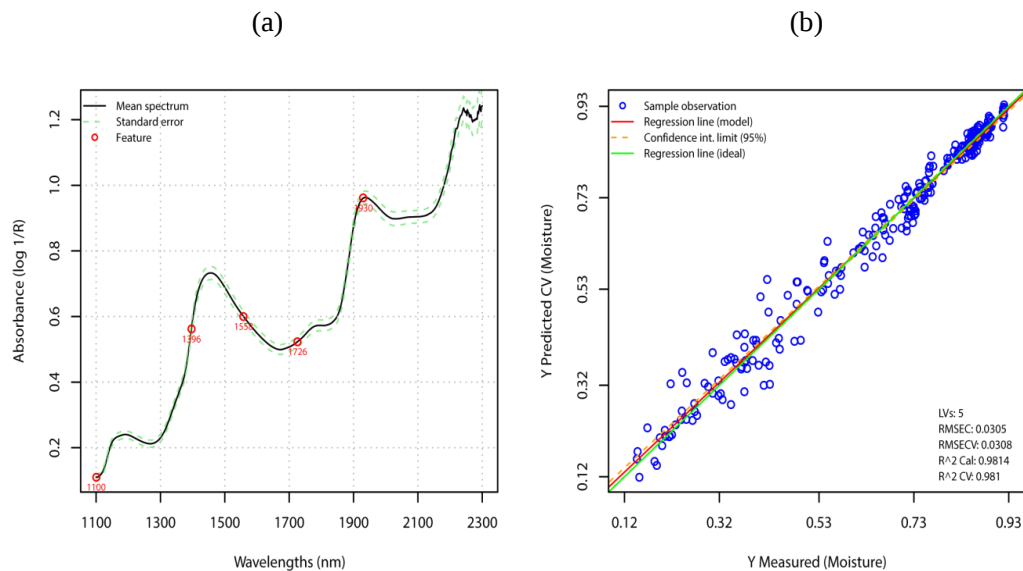


Figura 22 Modello iPLS basato sulle 5 lunghezze d'onda della predizione sul contenuto di umidità ottenuto durante disidratazione sui campioni di controllo.

Model	Features	LVs	RMSE		Bias		R ²	
			C	CV	C	CV	C	CV
PLS	all	4	0.0366	0.039	5.55*10 ⁻¹⁷	0.0004	0.9732	0.9696
iPLS	5	5	0.0305	0.0308	-1.00*10 ⁻¹⁶	2.59*10 ⁻⁵	0.9814	0.9810

Figura 23 La tabella riporta per i modelli PLS e iPLS il numero di lunghezze d'onda selezionato (Features); il numero di variabili latenti utilizzate (LVs) ed i valori delle metriche in calibrazione (C) e cross validazione (CV) dei campioni di controllo.

Nell'ambito dello sviluppo di modelli su rondelle di carota soggette a trattamento in acqua calda a 95°C per 1.5 min (blanching), lo sviluppo dei modelli predittivi ha restituito ottimi risultati, mostrando tuttavia delle differenze nel numero di lunghezze d'onda necessarie per lo sviluppo del modello iPLS. Nel dettaglio, il processo selettivo *stepwise-forward* delle lunghezze d'onda ha messo in evidenza sette lunghezze d'onda rilevanti per il modello predittivo, pari a: 1118 nm, 1388 nm, 1588 nm, 1712 nm, 1870 nm, 1894 nm e 2216 nm. Le prime 6 lunghezze d'onda corrispondono a bande dello spettro molto vicine a quelle osservate per il campione di controllo. Ciò permette di speculare che la messa a punto di un modello predittivo del contenuto di umidità che sia unico tra controllo e blanching sia effettivamente fattibile.

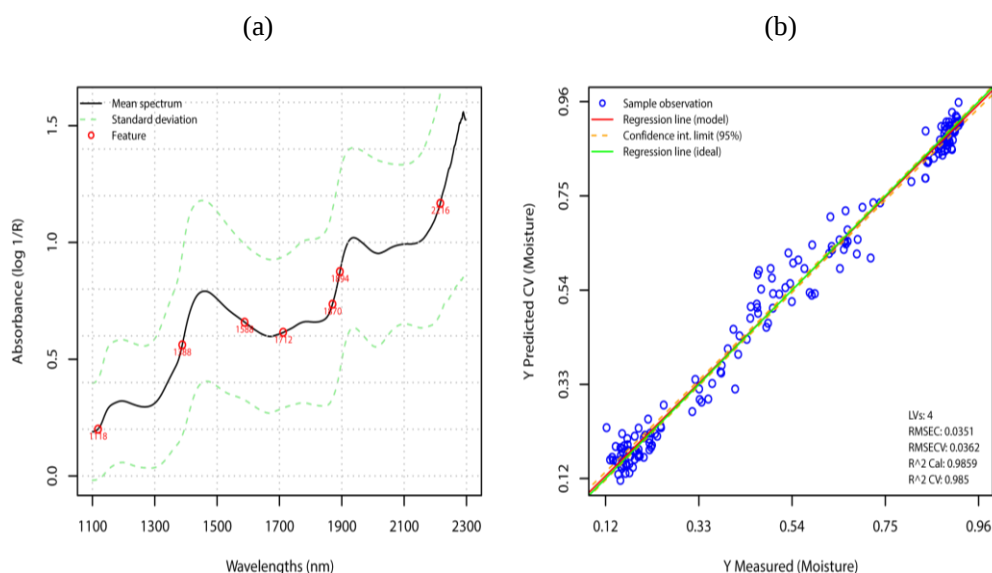


Figura 24 Modello PLS basato sulle 601 lunghezze d'onda della predizione sul contenuto di umidità ottenuto durante disidratazione sui campioni pretrattati con blanching.

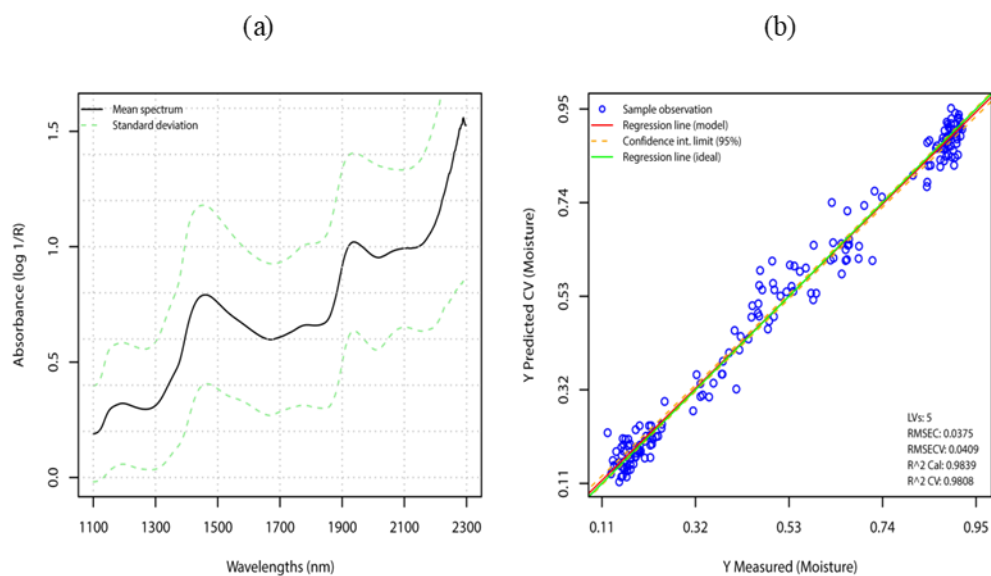


Figura 25 Modello iPLS basato sulle 7 lunghezze d'onda della predizione sul contenuto di umidità ottenuto durante disidratazione sui campioni pretrattati con blanching.

Model	Features	LVs	RMSE		Bias		R ²	
			C	CV	C	CV	C	CV
PLS	all	5	0.0375	0.0409	$1.67 \cdot 10^{-16}$	0.0004	0.9839	0.9808
iPLS	7	4	0.0351	0.0362	$-4.34 \cdot 10^{-17}$	0.0002	0.9859	0.985

Figura 26 La tabella riporta per i modelli PLS e iPLS il numero di lunghezze d'onda selezionato (Features); il numero di variabili latenti utilizzate (LVs) ed i valori delle metriche in calibrazione (C) e cross validazione (CV) dei campioni pretrattati.

Acqua libera (a_w)

Le figure 27 e 28 mostrano gli spettri medi e le rette di regressione dei valori di acqua libera predetti sul controllo attraverso l'impiego dei migliori modelli PLS (Fig.27) ed iPLS (Fig. 28) selezionati. I valori di BIAS, come anche le altre metriche dei modelli, sono riportati in tabella (Figura 29). Entrambi i modelli hanno un BIAS molto basso e quindi lo stimatore lineare è molto vicino alla retta ideale. Dallo studio della tabella è possibile osservare che il modello PLS è stato computato con 4 LVs, mentre il modello iPLS è stato ottenuto con 3 LVs. Il modello iPLS è stato messo a punto a partire da 6 lunghezze d'onda. Entrambi i modelli mostrano valori di RMSE in calibrazione e cross-validazione circa pari a 0.03 e degli ottimi R^2 (> 0.90). Nell'ambito di ogni modello, il piccolo scostamento osservato tra i valori delle metriche in calibrazione e cross-validazione indica un'ottima qualità dei modelli e l'assenza di problemi di overfitting. In linea generale, entrambi i modelli erano contraddistinti da ottime performance. Tuttavia, il modello iPLS è preferibile al modello PLS in quanto ottenuto con un numero inferiore di variabili di partenza (o lunghezze d'onda).

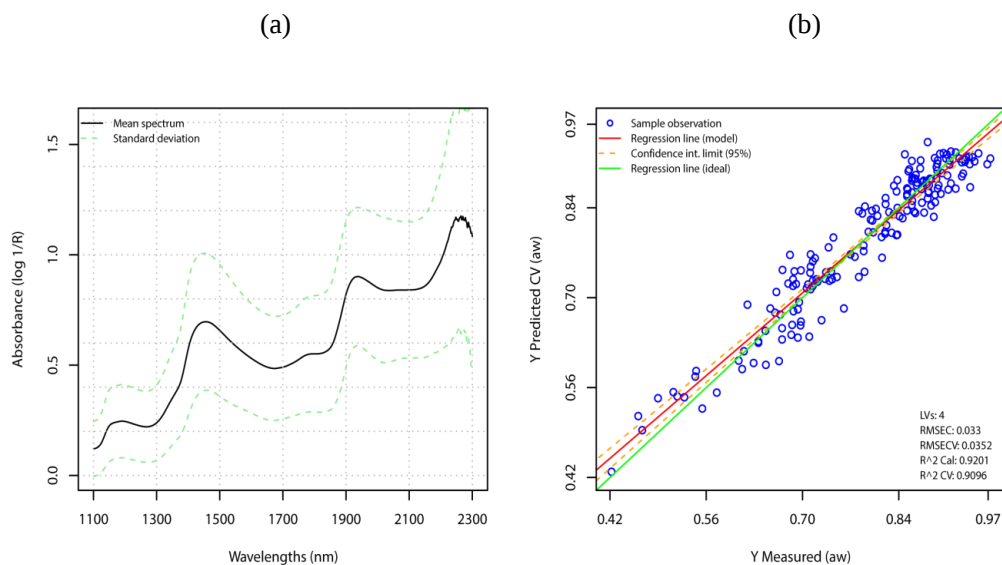


Figura 5 Modello PLS basato sulle 601 lunghezze d'onda della predizione sul contenuto di acqua libera ottenuto durante disidratazione sui campioni di controllo.

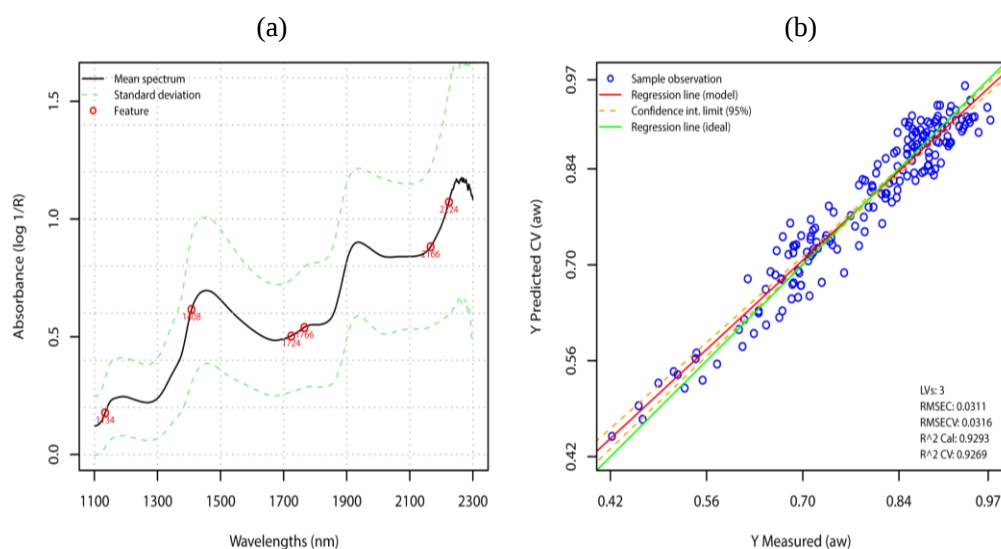


Figura28 Modello iPLS basato sulle 6 lunghezze d'onda della predizione sul contenuto di acqua libera ottenuto durante disidratazione sui campioni di controllo.

Model	Features	LVs	RMSE		Bias		R²	
			C	CV	C	CV	C	CV
PLS	all	4	0.033	0.0352	$4.44 \cdot 10^{-16}$	0.0005	0.9201	0.9096
iPLS	6	3	0.0311	0.0316	$3.02 \cdot 10^{-16}$	$3.80 \cdot 10^{-5}$	0.9293	0.9269

Figura 29 La tabella riporta per i modelli PLS e iPLS il numero di lunghezze d'onda selezionato (Features); il numero di variabili latenti utilizzate (LVs) ed i valori delle metriche in calibrazione (C) e cross validazione (CV) dei campioni di controllo.

Osservando i grafici relativi ai modelli inerenti ai valori di acqua libera misurati sui campioni pretrattati con blanching in acqua calda (Fig. 27 e 28), si nota che sia nel modello PLS (Fig. 28b) che iPLS (Fig. 28b) la linea di regressione si discosta di poco dalla linea di regressione ideale. I valori riportati in tabella (Figura 29) mostrano delle buone metriche per entrambi i modelli. Il modello PLS basato su tutte le lunghezze d'onda è stato elaborato da 5 LVs. Il modello iPLS invece è stato ottenuto a partire da 3 lunghezze d'onda (figura 30a) ed è stato elaborato da 3 LVs. Esso mostra valori di RMSE, BIAS e R^2 del tutto simili, se non identici, al modello PLS. L'alto valore del R^2 dimostra comunque l'efficienza di entrambi i modelli. Diversamente dal modello iPLS per la determinazione dell'attività dell'acqua nel controllo, il modello iPLS per i campioni

trattati con blanching richiede un numero di lunghezze d'onda inferiore e fornisce dei risultati con delle metriche nettamente migliori.

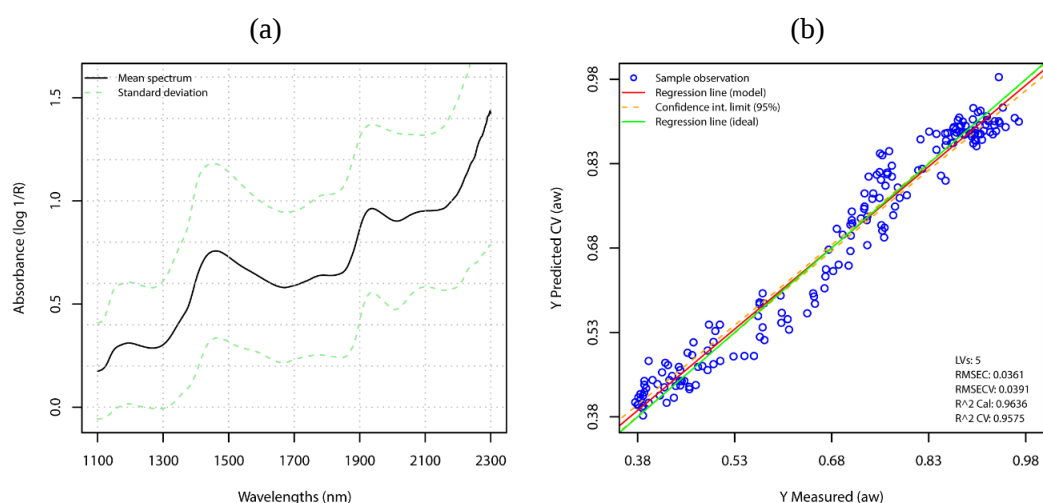


Figura 30 Modello PLS basato sulle 601 lunghezze d'onda della predizione sul contenuto di acqua libera ottenuto durante disidratazione sui campioni pretrattati con blanching.

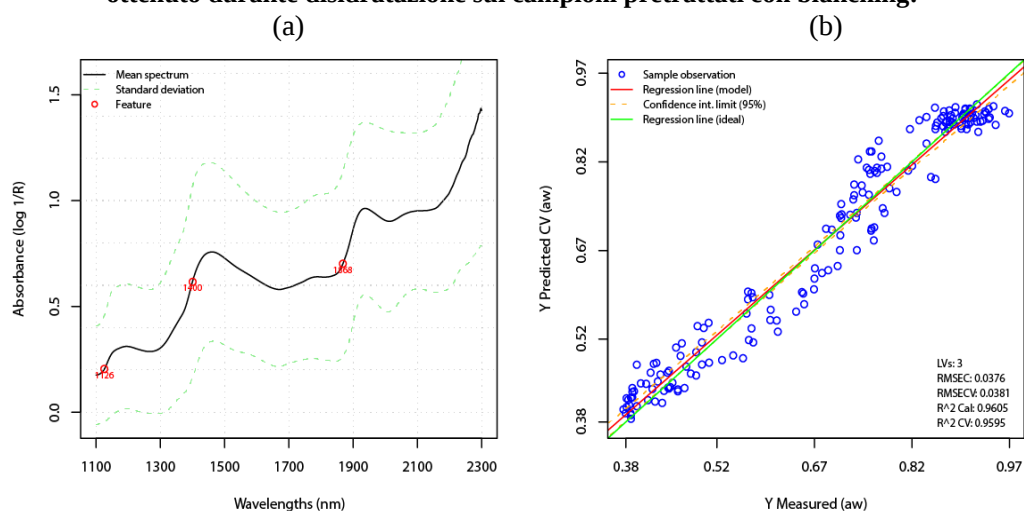


Figura 31 Modello iPLS basato sulle 3 lunghezze d'onda della predizione sul contenuto di acqua libera ottenuto durante disidratazione sui campioni pretrattati con blanching.

Model	Features	LVs	RMSE		Bias		R ²	
			C	CV	C	CV	C	CV
PLS	all	5	0.0361	0.0391	$4.44 \cdot 10^{-16}$	0.0003	0.9636	0.9575
iPLS	3	3	0.0376	0.0381	$3.92 \cdot 10^{-17}$	$2.80 \cdot 10^{-5}$	0.9605	0.9595

Figura 32 riporta i modelli PLS e iPLS il numero di lunghezze d'onda selezionato (Features), il numero di variabili latenti utilizzato (LVs) ed i valori delle metriche in calibrazione © e cross validazione (CV) dei campioni pretrattati.

Solidi Solubili Totali

I modelli messi a punto per la quantificazione del contenuto in solidi solubili totali su carota non pretrattata mostrano delle ottime metriche sia per ciò che concerne l'utilizzo degli spettri completi, che per quanto riguarda l'impiego di alcune lunghezze d'onda tra le 601 a disposizione. I valori di BIAS, RMSE e R² riportati in tabella 9 sono infatti congeniali alla quantificazione dei solidi solubili totali durante la disidratazione. Due delle 3 lunghezze d'onda selezionate nel modello iPLS (1336 e 1890 nm) risultano essere molto vicine a quelle adoperate per l'iPLS su controllo (1310 e 1878 nm), mostrando quindi delle similitudini tra modelli.

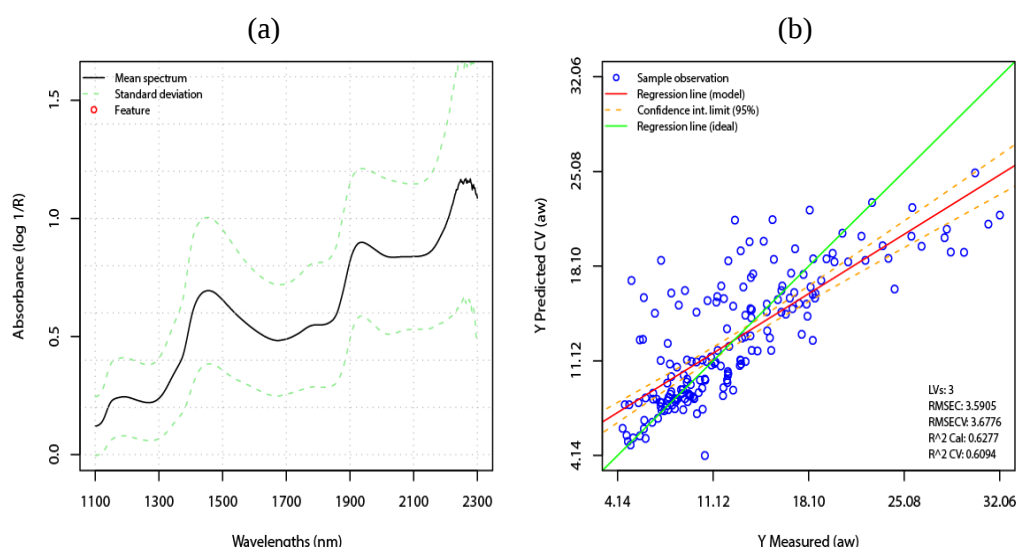


Figura 33 Modello PLS basato sulle 601 lunghezze d'onda della predizione sul contenuto di solidi solubili ottenuto durante disidratazione sui campioni di controllo.

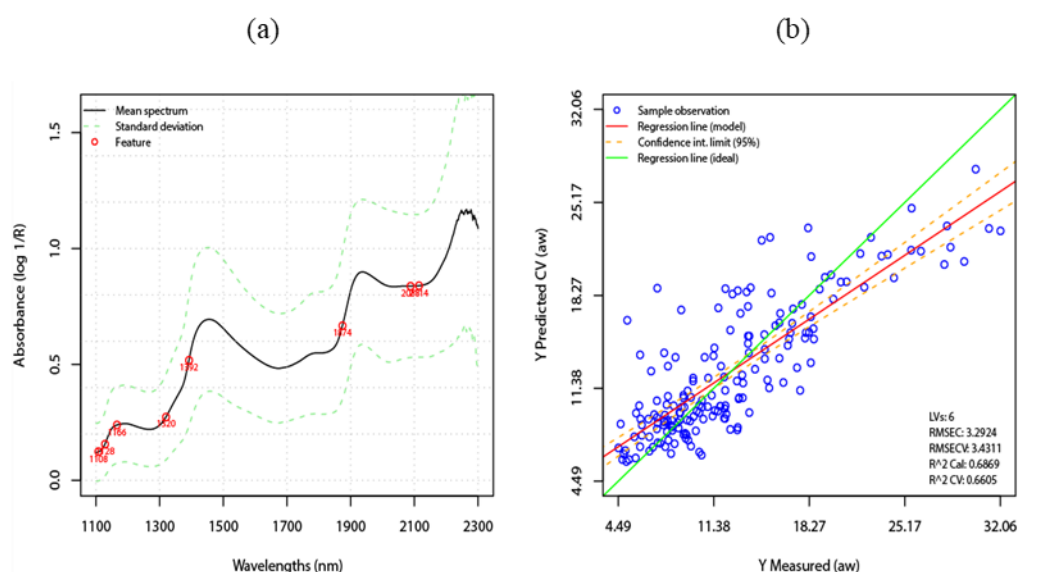


Figura 34 Modello iPLS basato sulle 8 lunghezze d'onda della predizione sul contenuto di solidi solubili ottenuto durante disidratazione sui campioni di controllo.

Model	Features	LVs	RMSE		Bias		R ²	
			C	CV	C	CV	C	CV
PLS	all	3	3.5905	3.6776	0.00	0.02	0.6277	0.6094
iPLS	8	6	3.2924	3.4311	$1.22 \cdot 10^{-13}$	-0.034	0.6869	0.6605

Figura 35 La tabella riporta per i modelli PLS e iPLS il numero di lunghezze d'onda selezionato (Features); il numero di variabili latenti utilizzate (LVs) ed i valori delle metriche in calibrazione (C) e cross validazione (CV) dei campioni di controllo.

Osservando i grafici relativi ai modelli inerenti la predizione nel contenuto di solidi solubili totali durante la disidratazione dei campioni pretrattati con blanching (Fig.33e 34), è possibile notare che anche in questo caso le rette di regressione dei modelli PLS (Fig.33) ed iPLS (Fig.34) si discostano di più rispetto ai grafici osservati precedentemente dalla retta ideale.

I valori delle metriche riportato che l'errore di predizione è compreso tra circa 3.59 e 3.68 °Brix ed il coefficiente di determinazione (R^2) è circa pari a 0.60-0.62. Tra i due modelli, anche in questo caso, per la predizione del contenuto in solidi solubili, il modello iPLS è preferibile poiché ottenuto da quattro lunghezze d'onda.

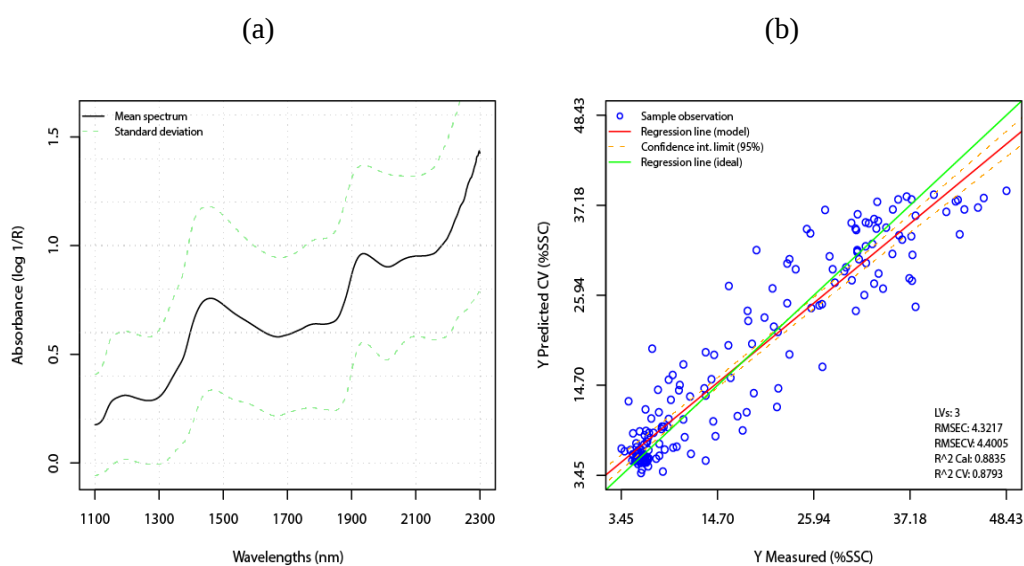


Figura 36 Modello iPLS basato sulle 601 lunghezze d'onda della predizione sul contenuto di solidi solubili ottenuto durante disidratazione sui campioni pretrattati con blanching.

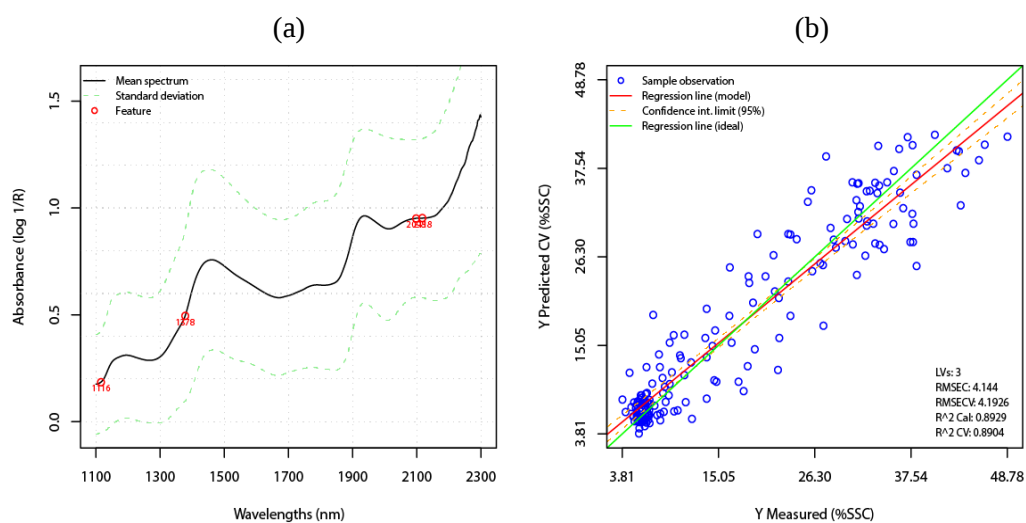


Figura 37 Modello iPLS basato sulle 4 lunghezze d'onda della predizione sul contenuto di solidi solubili ottenuto durante disidratazione sui campioni pretrattati con blanching.

Model	Features	LVs	RMSE		Bias		R ²	
			C	CV	C	CV	C	CV
PLS	all	3	4.3217	4.4005	0.00	0.01	0.8835	0.8793
iPLS	4	3	4.144	4.1926	-2.82*10 ⁻¹⁴	0.009	0.8929	0.8904

Figura 38 La tabella riporta per i modelli PLS e iPLS il numero di lunghezze d'onda selezionato (Features); il numero di variabili latenti utilizzate (LVs) ed i valori delle metriche in calibrazione (C) e cross validazione (CV) dei campioni pretrattati.

Analisi colorimetrica

Sebbene nel prodotto siano stati osservati dei trend significativi nei cambiamenti di angolo di colore e croma, soltanto da quest'ultimo è stato possibile ottenere dei modelli di regressione effettivamente validi. Tutto ciò tenendo ben presente che la spettroscopia NIR è meno performante della Vis nel predire cambiamenti di colore, in quanto la misurazione colorimetrica operata mediante NIR può essere solo indiretta. Relativamente al controllo, le figure 39 e 40 mostrano gli spettri completi su cui sono stati elaborati i modelli, le rette di regressione dei modelli stessi e le lunghezze d'onda selezionate con l'algoritmo iPLS. In tutti e due i casi la linea di regressione si discosta abbastanza dalla condizione ideale. Ciò dimostra una performance meno efficiente dei modelli in questione, rispetto a quelli elaborati per i valori di acqua libera, solidi solubili totali ed umidità, precedentemente descritti. Anche in questo caso il modello iPLS mostra delle performance migliori rispetto a quello ottenuto a partire dagli spettri completi, utilizzando 8 lunghezze d'onda.

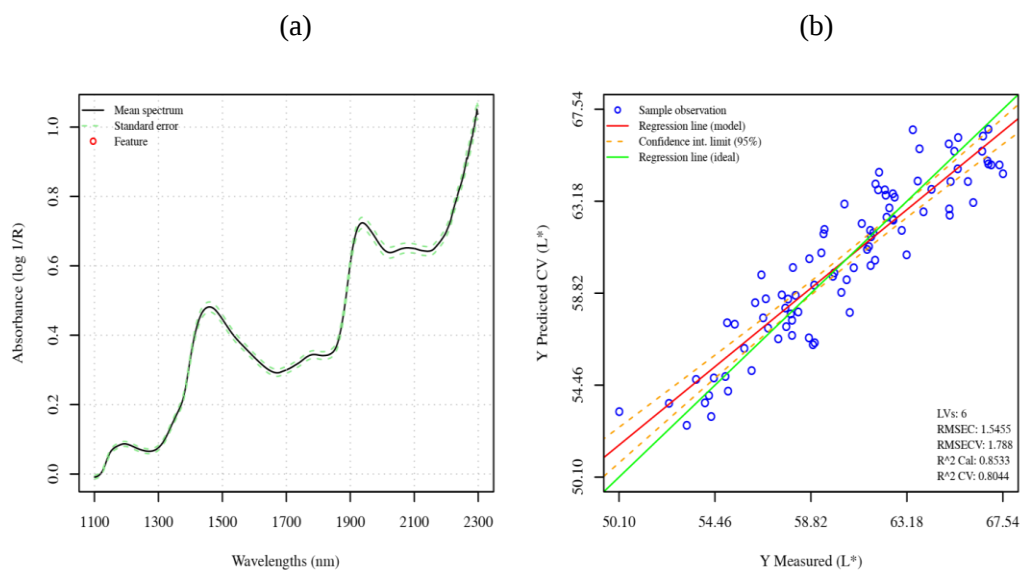


Figura 39 Modello PLS basato sulle 601 lunghezze d'onda della predizione sui cambiamenti di colore ottenuti durante disidratazione sui campioni di controllo.

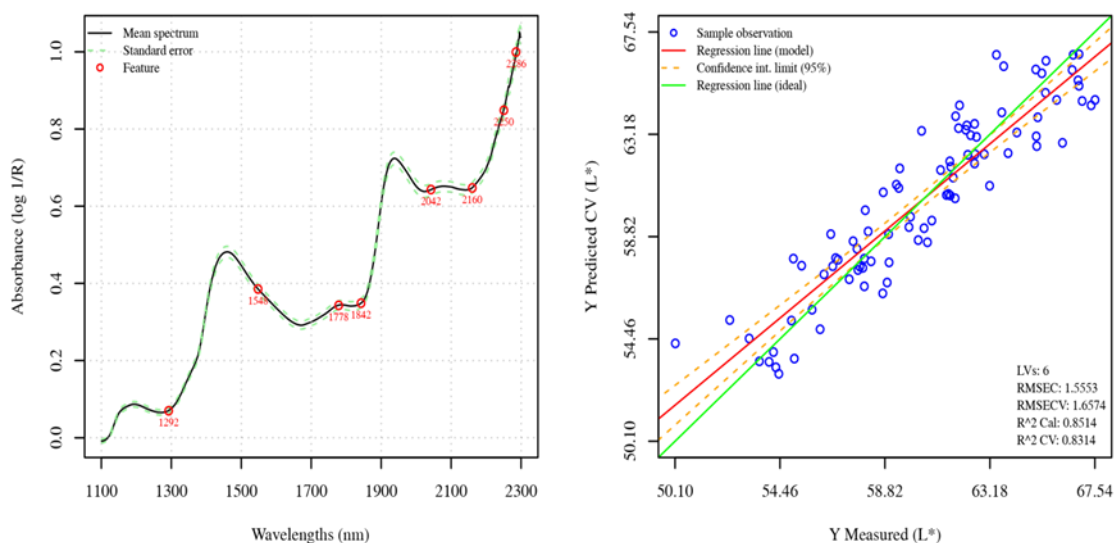


Figura40 Modello iPLS basato sulle 8 lunghezze d'onda della predizione sui cambiamenti di colore ottenuti durante disidratazione sui campioni di controllo.

Model	Features	LVs	RMSE		Bias		R ²	
			C	CV	C	CV	C	CV
PLS	all	6	1.5455	1.788	0.00	0.006	0.8533	0.8044
iPLS	8	6	1.5553	1.6574	$7.32 \cdot 10^{-15}$	0.011	0.8514	0.8314

Figura 41 La tabella riporta per i modelli PLS e iPLS il numero di lunghezze d'onda selezionato (Features); il numero di variabili latenti utilizzate (LVs) ed i valori delle metriche in calibrazione (C) e cross validazione (CV) dei campioni di controllo.

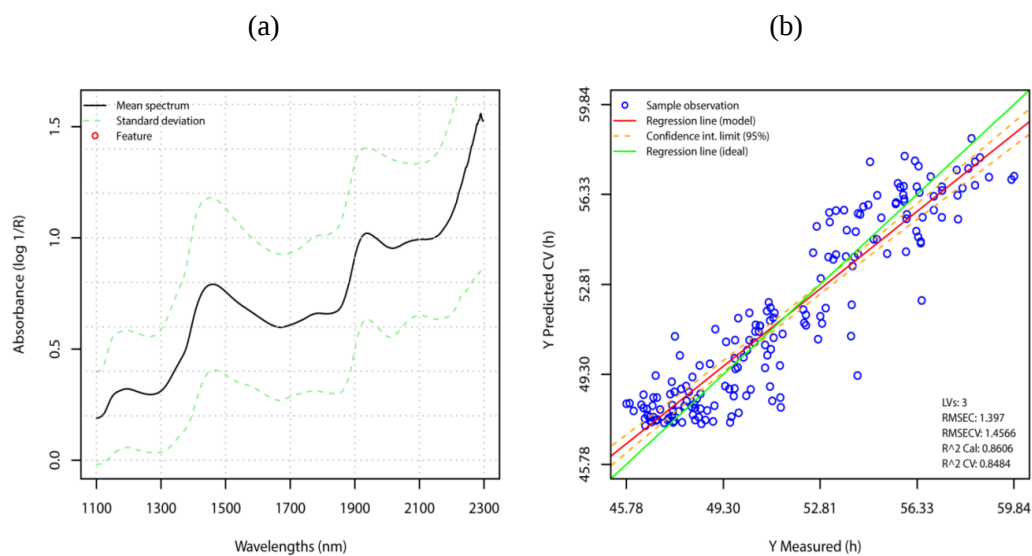


Figura 42 Modello PLS basato sulle 601 lunghezze d'onda della predizione sui cambiamenti di colore ottenuti durante disidratazione sui campioni pretrattati con blanching.

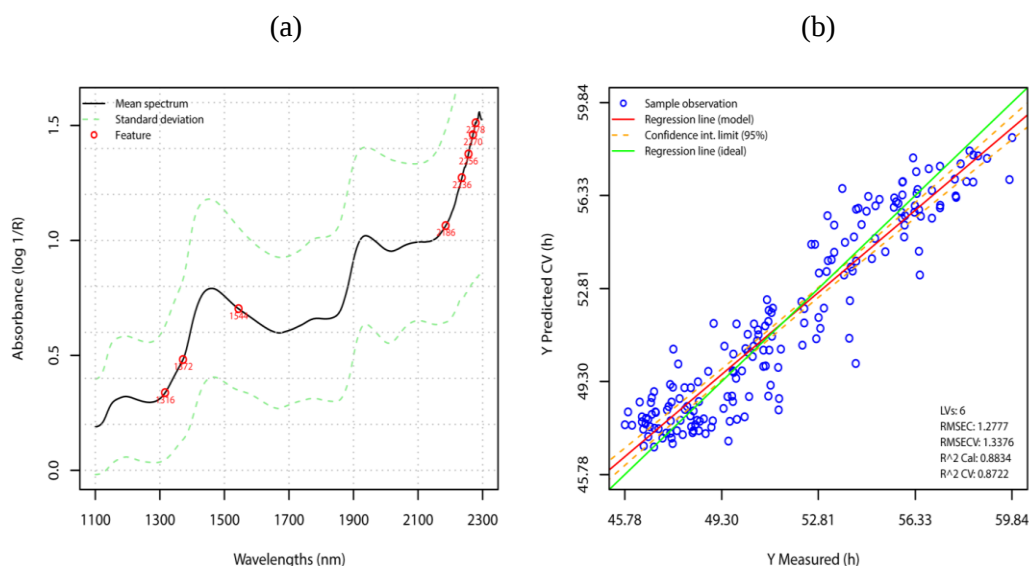


Figura 43 Modello iPLS basato sulle 8 lunghezze d’onda della predizione sui cambiamenti di colore ottenuti durante disidratazione sui campioni pretrattati con blanching.

Model	Features	LVs	RMSE		Bias		R ²	
			C	CV	C	CV	C	CV
PLS	all	3	1.397	1.4566	-7.11*10 ⁻¹⁵	0.01	0.8606	0.8484
iPLS	8	6	1.2777	1.3376	-1.84*10 ⁻¹⁴	0.005	0.8834	0.8722

Figura 44 La tabella riporta per i modelli PLS e iPLS il numero di lunghezze d’onda selezionato (Features); il numero di variabili latenti utilizzate (LVs) ed i valori delle metriche in calibrazione (C) e cross validazione (CV) dei campioni pretrattati.

Contenuto di carotenoidi

Nei grafici seguenti (Fig. 45 e 46) vengono mostrati i modelli inerenti la predizione nel contenuto di carotenoidi totali durante la disidratazione dei campioni di controllo. In entrambi i casi il coefficiente R^2 è circa 0.92 e vi è un lieve scostamento tra la retta di regressione ideale e quella elaborata dal modello. Il modello iPLS è risultato essere una ottima alternativa al modello PLS anche per la predizione del contenuto di carotenoidi totali sul controllo, riducendo il numero di lunghezze d'onda da 601 a 4.

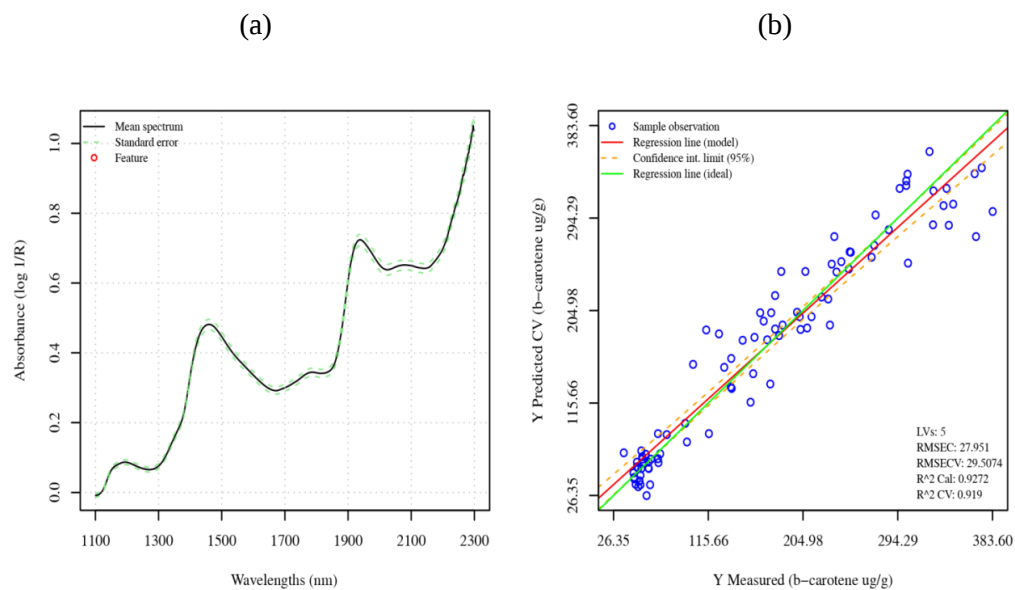


Figura 45 Modello PLS basato sulle 601 lunghezze d'onda della predizione sul contenuto di carotenoidi ottenuto durante disidratazione sui campioni di controllo.

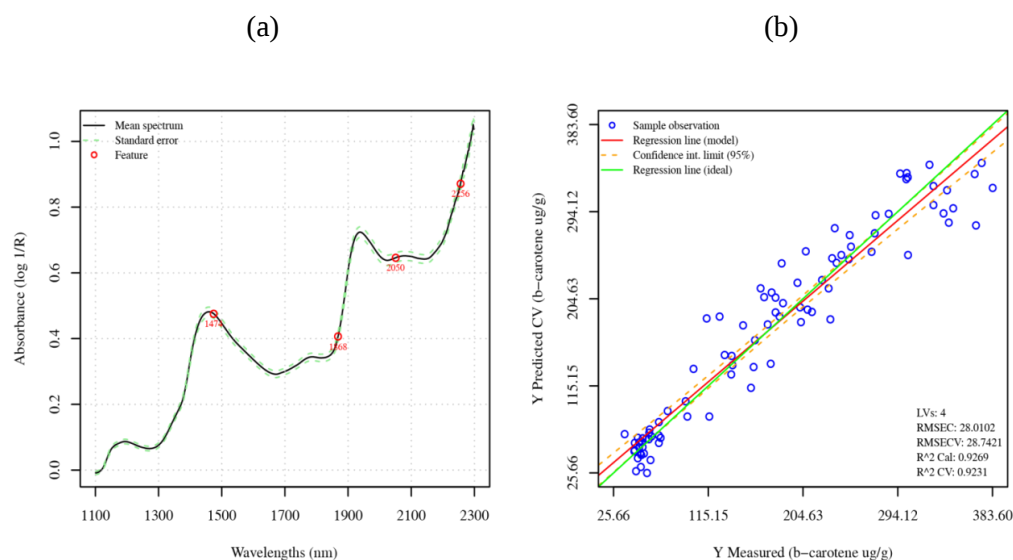


Figura 46 Modello iPLS basato sulle 4 lunghezze d'onda della predizione sul contenuto di carotenoidi ottenuto durante disidratazione sui campioni di controllo.

Model	Features	LVs	RMSE		Bias		R ²	
			C	CV	C	CV	C	CV
PLS	all	5	27.951	29.5074	$2.84 \cdot 10^{-14}$	0.03	0.9272	0.9190
iPLS	4	4	28.0102	28.7421	$-4.18 \cdot 10^{-14}$	0.04	0.9269	0.9231

Figura 47 La tabella riporta per i modelli PLS e iPLS il numero di lunghezze d'onda selezionato (Features); il numero di variabili latenti utilizzate (LVs) ed i valori delle metriche in calibrazione (C) e cross validazione (CV) dei campioni di controllo.

Le figure 45 e 46 mostrano i modelli di predizioni PLS e iPLS per la predizione dei carotenoidi totali su campioni pretrattati con blanching. Le metriche che esprimono le prestazioni dei modelli sono risultate essere molto simili per entrambi (PLS e iPLS). Ancora una volta, il modello iPLS non mostra delle performance nettamente migliori rispetto al modello PLS, ma permette di predire un analita eguagliando le prestazioni di modelli ben più complessi in quanto basati su spettri NIR completi e quindi molto su un numero di variabili dipendenti molto elevato.

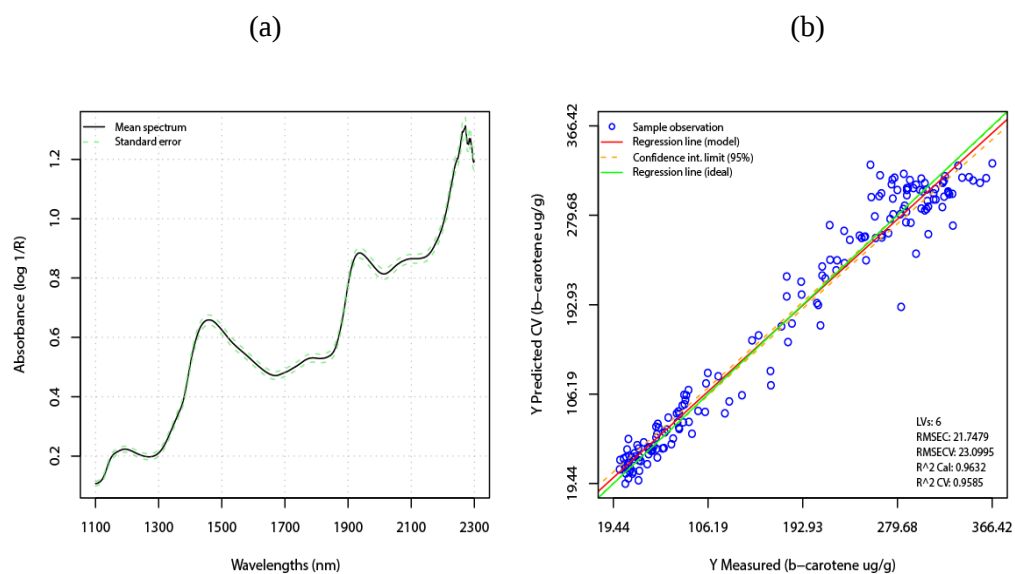


Figura 48 Modello PLS basato sulle 601 lunghezze d'onda della predizione sul contenuto di carotenoidi ottenuto durante disidratazione sui campioni pretrattati con blanching.

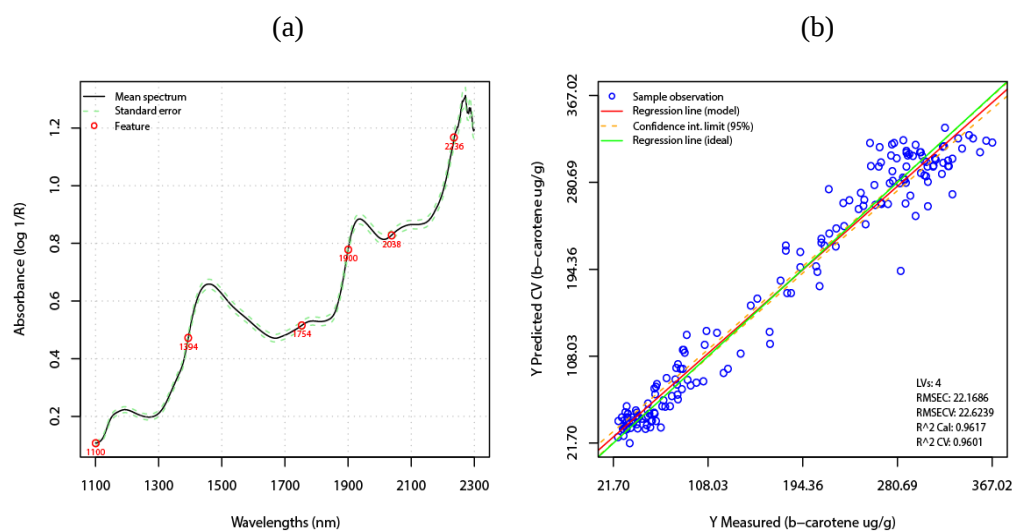


Figura 49 Modello iPLS basato sulle 6 lunghezze d'onda della predizione sul contenuto di carotenoidi ottenuto durante disidratazione sui campioni pretrattati con blanching.

Model	Features	LVs	RMSE		Bias		R ²	
			C	CV	C	CV	C	CV
PLS	all	6	21.7479	23.0995	-2.84*10 ⁻¹⁴	-0.34	0.9632	0.9585
iPLS	6	4	22.1686	22.6239	0.20	0.24	0.9617	0.9601

Figura 50 La tabella riporta per i modelli PLS e iPLS il numero di lunghezze d'onda selezionato (Features); il numero di variabili latenti utilizzate (LVs) ed i valori delle metriche in calibrazione (C) e cross validazione (CV) dei campioni pretrattati.

Modelli di classificazione

I dati delle misurazioni relative ad acqua libera, solidi solubili totali, umidità, colore e contenuto di carotenoidi totali sono stati impiegati per eseguire una cluster analisi mediante algoritmo di classificazione K-means, al fine di identificare le fasi di disidratazione da predire mediante algoritmo PLS-DA. Tale suddivisione in fasi ha prodotto dei risultati leggermente diversi tra controllo e pretrattamento con blanching in acqua calda, sebbene in entrambi i casi siano state individuate 3 fasi di disidratazione.

➤ CONTROLLO

- Fase 1, campioni soggetti a 0, 1 e 2 ore di disidratazione;
- Fase 2, campioni soggetti da 3 a 5 ore di disidratazione;
- Fase 3, campioni soggetti a 6, 7 e 8 ore di disidratazione.

➤ BLANCHING IN ACQUA CALDA

- Fase 1, campioni soggetti a 0, 1 e 2 ore di disidratazione;
- Fase 2, campioni soggetti da 3 a 5 ore di disidratazione;
- Fase 3, campioni soggetti a 6, 7 e 8 ore di disidratazione.

Le anzidette fasi di disidratazione sono state correlate agli spettri NIR mediante algoritmo PLS-DA. Lo scopo è stato quello di ottenere dei modelli discriminanti in grado di predire la classe di appartenenza e quindi la fase di disidratazione di ciascun campione. In generale, i modelli sono risultati caratterizzati da una buona accuratezza, circa pari e/o superiore al 80%. Il risultato di tale metrica è essenzialmente dipeso dalla tipologia di dataset (controllo o blanching), dalla combinazione di pretrattamenti agli spettri adoperata e dal numero di variabili utilizzate nel modello.

Relativamente al miglior pretrattamento spettrale, in tutti i casi i migliori risultati sono stati ottenuti dalla combinazione tra filtro Savitzky-Golay con una finestra di smoothing a 9 punti, Standard Normal Variate e Mean Centering.

Per i dataset costituiti dagli spettri completi, l'algoritmo PLSDA è stato impiegato per elaborare modelli predittivi a partire dai valori di assorbanza di 601 lunghezze d'onda. Per il modello ottenuto dal dataset di controllo (PLSDA-C) sono state selezionate le prime 3 variabili latenti (LV) (88,26% della varianza totale) e l'accuratezza è risultata pari all' 81,08%; mentre per il trattamento al blanching (PLSDA-B) il miglior risultato è stato conseguito con 4 variabili latenti (94,62% della varianza totale) per una accuratezza pari al 92.38%.

PLSDA-C	FPR	FNR	SEN	SEL	ACC	ACC.TOT
0-2h	0.93%	33.83%	99.07%	66.17%	82.62%	81.08%
3-5h	29.87%	15.93%	70.13%	84.07%	77.10%	
6-8h	7.05%	25.93%	92.95%	74.07%	83.51%	

iPLSDA-C	FPR	FNR	SEN	SEL	ACC	ACC.TOT
0-2h	1.30%	21.19%	98.70%	78.81%	88.76%	86.74%
3-5h	17.63%	17.41%	82.37%	82.59%	82.48%	
6-8h	7.61%	14.44%	92.39%	85.56%	88.97%	

PLSDA-B	FPR	FNR	SEN	SEL	ACC	ACC.TOT
0-3h	2.85%	7.38%	97.15%	92.62%	94.88%	92.38%
4-5h	6.39%	17.67%	93.61%	82.33%	87.97%	
6-8h	6.02%	5.39%	93.98%	94.61%	94.30%	

iPLSDA-B	FPR	FNR	SEN	SEL	ACC	ACC.TOT
0-3h	2.68%	3.69%	97.32%	96.31%	96.81%	93.48%
4-5h	4.54%	17.00%	95.46%	83.00%	89.23%	
6-8h	5.85%	5.39%	94.15%	94.61%	94.38%	

Figura 51 Valori delle metriche utilizzate per definire la performance dei modelli PLSDA e iPLSDA nel caso del controllo (C) e nel caso delle carote pretrattate con blanching (B).

FPR: falso positivo; **FNR:** falso negativo; **SEN:** sensibilità; **SEL:** selettività; **ACC:** accuratezza; **ACC.TOT:** accuratezza totale

A partire dai migliori pretrattamenti ottenuti su spettro completo, i modelli iPLSDA più performanti sono stati ottenuti mediante l'impiego di massimo 6 lunghezze d'onda. Il miglior modello iPLSDA ottenuto per il controllo (iPLSDA-C) era caratterizzato da un'accuratezza del 86.74% (figura .52) e dall'impiego di 5 LV (100,00% della varianza totale). Diversamente, il

modello iPLSDA per il blanching (iPLSDA-B) ha mostrato un'accuratezza del 93.48% figura 52), era composto da 5 LV (99,92% della varianza totale).

Le matrici di confusione di ciascun modello sono riportate in figura 52.

PLSDA-C		Fase reale		
		0-2h	3-5h	6-8h
Fase predetta	0-2h	66.17%	1.85%	0.00%
	3-5h	33.83%	84.07%	25.93%
	6-8h	0.00%	14.07%	74.07%

PLSDA-B		Fase reale		
		0-2h	3-5h	6-8h
Fase predetta	0-2h	92.62%	5.67%	0.00%
	3-5h	7.38%	82.33%	5.39%
	6-8h	0.00%	12.00%	94.61%

iPLSDA-C		Fase reale		
		0-2h	3-5h	6-8h
Fase predetta	0-2h	78.81%	2.59%	0.00%
	3-5h	20.82%	82.59%	14.44%
	6-8h	0.37%	14.81%	85.56%

iPLSDA-B		Fase reale		
		0-2h	3-5h	6-8h
Fase predetta	0-2h	96.31%	5.33%	0.00%
	3-5h	3.69%	83.00%	5.39%
	6-8h	0.00%	11.67%	94.61%

Figura52 Matrici di confusione dei modelli predittivi PLSDA e iPLSDA per controllo (C) e blanching (B).

Gli score plot dei modelli ottenuti su controllo sono riportati in figura 53 e quelli ottenuti dal blanching in figura 54.

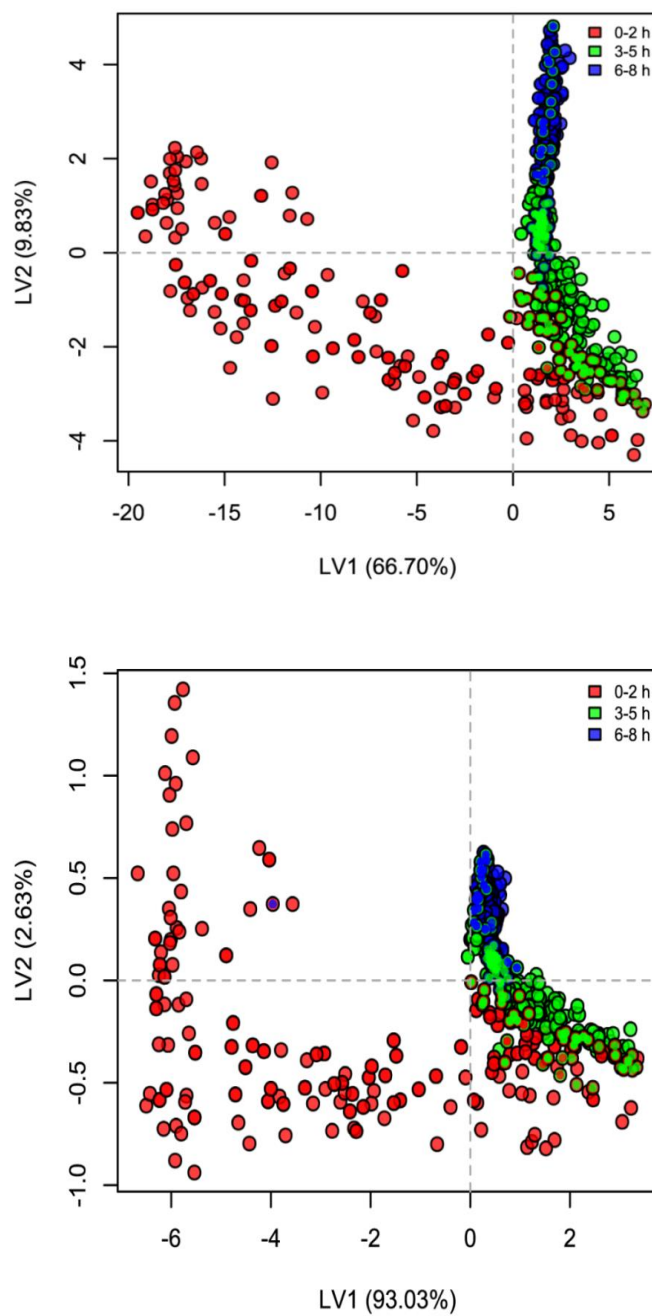


Figura53 Score plot raffiguranti la clusterizzazione dei campioni operata dai modelli PLSDA-C e iPLSDA-C ottenuti dai test su carota senza alcun pretrattamento.

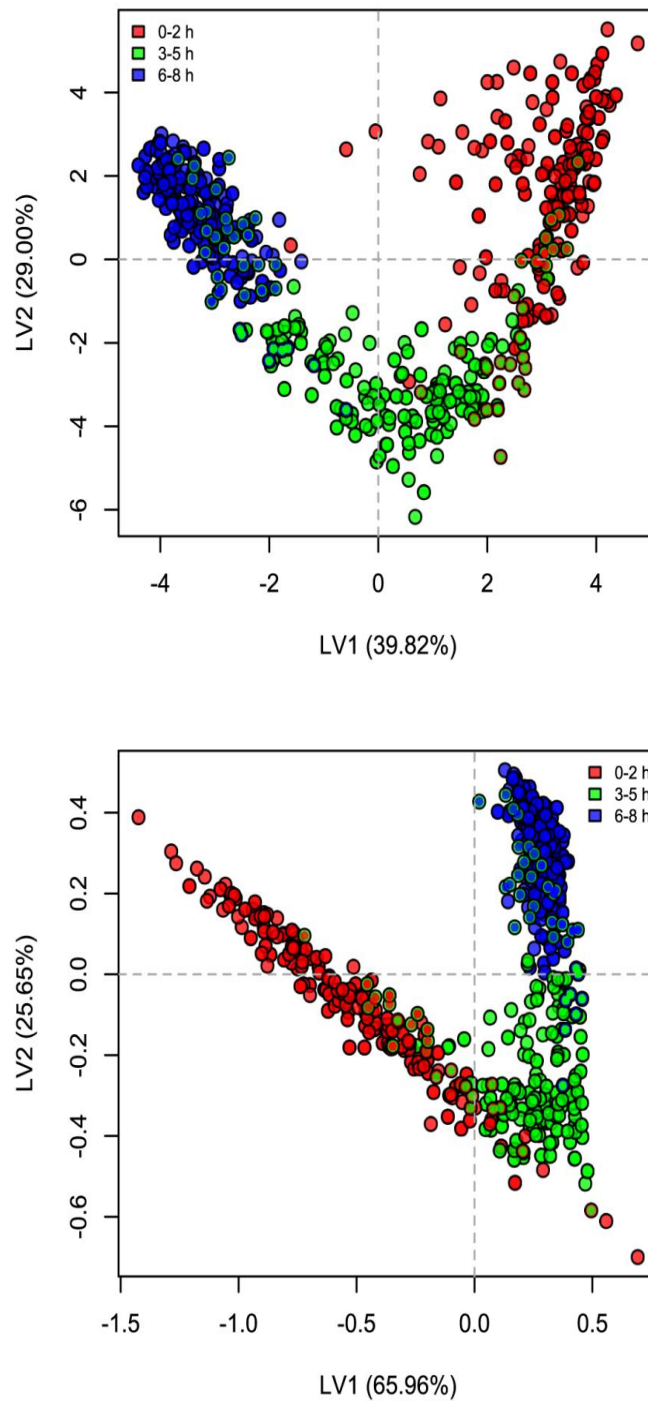


Figura 54 Score plot raffiguranti la clusterizzazione dei campioni operata dai modelli PLSDA-B e iPLSDA-B ottenuti dai test su carota pretrattata con blanching.

In generale, è possibile osservare che i modelli computati a partire dalla selezione delle variabili più significative hanno prodotto risultati migliori o del tutto simili a quelli ottenuti da tutte e 601 le lunghezze d'onda. Dall'analisi delle metriche e relativamente al controllo, il modello basato su

poche lunghezze d'onda è risultato essere addirittura più preciso di quello basato su 601 variabili, presentando un errore inferiore a quest'ultimo e pari al 15% circa. Ciò permette di speculare che lo spettro acquisito dal Brimrose 5030 in dotazione durante la sperimentazione fosse caratterizzato da regioni spettrali in grado di inficiare le performance dei modelli, se elaborati a partire dallo spettro completo. Sulla base di valutazioni del tutto empiriche, la regione spettrale compresa tra i 2200 ed i 2300 nm potrebbe essere esclusa dalle computazioni, migliorando la robustezza e le performance dei modelli, nonché aumentando l'efficienza di selezione delle lunghezze d'onda più utili al processo di classificazione. Tali considerazioni sono dettate dall'aver notato un evidente alto livello di rumore nella regione spettrale 2200-2300 nm, durante le acquisizioni. È opportuno precisare che, previa analisi delle performance di ciascun modello, il numero di LV è stato scelto in base all'andamento dei valori di RMSEC e RMSECV messo a confronto, con l'intento di escludere problematiche legate all'under-/overfitting.

7.2 Attività 2

7.2.1 Analisi del processo di disidratazione

La tabella (fig. 55) mostra i dati relativi al contenuto di umidità dei diversi pretrattamenti, prima e dopo il processo di disidratazione. I dati in questione sono stati analizzati mediante ANOVA ad una via, con l'intento di identificare eventuali differenze tra campioni a seguito del pretrattamento subito, nonché per verificare che i diversi trattamenti fossero disidratati ad un identico tenore di umidità finale. Il confronto a coppie tramite Tukey's test denota che i trattamenti di scottatura e l'impiego della impregnazione sottovuoto comportano un assorbimento di acqua da parte delle rondelle di carota e, pertanto, un significativo incremento dei valori di umidità. Questo non avviene per il pretrattamento di immersione in soluzione di pectine al 1% p/v, che mostrano un valore medio in umidità statisticamente non differente dal controllo. In aggiunta, i differenti pretrattamenti hanno impattato in maniera considerevole sulla durata del processo di disidratazione. Laddove è stata impiegata la scottatura delle rondelle, il tempo di disidratazione necessario per raggiungere un'umidità finale pari a $0.7 \text{ gH}_2\text{O gPS}^{-1}$ è risultato pari a 6 h, ben inferiore alle 7.5 h necessarie per le rondelle del campione di controllo. Diversamente, l'immersione dei campioni in soluzione di pectine al 1% p/v ha esteso la durata della disidratazione a 9.5 h, indipendentemente dall'uso o dal non uso della impregnazione sottovuoto.

Pre-trattamento	Umidità (g H ₂ O gPS ⁻¹)	
	Pre-disidratazione	Post-disidratazione
Scottatura (95°C)	9.52 ± 0.10 a	0.723 ± 0.10 ns in 6.0 h
Scottatura (70°C) + ac. citrico (2%)	9.14 ± 0.06 a	0.665 ± 0.09 ns in 6.0 h
Pectine (1%) + sottovuoto (734 mbar)	9.00 ± 0.00 a	0.689 ± 0.02 ns in 9.5 h
Pectine (1%)	8.19 ± 0.32 b	0.632 ± 0.04 ns in 9.5 h
Controllo	8.23 ± 0.18 b	0.672 ± 0.06 ns in 7.5 h
<i>p</i> value	≤ 0.001	0.910
<i>HSD</i>	0.661	-

Figura 55 Contenuto di umidità su peso secco ad inizio ed a termine del processo di disidratazione.

Il significato di tali risultati è ancora più evidente analizzando l'andamento della perdita di umidità da parte del prodotto in funzione del tempo di disidratazione. La figura 56 mostra chiaramente come l'impiego dei diversi trattamenti abbia un effetto considerevole sulla velocità con la quale i campioni perdono acqua.

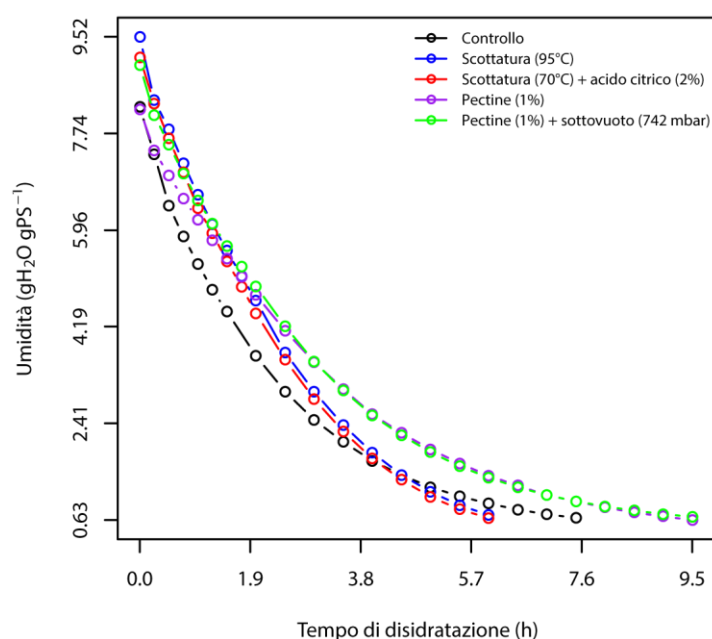


Figura 56 Andamento della perdita di umidità su peso secco in funzione delle ore di disidratazione.

Un ulteriore approfondimento di quanto appena descritto è possibile attraverso il grafico in Fig.57, nel quale è rappresentato l'andamento medio della velocità di disidratazione (gH₂O gPS⁻¹ h⁻¹) in funzione del contenuto medio di umidità del campione, per ciascun pretrattamento.

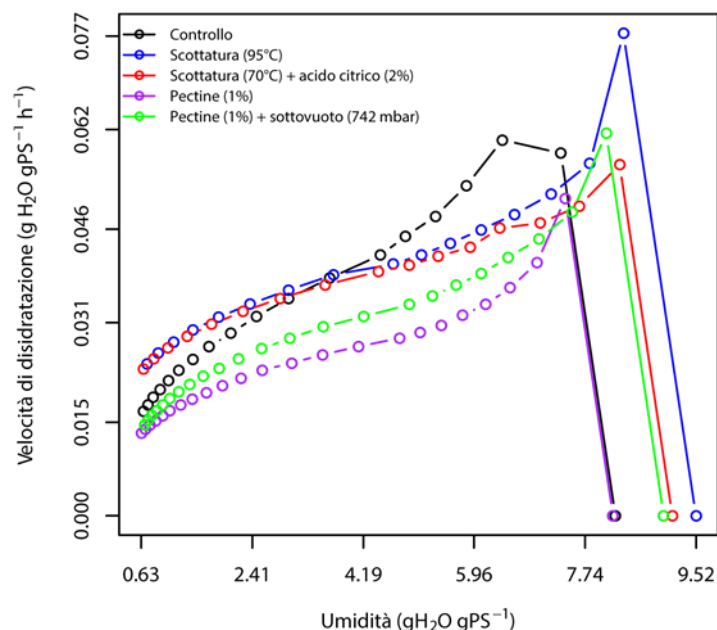


Figura 57 Andamento della velocità di disidratazione in funzione del contenuto di umidità su sostanza secca

La Fig. 57 evidenzia come i pretrattamenti abbiano influito sull'andamento della velocità di disidratazione. In prima battuta, è possibile notare che soltanto il campione di controllo è caratterizzato da una fase di disidratazione a velocità stazionaria, a cui segue un graduale decremento della velocità stessa una volta raggiunto il contenuto di umidità critico. Tutti gli altri pretrattamenti sono caratterizzati dall'assenza della fase a velocità stazionaria. A complemento di quanto osservato in Fig. 58, la fig.57 consente di apprezzare più chiaramente le differenze tra i pretrattamenti. Sebbene il controllo non mostri differenze significative dal resto dei campioni, emerge una netta differenza nella velocità media di disidratazione tra le rondelle soggette a scottatura e quelle immerse in soluzione pectinica al 1% p/v. In particolare, il trattamento di scottatura a 70 °C in soluzione di acido citrico (2% p/v) mostra una velocità media di disidratazione più elevata ($48.63 \pm 4.90 \text{ mg s}^{-1}$) rispetto alle rondelle immerse in soluzione pectinica (1% p/v) in combinazione all'impregnazione sottovuoto (734 mbar) ($29.20 \pm 0.87 \text{ mg s}^{-1}$).

Pre-trattamento	Velocità di disidratazione (mg s^{-1})
Scottatura (95°C)	45.67 ± 4.90 ab
Scottatura (70°C) + ac. citrico (2%)	48.63 ± 4.90 a
Pectine (1%) + sottovuoto (734 mbar)	29.20 ± 0.87 c
Pectine (1%)	32.57 ± 1.90 bc
Controllo	37.97 ± 1.95 abc
<i>p</i> value	≤ 0.01
<i>LSD</i>	15.03

Figura 58 Velocità media di disidratazione.

In definitiva, sebbene le rondelle trattate con impregnazione sottovuoto abbiano assorbito acqua ad un valore del tutto simile ai campioni soggetti a scottatura, la presenza di pectine in soluzione ha ostacolato la perdita di acqua da parte del tessuto, rallentando pertanto il processo di disidratazione. Il maggior contenuto in umidità dei campioni soggetti a impregnazione sottovuoto è da imputarsi al trattamento a pressione sub atmosferica che ha rimosso l'aria da dentro il campione sostituendola con la soluzione di acqua e pectine (Fig. 59)

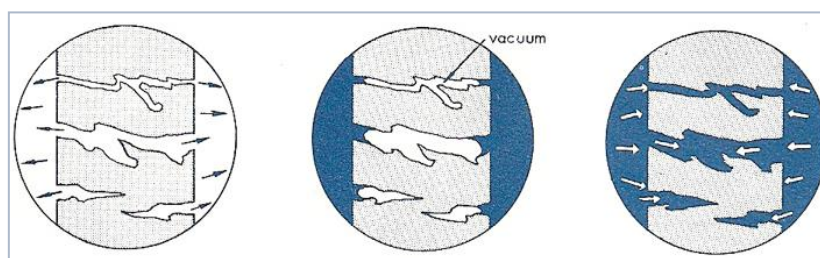


Figura 59 Esempio grafico del funzionamento dell'impregnazione sottovuoto: l'immersione dei campioni alimentari in una soluzione e la loro esposizione a pressioni sub atmosferiche promuove l'espansione e la fuoriuscita del gas interno allo spazio poroso che viene sostituito dalla soluzione esterna.

7.2.2 Sviluppo di modelli semi teorici del processo di disidratazione

Le variazioni del contenuto di umidità dei campioni di carota durante il tempo di disidratazione, relative ai quattro pretrattamenti e al controllo, sono state soggette ad analisi di regressione utilizzando quattro modelli matematici semi-teorici, utilizzati tipicamente per descrivere la disidratazione su strato sottile (thin-layer drying models):

- **Newton model;**
- **Page model;**
- **Henderson and Pabis model;**
- **Logarithmic model.**

Le prestazioni dei modelli sono state valutate utilizzando le seguenti metriche: il coefficiente di determinazione (R^2), la radice dell'errore quadratico medio (RMSE), l'errore assoluto medio (MAE), il chi quadro (χ^2) e l'errore percentuale medio (Errore %).

Sono stati quindi identificati i modelli che hanno meglio descritto la variazione del contenuto di umidità nelle carote durante il tempo di disidratazione per ogni pretrattamento e per il controllo, ossia quelli con i valori più alti di R^2 e con i valori più bassi di RMSE, MAE, χ^2 e Errore %.

A titolo di esempio vengono riportati in Fig. 60 i quattro modelli sviluppati per descrivere l'andamento della perdita di umidità nel pretrattamento di scottatura a 70 °C in una soluzione contenente acido citrico al 2% p/v.

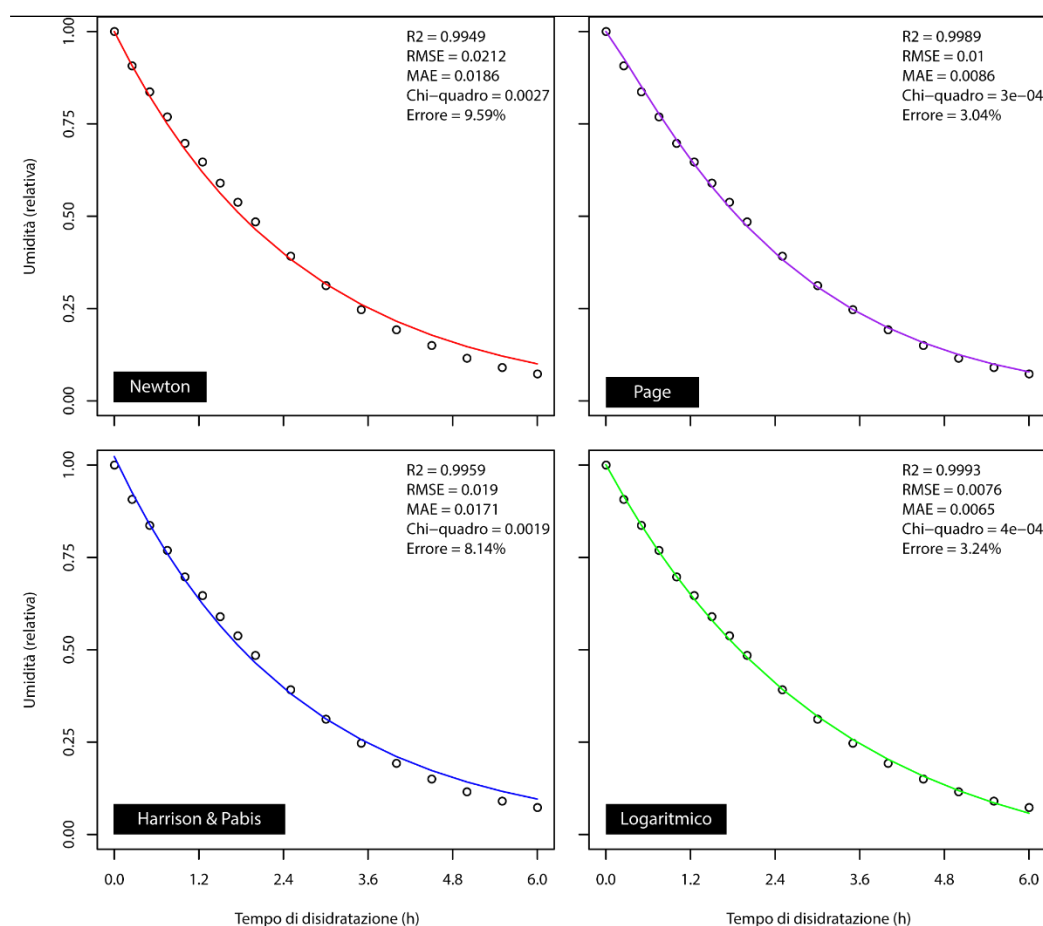


Figura 60 Esempio di modelli semi-teorici sviluppati per descrivere l'andamento della disidratazione. L'esempio è tratto dai campioni soggetti a scottatura a 70°C in soluzione di acido citrico al 2% p/v.

Pre-trattamento	Modello	R ²	RMSE	MAE	χ^2	Errore (%)
Scottatura (95°C)	Page	0.9971	0.0156	0.0119	6.00E-04	4.07%
	Newton (Lewis)	0.9954	0.0197	0.0171	2.00E-03	8.00%
	Henderson & Pabis	0.9954	0.0195	0.0170	1.80E-03	7.66%
	Logaritmico	0.9987	0.0106	0.0089	4.00E-04	3.30%
Scottatura (70°C) + ac. citrico (2%)	Page	0.9989	0.0100	0.0086	3.00E-04	3.04%
	Newton (Lewis)	0.9949	0.0212	0.0186	2.70E-03	9.59%
	Henderson & Pabis	0.9959	0.0190	0.0171	1.90E-03	8.14%
	Logaritmico	0.9993	0.0076	0.0065	4.00E-04	3.24%
Pectine (1%) + sottovuoto (734 mbar)	Page	0.9989	0.0096	0.0081	5.00E-04	4.12%
	Newton (Lewis)	0.9984	0.0118	0.0091	9.00E-04	5.27%
	Henderson & Pabis	0.9989	0.0097	0.0083	7.00E-04	4.72%
	Logaritmico	0.9992	0.0083	0.0071	2.00E-04	2.94%
Pectine (1%)	Page	0.9990	0.0092	0.0073	2.00E-04	2.63%
	Newton (Lewis)	0.9990	0.0092	0.0073	2.00E-04	2.63%
	Henderson & Pabis	0.9991	0.0088	0.0075	2.00E-04	2.66%
	Logaritmico	0.9991	0.0087	0.0076	3.00E-04	2.99%
Controllo	Page	0.9994	0.0072	0.0062	3.00E-04	3.20%
	Newton (Lewis)	0.9955	0.0194	0.0159	2.30E-03	8.90%
	Henderson & Pabis	0.9973	0.0151	0.0126	1.30E-03	6.72%
	Logaritmico	0.9994	0.0072	0.0045	1.00E-04	0.93%

Figura 61 Matrice per la valutazione dei modelli semi-teorici.

In tabella (figura 61) sono riportati i risultati dei quattro modelli semi-teorici testati sui quattro pretrattamenti e sul controllo. Come evidenziato, i modelli che hanno descritto meglio l'andamento dell'umidità delle carote per il tempo di disidratazione sono stati il modello Logaritmico per la scottatura a 95 °C, il modello Page per la scottatura a 70 °C con acido citrico al 2% (p/v), il modello Logaritmico per l'immersione delle pectine al 1% (p/v) con la tecnica dell'impregnazione sottovuoto, i modelli di Page e Newton per le pectine al 1% (p/v) e il modello Logaritmico per il controllo. In generale è però comunque possibile asserire che il modello Logaritmico è stato quello che meglio ha descritto l'andamento della disidratazione in rondelle di carota, indipendentemente dal pretrattamento impiegato.

7.2.3 Reidratazione delle rondelle di carota

Il grafico in Fig. 62 e in figura 63 riportano l'uno l'andamento del processo di reidratazione e l'altro l'incremento di peso (%) dei quattro pretrattamenti e del controllo al termine della reidratazione. Dal grafico risulta che la scottatura (70 °C) + ac. citrico (2%) è stato il pretrattamento che si è reidratato maggiormente con un incremento di peso (%) di 185.96 ± 7.82 a. I pretrattamenti controllo e pectine (1%) sono risultati a fine del processo di reidratazione significativamente non differenti dalla scottatura (70 °C) + ac. citrico (2%), mentre lo sono stati le pectine (1%) + sottovuoto (734 mbar) e la scottatura (95 °C). In merito a questi ultimi due, la scottatura (95 °C) è

risultato essere il pretrattamento che, con $126.49 \pm 5.92c$, ha riscontrato i valori più bassi di incremento di peso (%) e quindi la peggiore condizione di reidratazione.

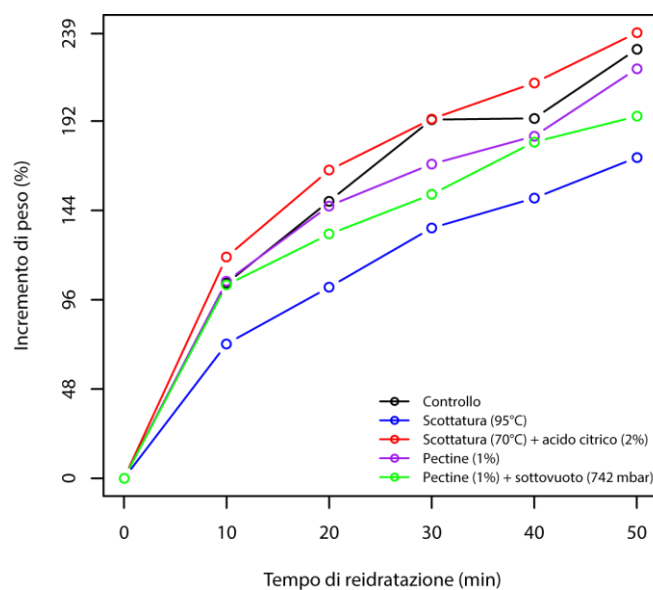


Figura 62 Incremento di peso (%) durante 50 min di reidratazione in acqua a temperatura controllata.

Pre-trattamento	Reidratazione Inc. di peso (%)
Scottatura (95°C)	126.49 ± 5.92 c
Scottatura (70°C) + ac. citrico (2%)	185.96 ± 7.82 a
Pectine (1%) + sottovuoto (734 mbar)	152.61 ± 5.77 bc
Pectine (1%)	165.04 ± 6.68 ab
Controllo	174.13 ± 7.24 ab
<i>p</i> value	≤ 0.001
<i>HSD</i>	31.36

Figura 63 Incremento di peso percentuale a termine reidratazione.

Attività enzimatica della perossidasi (POD)

Per ogni pretrattamento è stata rilevata l'attività enzimatica della perossidasi (POD) ad inizio e fine disidratazione. Ad una unità enzimatica (U) è stato associato un incremento in assorbanza pari a 0.01 per ogni grammo di peso secco del campione.

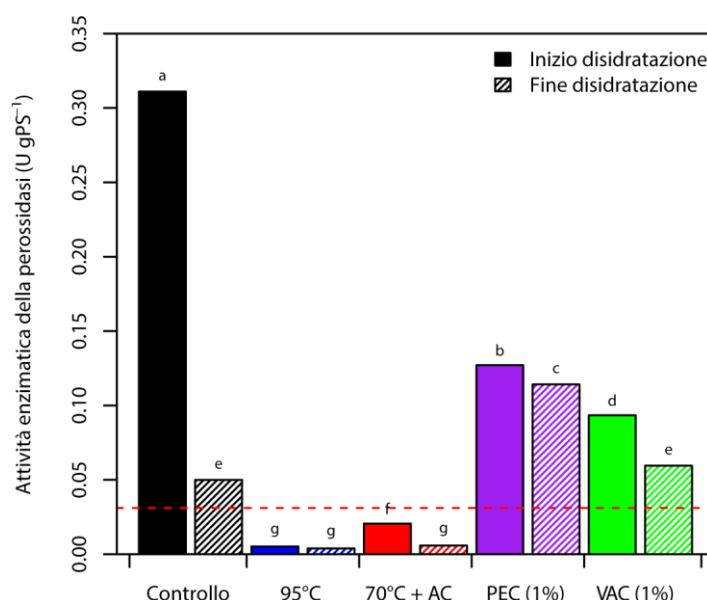


Figura 64 Variazione dell'attività della perossidasi (POD) dei campioni di carota per ogni pretrattamento ad inizio e fine disidratazione.

Il grafico riportato in Fig. 64 mostra l'andamento dell'attività enzimatica della perossidasi (POD) durante il processo di disidratazione, ossia ad inizio e fine dello stesso. Da tale figura si rileva chiaramente che i pretrattamenti di scottatura a 95 °C e scottatura a 70 °C in una soluzione di acido citrico al 2% (p/v) mostrano un'attività dell'enzima POD significativamente inferiore a tutti gli altri pretrattamenti utilizzati; attività che risulta quasi del tutto assente a fine disidratazione, con valori di $0.0039 \pm 0.001 \text{ g U/gPS}^{-1}$ per il 95 °C e di $0.0058 \pm 0.001 \text{ g U/gPS}^{-1}$ per il 70 °C + AC. Come ci si aspettava, i due pretrattamenti di scottatura hanno fin da subito evidenziato una quasi completa disattivazione dell'enzima perossidasi, convalidando in tal modo la bontà dei pretrattamenti stessi. Il **Controllo** ha evidenziato, ad inizio del processo di disidratazione, l'attività enzimatica più alta ($0.311 \pm 0.006 \text{ a U/gPS}^{-1}$); a differenza di tutti gli altri pretrattamenti, il Controllo è risultato essere quello con la maggiore diminuzione dell'attività enzimatica della perossidasi, raggiungendo a fine disidratazione un valore di $0.05 \pm 0.001 \text{ e U/gPS}^{-1}$.

I pretrattamenti di immersione con pectine al 1% (p/v) (**PEC 1%**) e di impregnazione sottovuoto con pectine al 1% (p/v), senza alcun trattamento termico, hanno evidenziato una diminuzione

dell'attività della POD insufficiente a garantire un prodotto stabile per la conservazione in post-disidratazione.

7.2.4 Contenuto in fenoli totali

Per ogni pretrattamento è stato rilevato il contenuto in fenoli totali ad inizio e fine disidratazione. Il contenuto in fenoli totali è stato espresso come milligrammi di acido gallico equivalente su 100 grammi di peso fresco ($\text{mg GAE } 100\text{gPF}^{-1}$) e di peso secco ($\text{mg GAE } 100\text{gPS}^{-1}$). I risultati sono riportati in tabella (figura 65).

Dalla tabella si evince che valutare il cambiamento nel contenuto in fenoli totali esprimendolo su peso fresco, non permette di asserire con certezza l'impatto dei pretrattamenti e del processo di disidratazione sulla concentrazione dei fenoli totali stessi. Ciò che è possibile notare è una tendenza al minor contenuto in fenoli totali a fine disidratazione laddove è stato attuato un pretrattamento di scottatura. Inoltre, i pretrattamenti con pectine sono risultati essere quelli con il maggior contenuto in fenoli totali a fine disidratazione: $29.09 \pm 2.7a \text{ mg GAE } 100 \text{ gPF}^{-1}$ per i campioni immersi in pectine (1% p/v) e $26.13 \pm 1.32ab \text{ mg GAE } 100 \text{ gPF}^{-1}$ per i campioni trattati con impregnazione sottovuoto dopo esser stati immersi in una soluzione di pectine al 1% p/v. Il possibile effetto della scottatura sulla diminuzione in fenoli totali trova conferma nell'analisi del contenuto in fenoli totali espresso su unità di peso secco. Sebbene le differenze significative tra pretrattamenti non risultino così marcate, è possibile asserire con certezza che l'impiego della scottatura a 95°C è responsabile di una perdita nel contenuto in fenoli totali rispetto alla condizione di controllo. L'analisi della varianza ha inoltre mostrato significatività per il fattore 'tempo di disidratazione' (t), mettendo evidenza come la disidratazione comporti una perdita in fenoli totali per ogni pretrattamento utilizzato.

Fattori	Isomerizzazione (Abs 346 nm gPS ⁻¹)	Carotenoidi (µg gPF ⁻¹)	Carotenoidi (µg gPS ⁻¹)	% III / II	Fenoli totali (mg AGE 100gPF ⁻¹)	Fenoli totali (mg AGE 100gPS ⁻¹)
Pre-trattamento (P)						
Scottatura (95°C)	3.71 ± 0.36	19.40 ± 0.343	180.14 ± 3.19	34.94 ± 1.25	17.73 ± 2.64	164.60 ± 24.53
Scottatura (70°C) + ac. citrico (2%)	4.22 ± 0.16	21.23 ± 0.987	202.60 ± 9.42	35.40 ± 0.20	19.65 ± 1.98	187.54 ± 18.92
Pectine (1%) + sottovuoto (734 mbar)	2.78 ± 0.06	15.85 ± 0.48	159.57 ± 4.83	35.85 ± 0.23	25.12 ± 1.07	253.01 ± 10.73
Pectine (1%)	2.99 ± 0.08	20.42 ± 1.03	181.84 ± 9.17	36.98 ± 0.34	26.99 ± 1.83	240.38 ± 16.32
Controllo	3.15 ± 0.07	17.95 ± 0.716	181.54 ± 7.24	33.16 ± 0.73	26.46 ± 3.00	267.54 ± 30.38
P	<0.001	<0.001	<0.01	<0.001	<0.01	<0.01
HSD	-	3.43	32.28	-	-	94.21
Tempo di disidratazione (t)						
Inizio	3.18 ± 0.13	19.63 ± 0.661	187.589 ± 5.87	35.65 ± 0.52	24.98 ± 1.00	239.93 ± 11.11
Fine	3.56 ± 0.18	18.31 ± 0.572	174.6868 ± 4.33	34.88 ± 0.47	21.41 ± 2.02	205.29 ± 19.53
P	<0.001	0.039	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
HSD	-	1.24	11.68	-	-	33.21
P x t						
Scottatura (95°C)	2.77 ± 0.07	20.16 ± 0.27	187.2295 ± 2.51	38.22 ± 0.07	22.68 ± 2.59	210.56 ± 24.07
Scottatura (95°C)	4.66 ± 0.14	18.64 ± 0.30	173.055 ± 2.75	31.66 ± 0.26	12.78 ± 1.92	118.64 ± 17.79
Scottatura (70°C) + ac. citrico (2%)	4.22 ± 0.19	23.37 ± 0.99	222.972 ± 9.40	35.76 ± 0.29	23.52 ± 2.08	224.42 ± 19.83
Scottatura (70°C) + ac. citrico (2%)	4.22 ± 0.29	19.10 ± 0.73	182.2306 ± 7.01	35.04 ± 0.15	15.79 ± 0.64	150.65 ± 6.08
Pectine (1%) + sottovuoto (734 mbar)	2.86 ± 0.02	16.18 ± 0.24	162.9777 ± 2.46	35.45 ± 0.18	24.12 ± 1.71	242.92 ± 17.22
Pectine (1%)	2.70 ± 0.11	15.51 ± 0.97	156.1698 ± 9.76	36.25 ± 0.34	26.13 ± 1.32	263.09 ± 13.32
Pectine (1%)	2.93 ± 0.17	19.68 ± 1.68	175.2315 ± 14.96	36.56 ± 0.46	24.89 ± 2.25	221.68 ± 20.07
Pectine (1%)	3.04 ± 0.02	21.16 ± 1.33	188.4388 ± 11.81	37.39 ± 0.48	29.09 ± 2.70	259.08 ± 24.06
Controllo	3.12 ± 0.04	18.74 ± 0.97	189.5345 ± 9.84	32.26 ± 1.39	29.68 ± 1.06	300.08 ± 10.76
Controllo	3.18 ± 0.15	17.16 ± 1.01	173.5396 ± 10.24	34.06 ± 0.16	23.24 ± 5.80	234.99 ± 58.64
P	<0.001	ns	ns	<0.001	<0.05	ns
HSD	0.83	-	-	3.01	12.96	-

Figura 65 Risultati dell'ANOVA a due vie per il contenuto in fenoli totali e lo studio del profilo dei carotenoidi totali.

7.2.5 Contenuto in carotenoidi totali

L'analisi della quantificazione dei carotenoidi totali è stata eseguita tramite tecnica spettrofotometrica. Le acquisizioni spettrali dei carotenoidi estratti sono state eseguite nel range dei 330 e 600 nm ed utilizzate per la identificazione dei massimi e dei minimi locali mediante la trasformazione in derivata I e II (Fig. 66): a valori della derivata I pari a 0 sono corrisposti i massimi e minimi locali dello spettro dei carotenoidi;

I massimi e minimi locali sono così definiti:

Massimi locali: valori della derivata II < 0

Minimi locali: valori della derivata II > 0

Le lunghezze d'onda identificate come minimi locali sono risultate pari a circa 341 nm, 357 nm e 466 nm; quelle identificate come massimi locali sono risultate pari a circa 346 nm, 450 nm e 476 nm (Fig.66).

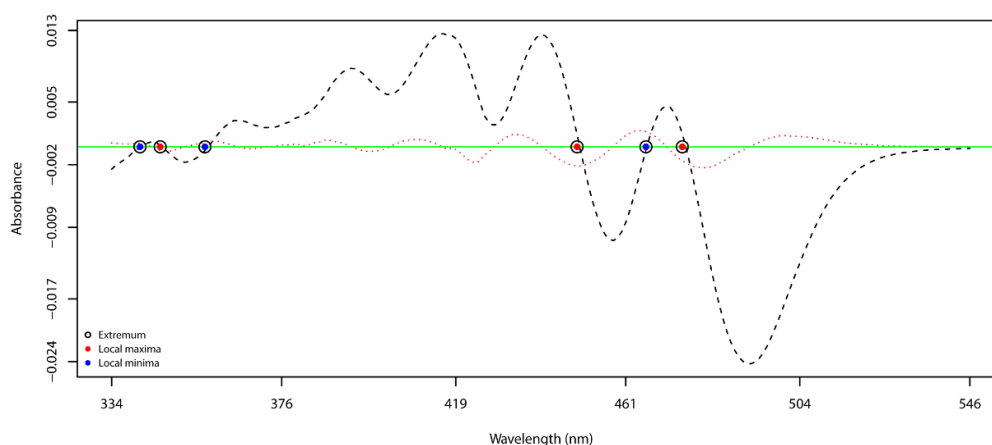


Figura 66 Derivata I (linea tratteggiata di nero), derivata II (linea tratteggiata di rosso) e identificazione dei minimi e massimi locali relativi al profilo spettrale del contenuto dei carotenoidi.

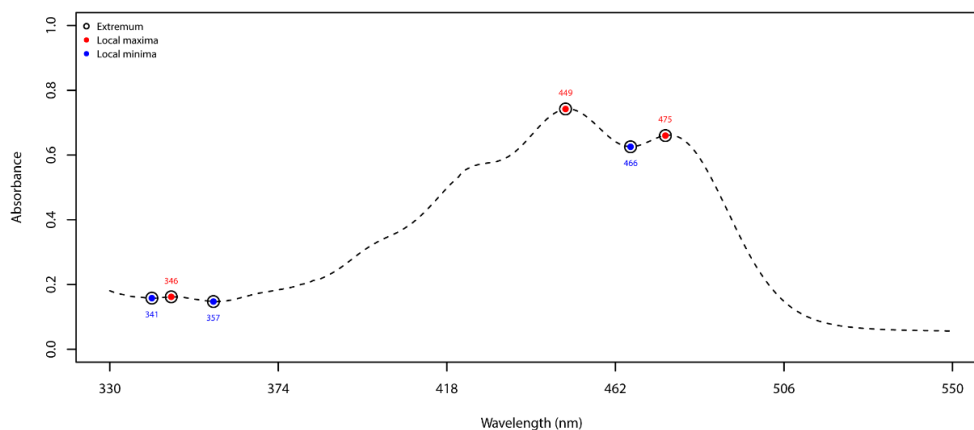


Figura 67 Graficazione dei minimi e massimi locali del profilo spettrale del contenuto di carotenoidi.

L'isomerizzazione dei carotenoidi è stata misurata in termini di assorbanza dei cis-carotenoidi a 346 nm (λ_{max}) per unità di campione, espressa come grammo di peso secco; ad un valore più elevato di tale indicatore corrisponde un maggior grado di isomerizzazione dei carotenoidi. Come si evince dalla tabella 10, il controllo ed i pretrattamenti con pectine non mostrano variazioni nel contenuto in cis-carotenoidi. Diversamente, il pretrattamento di scottatura a 70 °C in soluzione di acido citrico (2% p/v) provoca un incremento delle forme cis, che rimane invariato durante la disidratazione. L'impiego della scottatura a 95 °C non impatta immediatamente sulla isomerizzazione dei carotenoidi, che rimangono simili al controllo nel prodotto non ancora disidratato. Tuttavia, l'esposizione al pretrattamento di scottatura a 95 °C è responsabile di un incremento delle forme cis durante il processo di disidratazione.

Nelle carote crude, i carotenoidi presenti sono prevalentemente in forma trans; fattori come l'esposizione alla luce, all'ossigeno o al calore possono convertirli in differenti conformazioni cis. Se nel caso del pomodoro le conformazioni cis del licopene (carotenoide più presente con il 94-96% in forma trans) risultano maggiormente bio-assimilabili rispetto a quelle trans, nel caso del β -carotene (carotenoide più presente nelle carote fresche con il 98% in forma trans) l'isomerizzazione è invece da sconsigliarsi dato che la bioconversione del β -carotene alla sua forma attiva, il retinolo, è maggiore per tutti gli isomeri trans rispetto alle forme cis (la forma cis si stima infatti abbia solamente dal 38 al 53% dell'attività biologica di tutte le forme trans) (Thane e Reddy, 1997, Calabrese et al., 2009, Giovanelli e Pagliarini, 2009). Alla luce di ciò si può dire che i due pretrattamenti di scottatura sperimentati provocano un cambiamento nutrizionale del prodotto in termini di qualità dei carotenoidi, con una maggior propensione di quest'ultimi all'isomerizzazione in forma cis.

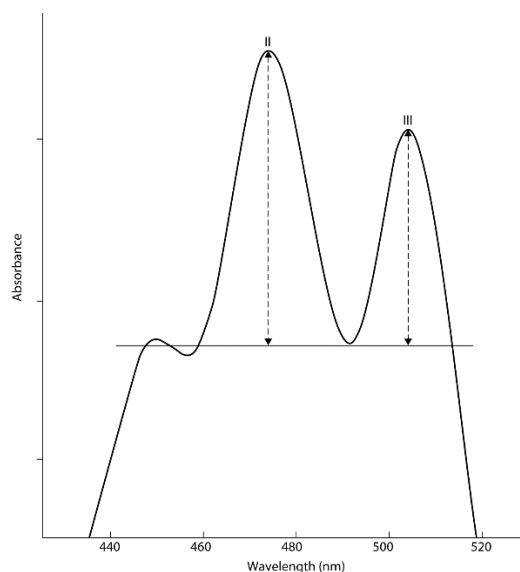


Figura68 Dettaglio del secondo (II) e terzo (III) picco del profilo spettrale dei carotenoidi.

In figura 66 sono riportati anche i risultati ottenuti dallo studio del rapporto percentuale tra l'altezza del picco di assorbanza a 476 nm (Fig. 68, picco III) e l'altezza del picco di assorbanza a 450 nm (Fig.68, picco II), entrambe relative alla linea di base definita dal minimo locale a 466 nm (Britton, 1995).

Il rapporto è relativo al profilo spettrale del contenuto dei carotenoidi, registrati ai diversi tempi di campionamento da parte di ogni pretrattamento in disidratazione.

Tale rapporto è strettamente correlato al contenuto in α e β carotene: all' α carotene corrisponde un rapporto tra il terzo e il secondo picco pari al 55%, al β carotene un rapporto tra terzo e secondo picco spettrale pari al 25% (Davies, 1976).

Nella carota non c'è una prevalenza netta dell'uno o dell'altro carotenoide; le percentuali si aggirano quindi in questo range dal 25 al 55% e se si altera questo rapporto durante la disidratazione, vuol dire che si degrada di più l' α o di più il β carotene. Prendendo il pretrattamento di scottatura a 95 °C si può notare un calo significativo nel rapporto tra il terzo ed il secondo picco da inizio a fine disidratazione. Tale calo è stato principalmente dovuto ad una degradazione maggiore a carico dell' α carotene durante la disidratazione; le percentuali ai vari tempi di campionamento sono variate dal $38.22 \pm 0.07\%$ ad inizio disidratazione al $31.66 \pm 0.26\%$ a fine disidratazione. Tutti gli altri pretrattamenti non hanno mostrato un cambiamento nel valore tra i due picchi a seguito del processo. Alla luce di tali risultati, sarebbe opportuno investigare ulteriormente le cause di quanto osservato facendo ricorso alla cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).

Il valore di assorbanza corrispondente a circa 450 nm (massimo locale) è stato impiegato per stimare il contenuto in carotenoidi totali (figura 66) dei cinque diversi pretrattamenti soggetti a disidratazione. Al fine di poter confrontare con più semplicità il risultato con la bibliografia esistente, il contenuto in carotenoidi totali è stato espresso sia su peso fresco ($\mu\text{g gPF}^{-1}$), che su peso secco ($\mu\text{g gPS}^{-1}$).

Indipendentemente dall'unità di misura impiegata, l'ANOVA ha mostrato significatività soltanto per i singoli fattori (pretrattamento e tempo di disidratazione) e non per l'interazione tra gli stessi. Allo stesso modo, il confronto a coppie fornisce la stessa chiave di lettura dei dati tra il contenuto in carotenoidi totali espresso su unità di peso fresco e il contenuto degli stessi per unità di peso secco. In definitiva, il contenuto in carotenoidi totali diminuisce da inizio a fine disidratazione, mentre per quanto riguarda i pretrattamenti impiegati l'uso dell'impregnazione sottovuoto sembra condurre ad un tendenziale impoverimento nella quantità di carotenoidi presenti nel prodotto.

7.2.6 Analisi colorimetrica

Per l'analisi colorimetrica sono stati analizzati quattro parametri specifici: Indice di Bianco (WI), Luminosità (L^*), Angolo di colore (h) e Croma (C^*).

L'Indice di Bianco rappresenta la distanza euclidea tra il colore del campione in esame e la colorazione bianca dello spazio di colore CIElab. Analizzare tale parametro sulla carota è particolarmente importante, poiché lo sbiancamento superficiale (diminuzione del WI) è una perdita di colorazione tipica del tessuto dovuta alla disidratazione dello stesso ed alla biosintesi di suberina e lignina da parte delle cellule, come risposta al danno da taglio.

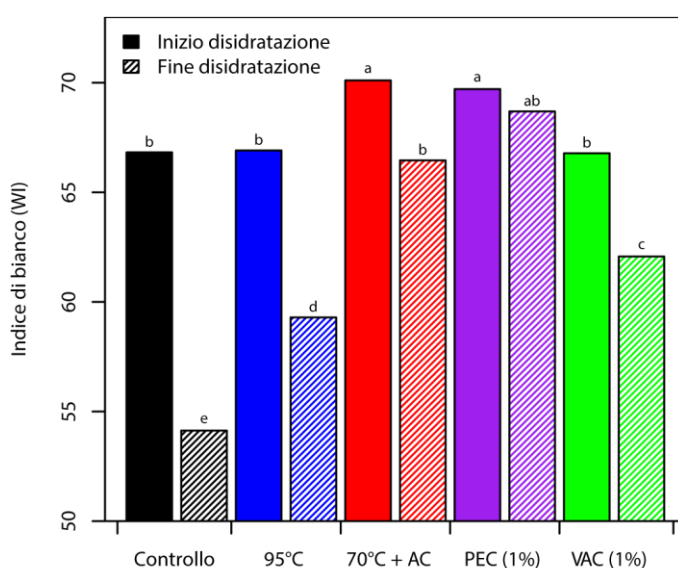


Figura 69 Andamento dell'indice di Bianco (WI) da inizio e fine disidratazione.

In Figura 69 sono riportati i valori dell'Indice di Bianco ad inizio ed a fine disidratazione. Dai risultati riportati in figura è possibile notare che tutti i campioni hanno mostrato un calo nei valori dell'Indice di Bianco (WI) più o meno considerevoli. In modo particolare i pretrattamenti di scottatura a 70 °C con acido citrico al 2% (p/v) (70 °C + AC), il pretrattamento di immersione in soluzione pectinica al 1% p/v (PEC 1%) ed il trattamento di impregnazione sottovuoto in soluzione pectinica (1% p/v) (VAC 1%) sono quelli che hanno mantenuto più stabile il WI di partenza, con dei cali di circa il 5% per il 70°C+AC e il VAC 1% e di circa l'1% per il PEC (1%). Diminuzioni maggiori nel WI, e quindi sbiancamenti del tessuto, sono stati osservati principalmente nel controllo e a seguire nelle rondelle scottate a 95 °C ed in quelle impregnate sottovuoto in soluzione pectinica al 1% p/v.

In Figura 70 sono riportati i risultati relativi ai cambiamenti di Luminosità (L^*) riscontrati nei campioni. Di norma, nelle carote, ad un minor valore del WI corrisponde un maggior tenore in L^* del tessuto. Questo perché il processo di sbiancamento è particolarmente legato ad un aumento della luminosità superficiale del campione. Pertanto, per quanto riguarda la luminosità delle rondelle, le considerazioni estraibili dai risultati sono del tutto simili a quanto già specificato per il WI. Fa eccezione l'incremento in L^* riscontrato nel prodotto scottato in acido citrico, che mostra un incremento della luminosità a cui non corrisponde uno sbiancamento superficiale del tessuto.

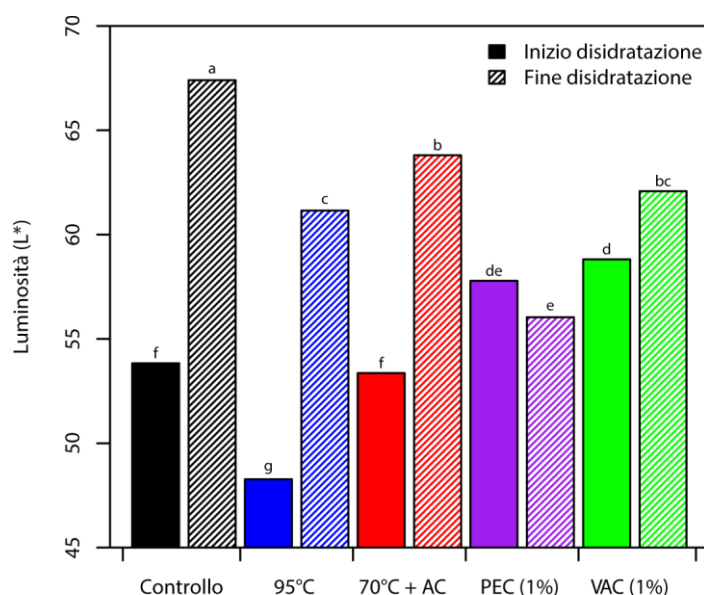


Figura 70 Andamento della Luminosità (L^*) da Inizio e Fine disidratazione.

Relativamente ai valori della tinta (o angolo di colore, h) e della saturazione del colore (o croma, C^*), i risultati ottenuti sono riportati rispettivamente nei grafici a barre in figura 71 e 72. Nelle carote è particolarmente apprezzato dai consumatori un colore caratterizzato da una tinta rosso intensa, quasi violacea. Tale colorazione corrisponde alla combinazione di bassi valori di angolo di colore ed alti valori di croma. Osservando i due grafici è chiaro che tali presupposti sono rispettati soltanto dal trattamento di scottatura a 70 °C in acido citrico (2% p/v) e dal dipping in soluzione pectinica (1% p/v). A seguire, sia il trattamento di impregnazione sottovuoto in soluzione pectinica (1% p/v) che la scottatura a 95 °C possono comunque essere considerati trattamenti migliorativi del colore finale del prodotto, se comparati al controllo.

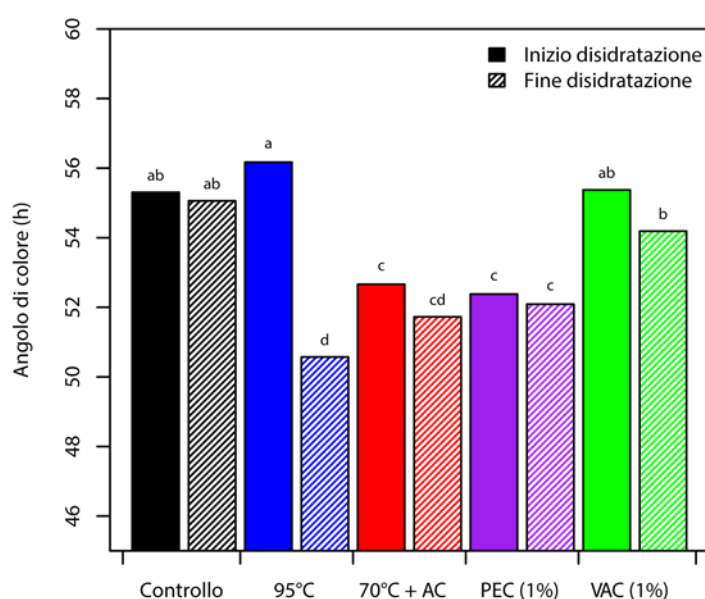


Figura 71 Andamento dell'Angolo di Colore (h) da Inizio e Fine disidratazione.

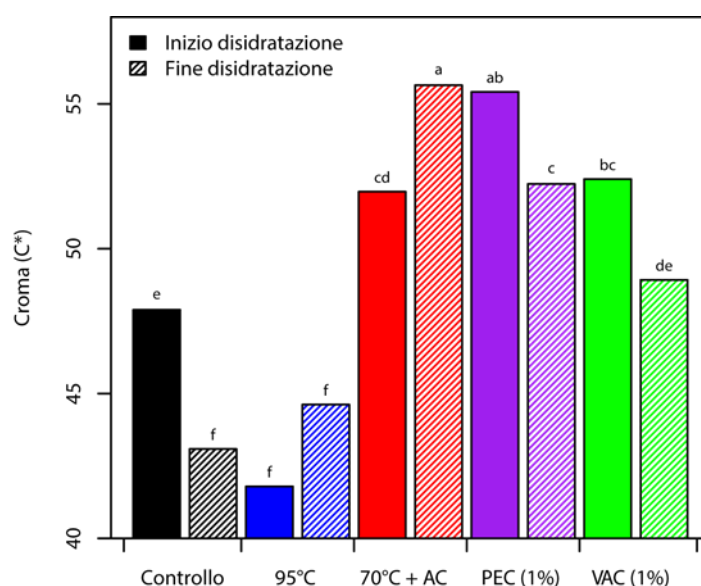


Figura 72 Andamento del Croma (C*) da Inizio e Fine disidratazione.

7.3 Attività 3

7.3.1 Effetti dei pretrattamenti sui campioni non disidratati (Tempo zero)

I risultati delle analisi per l'attività 3, precedentemente illustrate, sono stati riportati nella seguente tabella (figura 73), e messi a confronto con il campione controllo.

Fattori	a_w	Umidità (gH ₂ O gPS ⁻¹)	SSC (Brix°)	Consistenza (N)	Car. Totali (mg βcar. gPS ⁻¹)	Fenoli totali (mg AGE gPS ⁻¹)	Colore		
							L*	h	C*
Controllo	0.98	9.69 b	6.11	55.86	4.88	0.50 b	57.86	54.51	55.88
Blanching (B)									
0% trealosio	0.98	11.22 a	5.14	49.03	5.37	1.04 a	47.67	58.44	48.36
4% trealosio	0.98	11.15 a	5.18	44.44	5.07	0.93 a	47.38	57.90	47.56
P value	NS	< 0.001	< 0.001	< 0.001	NS	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Vacuum (V)									
Trealosio	Thé verde								
-	-	0.98	10.32 b	5.29	50.06	4.99	0.53 c	50.02	56.08
0.00%	0.00%	0.97	12.91 a	4.25	51.98	5.47	0.54 c	48.84	58.09
0.00%	0.25%	0.98	13.27 a	3.78	42.07	5.49	1.98 a	47.09	58.44
10.00%	0.00%	0.98	9.16 c	6.56	43.27	5.08	0.54 c	47.77	59.88
10.00%	0.25%	0.97	9.95 bc	6.34	49.25	5.00	1.30 b	47.84	57.58
P value	NS	< 0.001	< 0.001	< 0.001	NS	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
B x V									
P value	NS	NS	< 0.001 *	< 0.001 *	NS	NS	0.001 *	< 0.001 *	< 0.01 *

* I risultati sono riportati in un grafico

Figura 73 Risultati dell'ANOVA a due vie.

L'attività dell'acqua nei campioni pretrattati, sia con la scottatura che con l'impregnazione sottovuoto, rispetto al controllo rimane invariata, quindi circa pari a 0.98. L'attività dell'acqua è un parametro molto importante ai fini della shelf-life di un prodotto in quanto influisce sulle seguenti caratteristiche di un prodotto:

- stabilità microbiologica,
- stabilità chimica,
- stabilità enzimatica,
- colore, sapore e valori nutrizionali,
- contenuto di proteine e vitamine

Per quanto riguarda l'analisi dell'umidità, i campioni scottati subiscono un imbibimento del tessuto della carota in acqua. Come si osserva dalla tabella, il controllo possiede 9.69g H₂O/g PS mentre i campioni scottati in soluzione di 0% trealosio e in soluzione di 4% trealosio, hanno circa 11g H₂O/g PS. Per i campioni sottoposti anche al pretrattamento di impregnazione sottovuoto si può notare che in soluzione di 0% trealosio e 0.25% thè verde, in soluzioni di 0% trealosio e 0% thè verde e in assenza di impregnazione, l'umidità è rispettivamente pari a circa 13.27a g H₂O/g PS, 12.91a g H₂O/g PS e 10.32b g H₂O/g PS. Ciò è dovuto al fatto che con questo trattamento si va a sostituire l'aria intracellulare con la soluzione di impregnazione (Fig. 74).

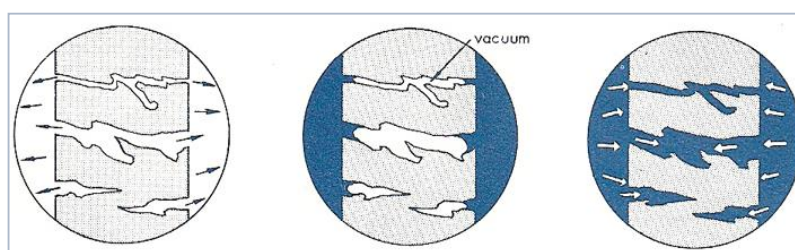


Figura 74 Funzionamento dell'impregnazione sottovuoto.

Utilizzando l'impregnazione sottovuoto in soluzione di 10% trealosio e 0% thè verde e in soluzione di 10% trealosio e 0.25% thè verde si osserva che il contenuto di umidità è minore, ovvero è rispettivamente circa pari a 9.16 g H₂O/g PS e 9.95 g H₂O/g PS. La spiegazione di ciò è data dal fatto che nel tessuto delle carote entra il trealosio che va a far parte della sostanza secca.

Per i carotenoidi non si notano differenze significative tra il campione controllo e i campioni pretrattati. Infatti il campione di controllo ha 4.88 mg β car./g PS e i campioni pretrattati in media hanno 5.21 mg β car./g PS. Il contenuto di carotenoidi dei campioni sottoposti ai pretrattamenti risulta statisticamente identico al contenuto in carotenoidi totali nel controllo. Ciò è considerato un risultato positivo in quanto i campioni pretrattati rispetto al fresco non sono stati impoveriti in termini di contenuto di carotenoidi. Essendo però i carotenoidi sottoposti a trattamento termico, si dovrà verificare con una sperimentazione futura, è vedere se c'è un'isomerizzazione, provocando una diminuzione della disponibilità, impoverendo dal punto di vista nutrizionale il prodotto. Per l'analisi dei fenoli totali, espressi in mgAGE/g PS, si può osservare che con il pretrattamento di blanching, indipendentemente dall'utilizzo di una soluzione di trealosio al 0% o al 4%, si ha un maggior contenuto di fenoli totali. Infatti, il contenuto di fenoli totali nel campione di controllo è circa pari a 0.50 mgAGE/g PS e nei campioni scottati in soluzione di 0% trealosio e 4% trealosio, il contenuto di fenoli totali è rispettivamente circa pari a 1.04 mgAGE/g PS e 0.93 mgAGE/g PS (circa pari al doppio del campione controllo). Ciò probabilmente è dovuto al fatto che il pretrattamento di blanching facilita l'estrazione dei fenoli dal tessuto. Sia i campioni non sottoposti al pretrattamento di impregnazione sottovuoto che quelli sottoposti in soluzione di 0% trealosio e 0% thè verde e in soluzione di 10% trealosio e 0% thè verde, si è notato il contenuto di fenoli totali è in media pari a circa 0.54 mgAGE/g PS. Quindi il contenuto di fenoli totali dei campioni pretrattati risulta statisticamente identico al contenuto di fenoli totali nel controllo. Mentre si osserva che l'utilizzo del thè verde nel pretrattamento arricchisce la matrice vegetale in termini di contenuto di fenoli totali. Infatti, l'impregnazione sottovuoto in soluzione di 0.25% thè verde, indipendentemente dalla concentrazione di trealosio utilizzata, ha un contenuto in fenoli totali rispettivamente pari a 1.98a mgAGE/g PS e 1.30b mgAGE/g PS (circa pari a quattro e tre volte il campione controllo). Quest'ultimo valore si ipotizza che sia minore in quanto l'utilizzo della soluzione di trealosio al 10% limiterebbe l'ingresso di thè verde nei tessuti. Chiaramente questa ipotesi andrà verificata con esperimenti mirati. Ovviamente l'arricchimento in termini di contenuto di fenoli totali è dovuto all'utilizzo di soluzione di thè verde, alimento ricco di fenoli, di cui più dell'80% dei fenoli è rappresentato dai flavonoli (catechine). Si nota infatti che

In uno studio condotto da D. Zhang e Y. Hamauzu, 2004, sono stati studiati composti fenolici, le loro proprietà antiossidanti e la distribuzione nelle carote. Le carote contengono principalmente acidi idrossicinnamici e derivati. Tra questi l'acido clorogenico era un importante acido idrossicinnamico, che rappresentava dal 42.2% al 61.8% di composti fenolici totali rilevati in

diversi tessuti di carota. Il contenuto fenolico in diversi tessuti diminuiva nel seguente ordine: buccia > floema > xilema.

Per analizzare contenuto in solidi solubili totali (SSC) espressi in °Brix, che presenta un'interazione tra il pretrattamento di blanching e trattamento vacuum facciamo riferimento al seguente grafico in (Fig. 75).

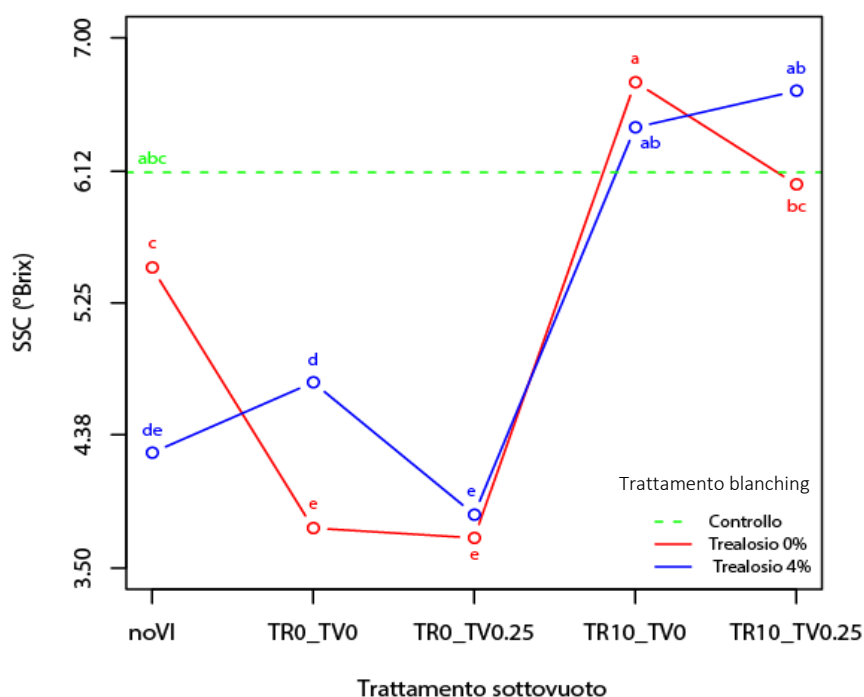


Figura 75Variazione dei solidi solubili totali.

Il contenuto di solidi solubili totali nel campione di controllo è pari a circa 6.11 °Brix. Come si osserva dal grafico nei pretrattamenti di scottatura e di impregnazione sottovuoto in assenza di trealosio, si ha un impoverimento di solidi solubili rispetto al campione di controllo. Mentre se si utilizza l'impregnazione sottovuoto con una soluzione al 10% trealosio indipendentemente dal thè verde si ha un arricchimento in solidi solubili. Ciò è dovuto all'ingresso di trealosio nei tessuti che andrà a far parte dei solidi solubili della matrice.

Per analizzare la consistenza, che presenta un'interazione tra il pretrattamento di blanching e trattamento vacuum facciamo riferimento al seguente grafico in (Fig.76

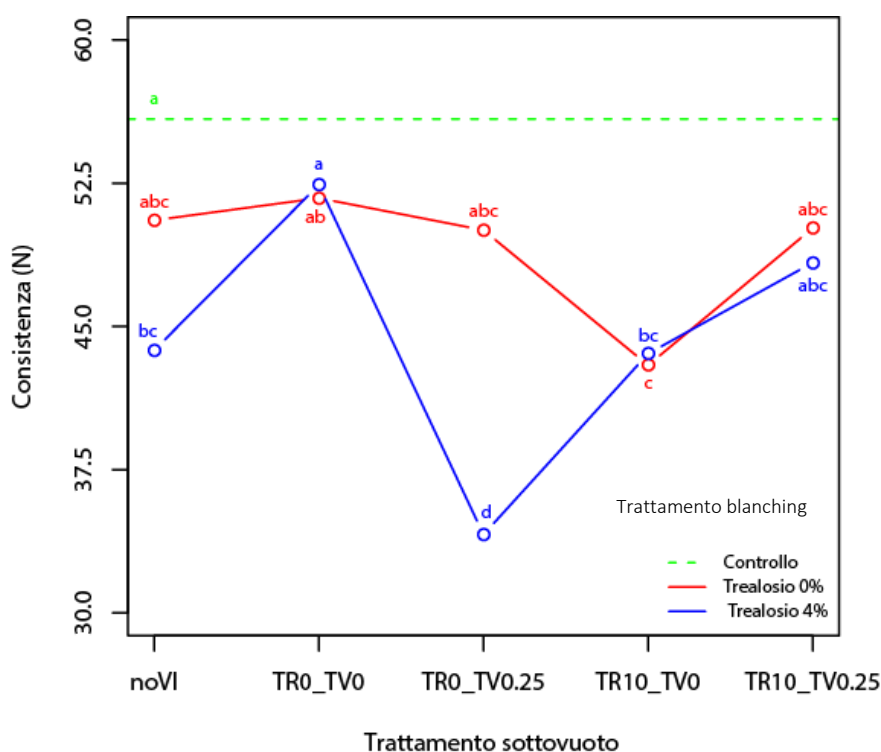


Figura 76 Valutazione della consistenza.

Nonostante il protocollo di analisi dovrà essere ottimizzato, comunque si può notare una tendenza al rammollimento dei campioni pretrattati rispetto al campione controllo. La perdita di consistenza del tessuto dei campioni pretrattati è dovuta dalla cottura.

Per l'analisi colorimetrica sono stati analizzati tre parametri specifici: Luminosità (L^*), Angolo di colore (h) e Croma (C^*). In figura 77 sono riportati i risultati relativi ai cambiamenti di Luminosità (L^*) riscontrati nei campioni. Questo parametro è molto interessante per le carote in quanto a seguito del taglio, sia per azione enzimatica che per perdita di acqua superficiale dal tessuto, tendono a sbiancare, ossia la luminosità superficiale aumenta. Come si osserva dal grafico sottostante, effettuare i pretrattamenti porta a una perdita di luminosità dei campioni rispetto al campione controllo. Nonostante si osservi una interazione tra la scottatura e l'impregnazione sottovuoto non è possibile mettere a fuoco un effetto di un pretrattamento più marcato rispetto ad un altro.

Come affermato inoltre da Ahmed et al. (2000), il calore induce modifiche sul pigmento carotenoide, favorendone l'isomerizzazione, con conseguente cambiamento di colore del tessuto.

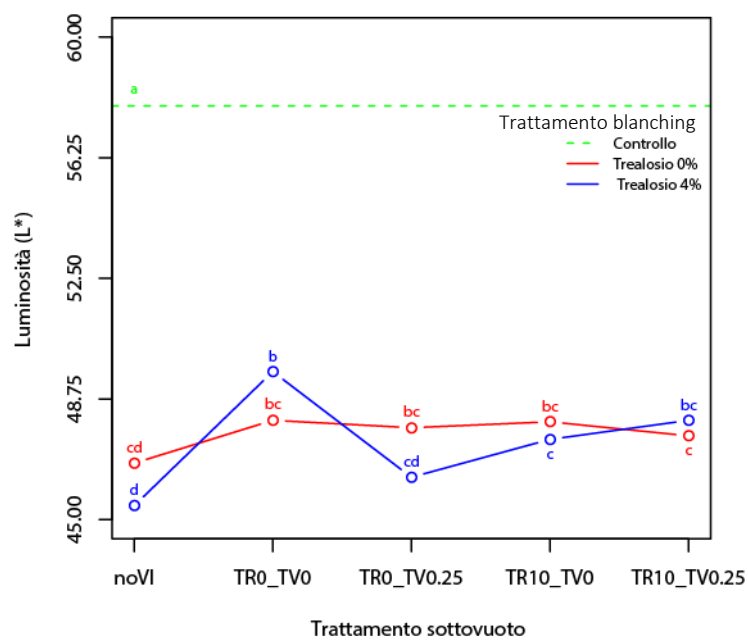


Figura 77 Andamento della Luminosità (L*).

Per analizzare i valori della tinta (o angolo di colore, h), che presenta un'interazione tra il pretrattamento di blanching e trattamento vacuum facciamo riferimento al seguente grafico in (Fig. 78).

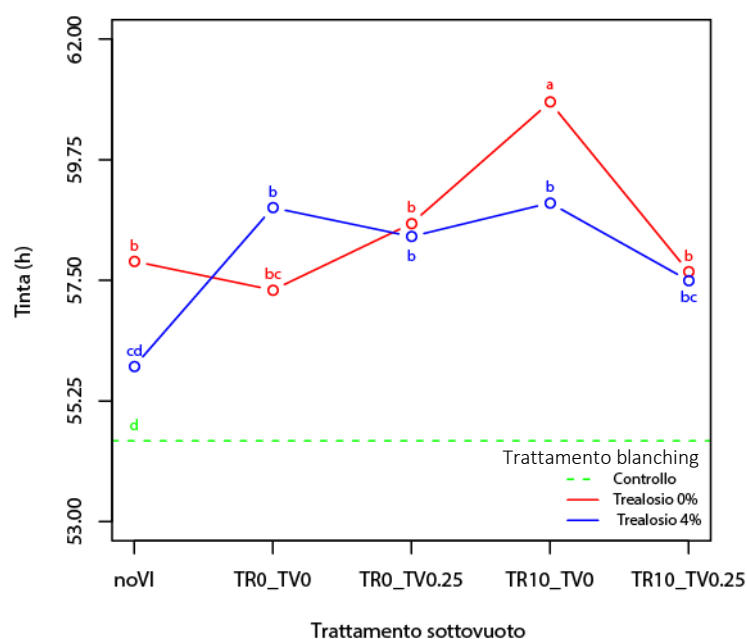


Figura 78 Andamento della tinta (h).

Si può osservare un aumento della tinta nei campioni pretrattati rispetto al campione controllo. Il colore nei campioni pretrattati tende a diventare un arancio più scuro, virando verso il rosso.

Si nota qualche differenza dovuta probabilmente alla variabilità intrinseca della matrice, ma in linea generale l'impatto è più legato al pretrattamento di scottatura piuttosto che all'impregnazione. Quindi anche se le condizioni di blanching erano controllate, bisogna tener conto della variabilità che dipende sia dai campioni utilizzati che dalle piccole differenze di raffreddamento del prodotto durante la procedura. Comunque, l'aumento dell'angolo di colore è molto apprezzato dal consumatore.

Per analizzare i valori del croma (C^*) o saturazione, che presenta un'interazione tra il pretrattamento di blanching e trattamento vacuum facciamo riferimento al seguente grafico (Fig.79). Sappiamo che quando il croma tende a diminuire, quindi sono meno saturi e il colore tende al grigio. Come si può osservare una diminuzione del croma, nei campioni pretrattati rispetto al campione controllo. Inoltre, i campioni che non sono stati sottoposti al trattamento di impregnazione (noVI) ma solamente alla scottatura si può notare una tendenza ad avere un croma molto più basso, sia rispetto ai campioni pretrattati che al campione controllo.

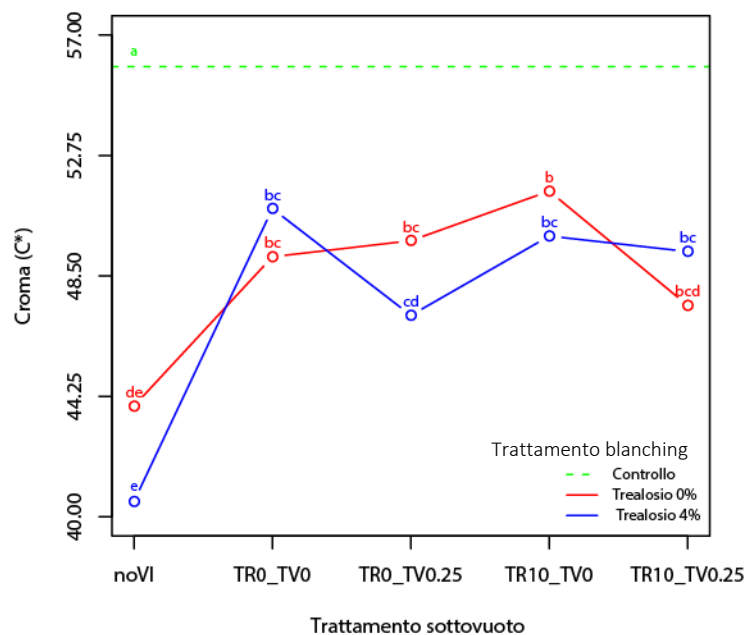


Figura 79 Andamento del Cromo (C*).

In laboratorio è stato osservato un colore arancione generalmente più uniforme e vivido per tutti i campioni sottoposti a pretrattamenti termici.

Sul campione di controllo è stata fatta un'ulteriore analisi, l'attività enzimatica della perossidasi, POD, riportata nella tabella seguente (Fig. 80).

Fattore	Attività POD
	(U gPS ⁻¹)
Tempo	
Inizio disidratazione	311.23
Fine disidratazione	277.61
<i>P</i> value	0.14

Figura 80 Attività enzimatica ne campione controllo.

Come si osserva dalla tabella il campione controllo ha evidenziato, ad inizio del processo di disidratazione, un'attività enzimatica circa pari a 311.23 U/gPS⁻¹, ma si nota una tendenza alla

diminuzione, anche se minima, a fine disidratazione, con un valore circa pari a $277.61 \text{ U/gPS}^{-1}$. Dal precedente lavoro svolto nell'attività 1 (Fig. 81), abbiamo scelto di operare il blanching a 90°C perché in 3 minuti è stata riscontrata una diminuzione dell'attività enzimatica al 10%. Mentre a 95° per 1 minuto e mezzo si riduceva l'attività enzimatica ma il prodotto si degradava eccessivamente.

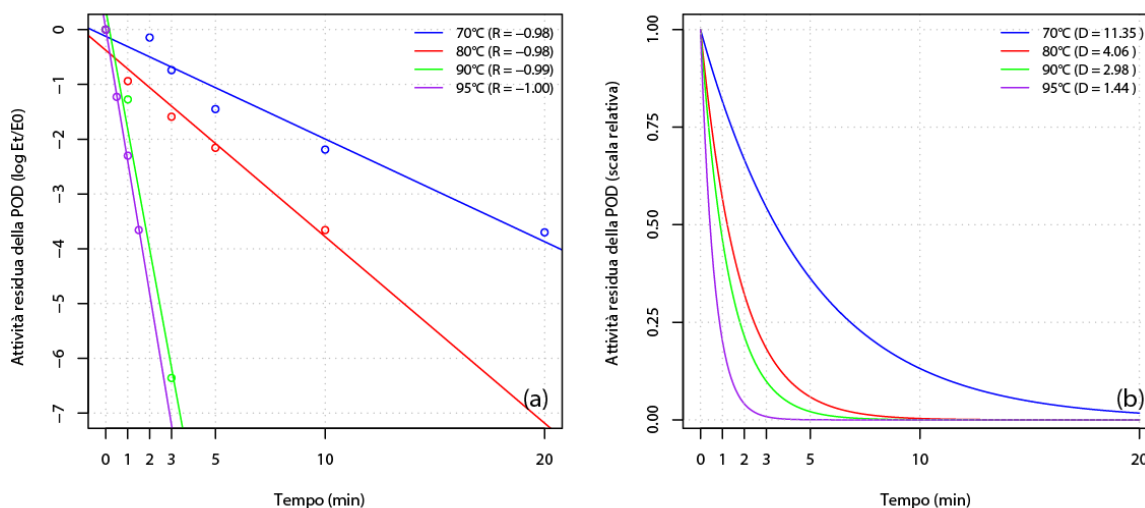


Figura81 Attività enzimatica della POD a diverse temperature.

7.3.2 Effetti dei pretrattamenti sui campioni disidratati

I risultati delle analisi precedentemente illustrate, sono stati riportati nella seguente tabella (Fig. 82), e messi a confronto con il campione controllo.

Fattori	a_w	Reidratazione (%)	SSC (Brix°)	Consistenza (N)	Car. Totali (mg Bcar. gPS ⁻¹)	Fenoli totali (mgAGE gPS ⁻¹)	Colore		
							L*	h	C*
Controllo	0.42	259.95 b	47.99 a	57.30	3.91	0.52	57.08 a	50.92	44.34 b
Blanching (B)									
0% trealosio	0.45	274.04 b	30.11 b	49.11	4.51	0.99	54.12 b	47.50	48.38 a
4% trealosio	0.44	354.88 a	28.02 b	46.00	4.47	0.90	55.12 ab	47.67	46.99 ab
P value	NS	< 0.05	< 0.001	< 0.001	NS	< 0.001	< 0.01	< 0.001	< 0.001
Vacuum (V)									
<i>Trealosio</i> <i>Thé verde</i>									
- -	0.43	300.83	35.51 a	47.69	4.48 ab	0.49	57.49 a	48.54	46.97 b
0.00% 0.00%	0.40	294.04	17.87 b	57.25	5.00 a	0.47	53.48 b	46.10	50.00 a
0.00% 0.25%	0.44	335.19	22.48 b	39.22	5.21 a	2.28	53.75 b	49.53	47.39 ab
10.00% 0.00%	0.45	363.08	41.39 a	41.98	3.59 b	0.27	56.39 a	48.11	47.28 ab
10.00% 0.25%	0.40	279.16	34.34 a	55.69	3.88 b	1.24	51.64 b	46.78	45.47 b
P value	NS	NS	< 0.001	< 0.001	0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
B x V									
P value	NS	NS	NS	< 0.001 *	NS	< 0.05 *	NS	< 0.05 *	NS

* I risultati sono riportati in un grafico

Figura82 Risultati dell'Anova a due vie.

L'attività dell'acqua nei campioni pretrattati, sia con la scottatura che con l'impregnazione sottovuoto, rispetto al controllo rimane invariata, quindi circa pari a 0.43. Per i tempi di disidratazione che abbiamo trattato (dalle 5 alle 7 ore in media), ci troviamo poco sopra la soglia limite di attività dell'acqua (0.40), alla quale corrisponde presenza di attività enzimatica. Questo problema però si risolve attraverso il pretrattamento di blanching. La diminuzione dell'attività dell'acqua negli alimenti riduce in genere la crescita microbica, compresa quella di batteri, muffe, lieviti e alcuni parassiti e virus. Se altri fattori di crescita sono meno che ideali, la riduzione dell'attività dell'acqua aumenta l'inibizione della crescita. La sporulazione sembra verificarsi a un livello di attività dell'acqua inferiore a quello necessario per la crescita, pertanto l'attività dell'acqua può anche influenzare la forma degli organismi e la loro mobilità (Troller, John A., 1980). In uno studio condotto da Anthony J. Fontana, Jr. 2008 si sono osservati i limiti minimi di attività dell'acqua per la crescita di microrganismi, riportati nella tabella sottostante (Fig.83).

a_w	Microrganismi		
	Batteri	Muffe	Lieviti
0.97	Clostridium botulinum E	—	—
	Pseudomonas fluorescens		
0.95	Escherichia coli	—	—
	Clostridium perfringens		
	Salmonella spp.		
	Vibrio cholerae		
0.94	Clostridium botulinum A, B	Stachybotrys atra	—
	Vibrio parahaemolyticus		
0.93	Bacillus cereus	Rhizopus nigricans	
0.92	Listeria monocytogenes		
0.91	Bacillus subtilis		
0.9	Staphylococcus aureus (anaerobio)	Trichothecium roseum	Saccharomyces cerevisiae
0.88			Candida
0.86	Staphylococcus aureus (aerobio)		
0.83		Penicillium expansum	Debaryomyces hansenii
0.82		Aspergillus fumigatus	
		Aspergillus parasiticus	
0.81		Penicillium cyclopium	
		Penicillium patulum	
0.8		Penicillium citrinum	Saccharomyces bailii
0.77		Aspergillus niger	
0.7		Eurotium amstelodami	
0.62			Saccharomyces rouxii

Figura 83 Limiti minimi dell' a_w per la crescita di microorganismi.

Per quanto riguarda l'analisi sulla reidratazione, si osserva che i campioni sottoposti al pretrattamento di scottatura in soluzione di trealosio al 4%, si reidratano meglio (circa pari a 354.88% a) rispetto al campione controllo (circa pari a 295.95% b). Mentre i campioni sottoposti al pretrattamento di scottatura in soluzione di trealosio 0% (circa pari a 274.04% b) risultano statisticamente indistinguibili dal campione controllo. Questo risultato è significativo in quanto la reidratazione di un alimento è un fattore di qualità. Mentre il pretrattamento di impregnazione non

ha effetto sulla reidratazione. Per l'analisi dei solidi solubili totali si può osservare che i campioni sottoposti al pretrattamento di scottatura, rispetto al campione controllo (47.99 °Brix) hanno un quantitativo in solidi solubili totali inferiore (in media 29 °Brix). Così come per i campioni sottoposti anche al pretrattamento di impregnazione sottovuoto in soluzione di trealosio allo 0%, indipendentemente dalla concentrazione nella soluzione di thè verde, dato dal fatto che il pretrattamento di impregnazione impoverisce in solidi solubili. Ciò non avviene per i campioni non sottoposti al pretrattamento di impregnazione sottovuoto e per quelli sottoposti al pretrattamento in soluzione di trealosio al 10%, indipendentemente dall'uso di thè verde. Infatti, anche se il pretrattamento impoverisce il contenuto in solidi solubili totali, grazie all'entrata di trealosio questo effetto viene compensato. Perciò in questi pretrattamenti si ha un arricchimento in solidi solubili totali (in media 37.08 °Brix, il risultato è statisticamente identico al contenuto in solidi solubili totali nel controllo). Questo risultato lo ritroviamo anche nei campioni non disidratati (tempo zero), quindi il bilancio di materia rimane invariato. Per quanto riguarda il contenuto in carotenoidi totali, sia i campioni non sottoposti al pretrattamento di impregnazione sottovuoto che quelli sottoposti in soluzione di 0% trealosio indipendentemente dalla concentrazione del thè verde, notiamo che rispetto al campione controllo (3.91 mg β carotene/g PS), c'è un aumento in carotenoidi totali (in media 5.0 mg β car./g PS). Mentre i campioni scottati sottoposti all'impregnazione sottovuoto in soluzione di 10% trealosio, indipendentemente dalla concentrazione del thè verde, si nota una diminuzione in carotenoidi totali. Questo risultato probabilmente è giustificato dalla presenza di trealosio che al momento delle analisi rende più difficile la loro estrazione, dal momento che i risultati al tempo zero sono differenti ma il contenuto di trealosio era lo stesso. Resta comunque da verificare con ulteriori analisi. Un'ulteriore giustificazione è che, nonostante i campioni pretrattati siano stati setacciati con dei setacci a maglia, le polveri dei campioni contenessero ancora acqua (solvente polare) e durante l'estrazione, effettuata con una miscela di esano/acetone (in rapporto di 7:3) non sono riusciti ad estrarre i carotenoidi. Questo perché l'esano essendo un solvente apolare non si miscela con l'acqua, la quale circondando la massa umida della polvere, la schermava dal contatto con l'esano. Per analizzare il contenuto in fenoli totali, che presenta un'interazione tra il pretrattamento di blanching e pretrattamento vacuum facciamo riferimento al seguente grafico (Fig. 84).

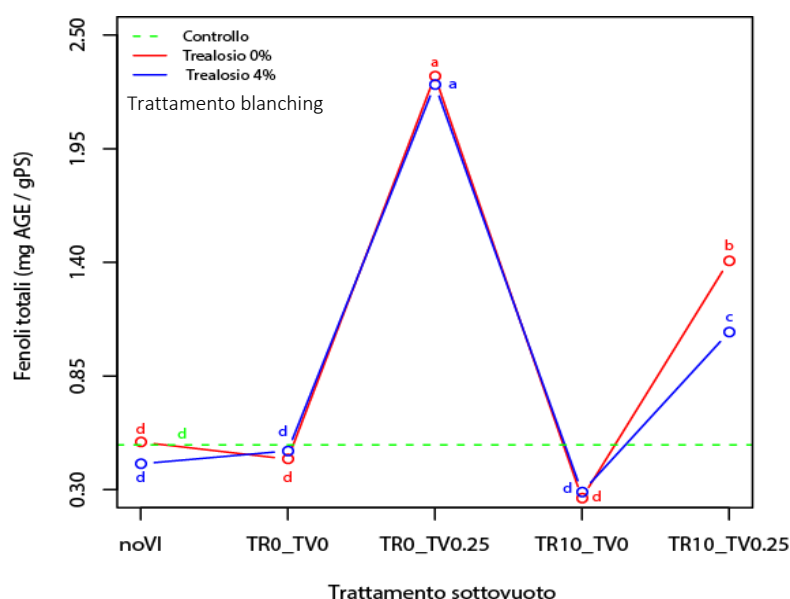


Figura 84 Andamento dei fenoli totali.

Si può osservare che l'utilizzo del tè verde nel pretrattamento di impregnazione arricchisce la matrice vegetale in termini di contenuto di fenoli totali. Infatti, l'impregnazione sottovuoto in soluzione di 0.25% tè verde, indipendentemente dalla concentrazione di trealosio utilizzata, ha un contenuto in fenoli totali maggiore rispetto al campione controllo. Inoltre, si può osservare che il trealosio impedisce l'arricchimento in solidi solubili totali, ma influenza di più se utilizzato nel pretrattamento di blanching piuttosto che nel pretrattamento di impregnazione. Questa considerazione è valida anche per i campioni che hanno subito un'impregnazione in soluzione di trealosio al 10% e 0% tè verde. Infine, i campioni che non hanno subito l'impregnazione sottovuoto e quelli che lo hanno subito in soluzione di 0% trealosio e 0% tè verde, il contenuto in fenoli totali non subisce variazione rispetto al campione controllo. Per analizzare la consistenza, che presenta un'interazione tra il pretrattamento di blanching e trattamento vacuum facciamo riferimento al seguente grafico (Fig. 84). Anche se la metodica è da modificare, si può notare che probabilmente i pretrattamenti di scottatura in soluzione di 0% e 4% trealosio e i pretrattamenti di impregnazione sottovuoto in soluzione allo 0% di trealosio e di tè verde e in soluzione di trealosio al 10% e tè verde allo 0.25% preservano la consistenza dei campioni, statisticamente indistinguibili dal campione controllo. Ciò comunque è da verificare con approfondite analisi.

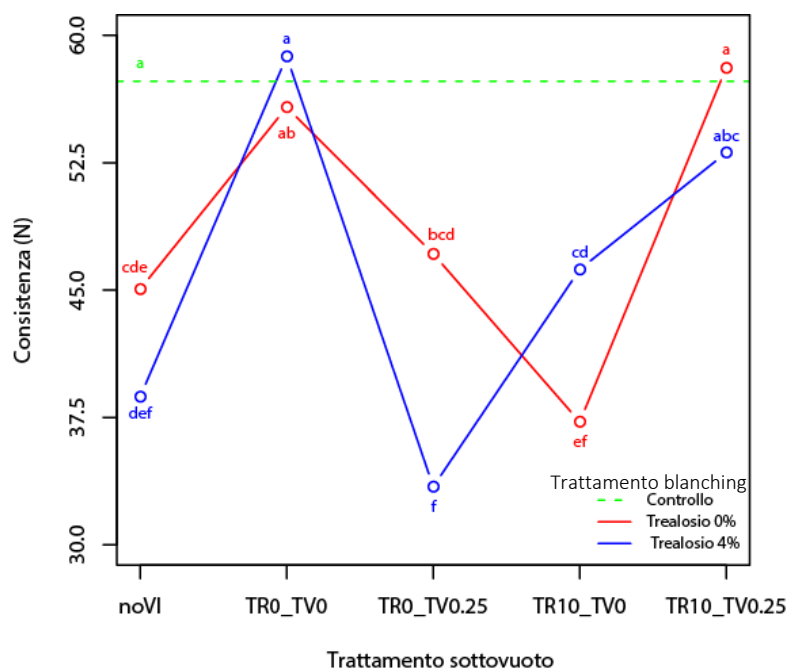


Figura 85 Andamento della consistenza.

Per l'analisi colorimetrica, come è stato fatto sui campioni non disidratati, sono stati analizzati tre parametri specifici: Luminosità (L^*), Angolo di colore (h) e Croma (C^*). Per quanto riguarda il parametro di Luminosità (L^*) i campioni scottati perdono la luminosità dei campioni rispetto al campione controllo anche se il campione scottato in soluzione di trealosio al 4% è statisticamente non differenti. Notiamo infatti che il campione controllo è circa pari a 57.08a L^* , e il campione scottato in soluzione di trealosio al 4% è 55.12ab L^* . Mentre il campione scottato in soluzione di trealosio allo 0% è circa pari a 54.12b L^* , quindi statisticamente differente dal campione controllo ma statisticamente simile al campione scottato in soluzione di trealosio allo 0%. Sui campioni sottoposti a tutti i pretrattamenti di impregnazione sottovuoto si nota una diminuzione di luminosità (in media circa pari a 52.95 L^*), ad eccezione dei campioni sottoposti all'impregnazione sottovuoto in soluzione di trealosio al 10% e i campioni non sottoposti a questo pretrattamento sono statisticamente indistinguibili dal campione controllo (in media circa pari a 56.94 L^*). Relativamente ai valori della tinta (o angolo di colore, h) che presenta un'interazione tra il pretrattamento di blanching e trattamento vacuum facciamo riferimento al seguente grafico (Fig. 86).

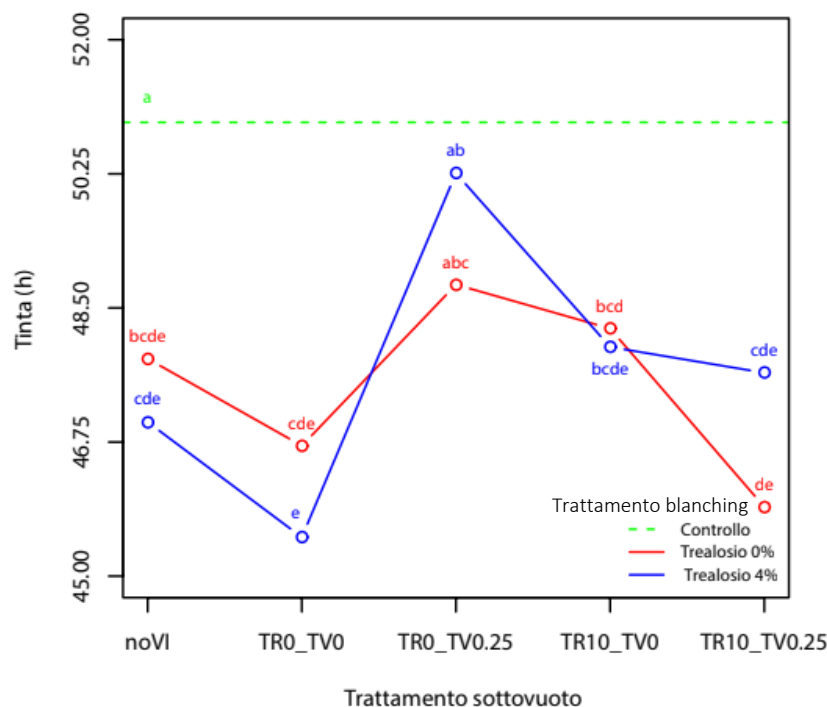


Figura 86 Andamento della tinta (h).

Si può osservare una diminuzione della tinta (o angolo di colore, h) in tutti i campioni pretrattati ad eccezione dei campioni sottoposti al pretrattamento di blanching allo 0% e al 4% di trealosio e di impregnazione sottovuoto in soluzione di 0% trealosio e 0.25% thè verde, che risultano statisticamente non distinti dal campione controllo.

Relativamente ai valori del croma (saturazione, C*) il campione sottoposto a blanching in soluzione di 0% trealosio si nota un aumento del croma con un valore circa pari a 48.38a C* rispetto al campione controllo con un valore circa pari a 44.34b C*. Mentre i campioni sottoposti al blanching in soluzione di 4% trealosio risultano statisticamente indistinguibili dagli altri due valori precedentemente enunciati, circa pari a 46.99ab C*. I campioni non sottoposti al pretrattamento di impregnazione sottovuoto e i campioni sottoposti al pretrattamento in soluzione al 10% trealosio e 0.25% thè verde, risultano statisticamente non distinti dal campione controllo. Quest'ultimo risultato è positivo in quanto si presume che il trealosio funga da barriera protettiva per le cellule durante i trattamenti di disidratazione. Mentre si osserva un aumento del croma nei campioni che hanno subito l'impregnazione sottovuoto in soluzione di trealosio allo 0% e the verde allo 0% (circa pari a 50.00a C*), rispetto al campione controllo. Infine, i campioni che hanno

subito il pretrattamento in soluzione di trealosio allo 0% e thè verde allo 0.25% e in soluzione di 10% trealosio e 0% thè verde (in media circa pari a 47.34ab C*) risultano statisticamente indistinguibili da tutti gli altri campioni.

7.3.3 Effetti dei pretrattamenti sul processo di disidratazione

I risultati dell'analisi precedentemente illustrata, sono stati riportati nella seguente tabella (Figura 87), e messi a confronto con il campione controllo.

Fattori		Tempo (h)	Velocità dis. (gH ₂ O gPS ⁻¹ h ⁻¹)
Controllo		7.64 a	2.23 b
Blanching (B)			
0% trealosio		5.93 b	2.30 a
4% trealosio		5.97 b	2.39 a
<i>P</i> value		< 0.01	<0.01
Vacuum (V)			
<i>Trealosio</i>	<i>Thé verde</i>		
-	-	6.00 ab	2.31 ab
0.00%	0.00%	5.38 b	2.51 a
0.00%	0.25%	5.27 b	2.57 a
10.00%	0.00%	6.44 ab	2.31 ab
10.00%	0.25%	6.67 a	2.04 b
<i>P</i> value		< 0.05	0.06
B x V			
<i>P</i> value		NS	NS

* I risultati sono riportati in un grafico

Figura 87 Risultati Anova a due vie.

I differenti pretrattamenti hanno impattato in maniera differente sulla durata del processo di disidratazione. Laddove è stata impiegata la scottatura delle rondelle, il tempo di disidratazione necessario per raggiungere un'umidità finale pari allo 0.6 g di acqua su g di peso secco, è risultato essere pari in media a circa 5.95b ore, ben inferiore alle 7.64a ore necessarie per le rondelle del campione di controllo. Risultato analogo è stato ottenuto per i campioni sottoposti al pretrattamento di impregnazione sottovuoto in soluzione di 0% trealosio, indipendentemente dalla concentrazione del tè verde, in media pari a circa 5.33b ore. Diversamente, l'impregnazione dei campioni in soluzione di trealosio al 10% e tè verde allo 0.25% ha esteso la durata della disidratazione a 6.67a h, statisticamente non differente dal campione controllo. Infine, i campioni sottoposti all'impregnazione in soluzione di trealosio al 10% e tè verde allo 0% e i campioni non sottoposti a suddetto pretrattamento, non differiscono statisticamente da tutti gli altri campioni, compreso il campione controllo (in media circa pari a 6.22ab ore). Per quanto riguarda la velocità di disidratazione notiamo i prodotti scottati, rispetto al campione controllo (circa pari a 2.23b gH₂O gPS⁻¹ h⁻¹), aumentano la velocità di disidratazione (in media circa pari a 2.35a gH₂O gPS⁻¹ h⁻¹). Possiamo prendere in considerazione anche il fattore vacuum impregnation., infatti, si può osservare statisticamente lo stesso risultato dei campioni scottati anche per i campioni che hanno subito l'impregnazione sottovuoto in assenza di trealosio, indipendentemente dalla concentrazione di tè verde (in media circa pari a 2.54a gH₂O gPS⁻¹ h⁻¹). Diversamente, l'impregnazione dei campioni in soluzione di trealosio al 10% e tè verde allo 0.25% ha ridotto la velocità di disidratazione circa pari a 2.04b gH₂O gPS⁻¹ h⁻¹, statisticamente non differente dal campione controllo. Infine, i campioni sottoposti all'impregnazione in soluzione di trealosio al 10% e tè verde allo 0% e i campioni non sottoposti a suddetto pretrattamento, non differiscono statisticamente da tutti gli altri campioni, compreso il campione controllo (in media circa pari a 2.31ab gH₂O gPS⁻¹ h⁻¹). Il significato di tali risultati è ancora più evidente analizzando l'andamento della perdita di umidità da parte del prodotto in funzione del tempo di disidratazione. Il grafico (Fig. 88 a) mostra chiaramente come l'impiego dei diversi pretrattamenti abbia un effetto considerevole sulla velocità con la quale i campioni perdono acqua. Un ulteriore approfondimento di quanto appena descritto è possibile attraverso il grafico (Fig. 88b), nel quale è rappresentato l'andamento medio della velocità di disidratazione (gH₂O gPS⁻¹ h⁻¹) in funzione del contenuto medio di umidità del campione, per ciascun pre-trattamento.

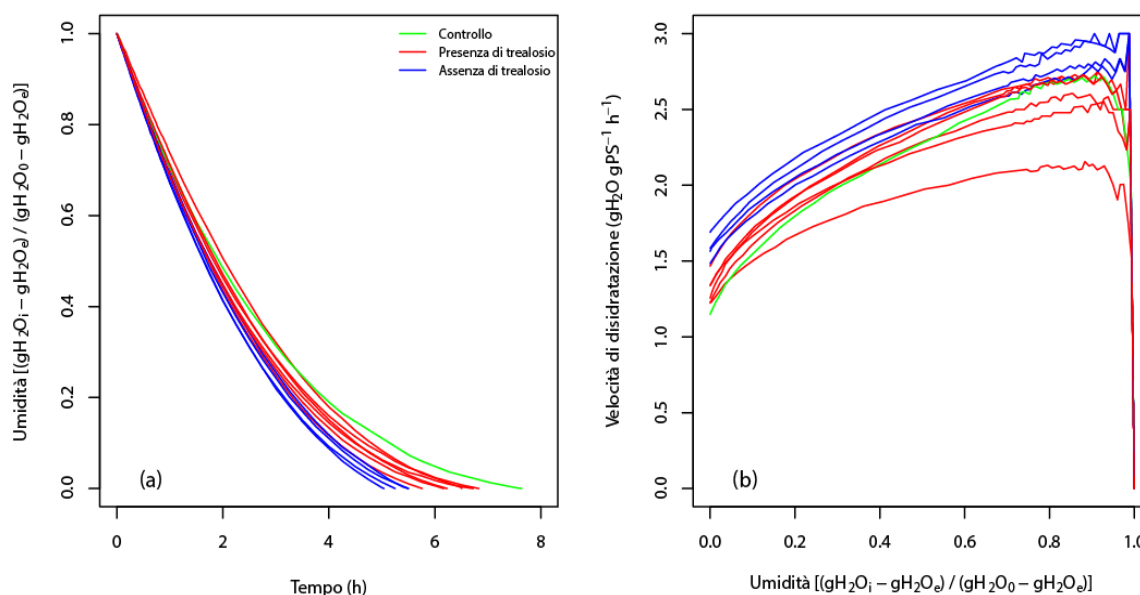


Figura 88 Andamento della perdita di umidità su peso secco in funzione delle ore di disidratazione (a). Andamento della velocità di disidratazione in funzione del contenuto di umidità su sostanza secca (b).

La Fig.88 evidenzia come i pre-trattamenti abbiano influito sull'andamento della velocità di disidratazione. In un primo momento, è possibile notare come la presenza di trealosio nei campioni pretrattati influenzi il processo di disidratazione, sia in termini di velocità che di umidità. Infatti, i campioni pretrattati in assenza del trealosio mostrano un'umidità minore e una velocità di disidratazione più elevata (linee blu dei grafici), mentre in presenza di trealosio si verifica la cosa opposta, dato dal fatto che il trealosio proteggendo le cellule della matrice, fa sì che queste perdano acqua più difficilmente (linee rosse dei grafici).

8.0 Conclusioni

Obiettivo del presente elaborato di tesi è stato l'individuazione di pretrattamenti applicabili su prodotti ortofrutticoli al fine di ridurre la perdita di componenti nutrizionali durante il processo di disidratazione e, al contempo, di ridurre i tempi di permanenza del prodotto durante il processo stesso. Tramite lo studio effettuato, è stato possibile arrivare a definire un prototipo di disidratatore smart. Nel futuro, tale prototipo dovrà essere maggiormente implementato al fine di renderlo fruibile a livello industriale. I risultati e le conclusioni delle singole attività sperimentali condotte durante la ricerca di tesi sono riportati di seguito.

8.1 Attività

Dai dati ottenuti dalle analisi effettuate è stato possibile trarre le seguenti conclusioni. Il blanching in acqua calda si è dimostrato un valido metodo nell'inattivare la POD, combinando tempo e temperatura in maniera tale da non apportare modifiche organolettiche al prodotto trattato; la migliore combinazione è risultata 1.5 minuti a 95°C. Le prove di disidratazione sui campioni di carota sono state effettuate a 40°C per 8 ore. Dall'analisi del contenuto di umidità, acqua libera, solidi solubili totali e carotenoidi non sono state riscontrate evidenti differenze tra controllo (prodotto non sottoposto a nessun pretrattamento) e pretrattamento con blanching, sebbene sia possibile supporre che il prodotto trattato al blanching sia soggetto ad una disidratazione più rapida. Riguardo ai cambiamenti di colore, nel blanching i valori del croma sono risultati più stabili nel tempo rispetto a quelli relativi al controllo. I modelli di regressione, realizzati tramite algoritmo PLS, hanno dimostrato un'ottima performance nel predire i valori di acqua libera, umidità e solidi solubili totali e carotenoidi sia utilizzando lo spettro completo (modello PLS) che un numero ridotto di lunghezze d'onda (modello iPLS). Nella predizione del croma invece, i modelli PLS ed iPLS non sono risultati così efficienti come per gli altri parametri; nonostante mostrino comunque una buona performance. Ciò è spiegabile dal fatto che la spettroscopia NIR non copre il range visibile dello spettro elettromagnetico e di conseguenza la predizione dei cambiamenti di colore è di tipo indiretto. I modelli di classificazione realizzati con algoritmo PLS-DA, hanno dimostrato un'ottima performance nel classificare i tempi di trattamento in 3 classi corrispondenti a 0-2h, 3-5h e 6-8h nel caso del controllo; 0-2h, 3-5h e 6-8h nel caso dei campioni pretrattati al blanching. L'ottima performance è stata riscontrata sia sui modelli ottenuti dallo spettro completo (modello PLS-DA), che sui modelli basati su un minor numero di lunghezze d'onda (modello iPLS-DA). In definitiva, l'impiego della spettroscopia NIR per il controllo dinamico del processo di disidratazione su mela risulta essere fattibile, mostrando ottime performance sia nel monitoraggio quantitativo di specifici parametri che nel riconoscimento delle fasi di disidratazione. La

trasferibilità del metodo risulta essere promettente, poiché l'uso di poche lunghezze d'onda non ha inficiato negativamente sulla capacità predittiva dei modelli. Nonostante ciò, ulteriori indagini saranno necessarie con l'obiettivo di testare la metodica su prodotto soggetto ad altri pretrattamenti ed impiegando ulteriori algoritmi di regressione / classificazione.

8.2 Attività 2

I risultati ottenuti al termine della sperimentazione della seconda attività di ricerca sulle carote *Romance* mostrano che il pretrattamento di scottatura a 70 °C con acido citrico al 2% p/v è la tecnica che ha consentito di preservare in modo migliore le caratteristiche nutrizionali del prodotto testato durante il processo di disidratazione. Inoltre, il pretrattamento di scottatura a 70 °C con acido citrico al 2% p/v si è confermato, al pari del pretrattamento di scottatura a 95 °C, il più idoneo rispetto agli altri a disattivare quasi completamente l'attività enzimatica della perossidasi POD, sin dall'inizio della disidratazione. Per quanto riguarda la velocità di disidratazione, il pretrattamento di scottatura a 70 °C con acido citrico al 2% p/v e quello al 95 °C, hanno dimostrato di essere i più veloci con una media di disidratazione di 6 ore ciascuno, arrivando ad ottenere campioni di carota ad un tenore di umidità pari a 0.7 gH₂O gPS⁻¹ (situazione diversa è invece stata quella dei due pretrattamenti con pectine, con una media di 9.5 ore ciascuno). In merito all'analisi colorimetrica l'acido citrico ha mostrato, a fine disidratazione, valori di Croma (C*), Luminosità (L*) e Indice di bianco (WI) statisticamente non diversi dagli stessi valori ad inizio disidratazione. Per quanto riguarda l'Angolo di colore (h), la scottatura a 70 °C con acido citrico al 2% è stato l'unico pretrattamento che, a fine disidratazione, ha mostrato valori significativamente diversi da quelli iniziali, con una tinta tendente più su toni rossi (aspetto visivo gradito da alcuni consumatori e quindi possibile attributo positivo nella scelta del prodotto).

Dall'analisi del contenuto di carotenoidi e fenoli totali, la scottatura a 70 °C con acido citrico al 2% si è rivelata, al pari del controllo e dell'immersione in pectine al 1%, il pretrattamento migliore con una minor perdita dei componenti qualitativi (carotenoidi e fenoli) durante la disidratazione. Infine, dal confronto tra i modelli possibili da impiegare nella predizione del comportamento del campione durante la disidratazione, è possibile affermare che il modello che consente di ottenere risultati più vicini a quelli reali è il modello Logaritmico.

8.3 Attività 3

I risultati ottenuti al termine della sperimentazione della seconda attività di ricerca sulle carote *Carvejo* hanno mostrato, dalle analisi colorimetriche dei campioni appena pretrattati, una diminuzione della luminosità (L^*); mentre, a fine disidratazione, sia i campioni con impregnazione in soluzione di trealosio che senza, hanno riportato un aumento dei valori di luminosità. Per quanto riguarda i valori della tinta (h), si nota un aumento nei campioni al tempo zero, che viene mantenuto stabile fino alla fine della disidratazione nei campioni che hanno subito pretrattamento con impregnazione in presenza di trealosio e thè verde.

I valori di croma (C^*) nei campioni appena pretrattati subiscono una diminuzione che diventa marcata nei campioni pretrattati in assenza di vacuum impregnation. A fine disidratazione, il croma aumenta sia nei campioni scottati che nei campioni impregnati in assenza di trealosio e quindi si può dedurre che l'assenza di trealosio favorisca un croma più alto; questa considerazione dovrà comunque essere approfondita con ulteriori analisi. Inoltre, i valori di tinta bassi, associati ad alti valori di croma, sono molto apprezzati dai consumatori grazie al colore rosso intenso, tendente al violaceo, che è possibile raggiungere. Relativamente al contenuto di umidità espresso su sostanza secca, i risultati della sperimentazione mostrano che effettuare il blanching aumenta il contenuto in acqua nel tessuto vegetale, così come anche l'utilizzo della impregnazione sottovuoto in assenza di trealosio. Dall'analisi della velocità di disidratazione, si nota, invece, che i campioni scottati e sottoposti a vacuum impregnation in assenza di trealosio, hanno una velocità di disidratazione maggiore, nonostante abbiano al tempo zero un'umidità maggiore. I campioni pretrattati sottoposti all'impregnazione sottovuoto in soluzione di trealosio, indipendentemente dalla concentrazione del thè verde mostrano una velocità di disidratazione più lenta. Come si può dedurre, il trealosio impiegato nell'impregnazione sottovuoto ostacola il processo di disidratazione, perché nonostante i campioni abbiano un'umidità più bassa al tempo zero il processo di disidratazione è più lungo. Per quanto riguarda l'analisi della consistenza, i campioni pretrattati al tempo zero tendono ad un rammollimento. A fine disidratazione, i campioni scottati che sono stati pretrattati con l'impregnazione sottovuoto, in presenza di thè verde e indipendentemente da quella del trealosio, mostrano che la consistenza viene preservata. Il trattamento termico di blanching a 90 °C, sia con trealosio che non, si è dimostrato un valido metodo per inattivare la POD. I pretrattamenti nei campioni al tempo zero non hanno effetti sul contenuto in acqua libera. Mentre, a fine disidratazione in tutti i campioni pretrattati si ha una riduzione. Il contenuto in solidi solubili totali tende a diminuire nelle condizioni di trattamento in cui non è stato utilizzato trealosio nella soluzione di impregnazione. In altre parole, ciò significa che i trattamenti di scottatura ed impregnazione sottovuoto tendono a impoverire il tessuto di soluti

quando vengono applicati. A fine disidratazione nei campioni scottati c'è un impoverimento del contenuto in solidi solubili totali, così come per i campioni che sono stati sottoposti al pretrattamento di impregnazione sottovuoto in assenza di trealosio. Il contenuto in fenoli totali aumenta sia nei campioni che hanno subito il blanching che nei campioni che hanno subito l'impregnazione sottovuoto in presenza di tè verde. Per quanto riguarda i campioni pretrattati disidratati riscontriamo che gli stessi pretrattamenti portano ad una maggiore capacità di estrazione dei fenoli presenti nel prodotto. I risultati ottenuti hanno mostrato che i pretrattamenti, nei campioni non disidratati, non sono andati a modificare il contenuto in carotenoidi totali. Nei campioni disidratati sottoposti all'impregnazione sottovuoto in presenza di trealosio si nota una minore concentrazione del contenuto in carotenoidi totali. Per quanto riguarda l'analisi della reidratazione, a fine disidratazione, si nota che la presenza di trealosio durante il blanching migliora la reidratabilità dei campioni.

9.0 Pubblicazioni prodotte

9.1 Real-Time Monitoring of organic carrot (var. Romance) during hot-air drying using Near-Infrared Spectroscopy

Roberto Moschetti¹ & Ron P. Haff² & Serena Ferri¹ & Flavio Raponi¹ & Danilo Monarca³ & Peishih Liang² & Riccardo Massantini¹

Food Bioprocess Technol
DOI 10.1007/s11947-017-1975-3



1Department for Innovation in Biological, Agro-food and Forest system, University of Tuscia, Via S. Camillo de Lellis snc, 01100 Viterbo, Italy

2United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Western Regional Research Center, 800 Buchanan St, Albany, CA 94710, USA

3 Department of Agricultural and Forestry Sciences, University of Tuscia, Via S. Camillo de Lellis snc, 01100 Viterbo, Italy

Abstract

The worldwide consumption of dried carrot (*Daucus carota* L.) is on a growing trend. Conventional methods for drying carrots include hot-water blanching followed by hot-air drying, which is usually uncontrolled and therefore prone to product quality deterioration. Thus, there is a need for innovative drying systems that yield highvalue end products. In this study, the efficacy of NIR spectroscopy for the non-destructive monitoring of physicochemical changes and drying behaviour in organic carrot slices during 8-h hot-air drying at 40 °C was demonstrated using Partial least squares (PLS) regression and PLS discriminant analysis (PLS-DA). The impact of hot-water blanching pre-treatment (at 95 °C for 1.45 min) for enzyme inactivation on performances of both regression and classification models was also evaluated. PLS regression models were successfully developed to monitor changes in water activity ($R^2 = 0.91\text{--}0.96$), moisture content ($R^2 = 0.97\text{--}0.98$), total carotenoids content ($R^2 = 0.92\text{--}0.96$), lightness for unblanched carrots ($R^2 = 0.80\text{--}0.83$) and hue angle for blanched samples ($R^2 = 0.85\text{--}0.87$). Soluble solids content prediction was poor for both treatments (RMSEP = 3.43–4.40). Classification models were developed to recognise dehydration phases of carrot slices on the basis of their NIR spectral profile using K-means and PLS-DA algorithms in sequence. The performance of each PLS-DA model was defined based on its accuracy, sensitivity and specificity rates. All of the selected models provided from good (> 0.85) to excellent (> 0.95) sensitivity and specificity for the predefined drying phases. Feature selection procedures yielded both regression and classification models with performances very similar to models computed from the full spectrum.

Keywords *Daucus carota* L. Smart drying. Carrot slices. Convective air drying. Chemometrics. Feature selection.

Introduction

Market globalization ensures constant availability of many horticultural products regardless of their harvest date. Innovation in both products and processes across the entire agri-food chain yield fruit and vegetables with improved shelf-life, organoleptic quality, nutritional value, safety and healthfulness. Consequently, preservation methods that enhance food stability by delaying physicochemical, biochemical and microbiological spoilage impact the market value of perishable commodities (Aghbashlo et al. 2015). In fact, preservation method directly affects processing, storage, transportation and distribution costs. Drying is an effective and viable preservation process and is among the oldest and most widespread of all postharvest operations. Drying significantly extends the shelf-life and nutritional quality of fruit, vegetables, spices and herbs as well as meat and fish. The drying process consists of three main interlinked steps that can be summarized as follows: (1) product formulation or treatment selection, (2) dehydration process and (3) quality and properties assessment (Aghbashlo et al. 2015). In the absence of sufficient moisture, microorganisms grow slowly and moisture-mediated reactions responsible for undesirable chemical changes do not function properly (Mayor and Sereno 2004; Demirhan and Özbek 2009). Beyond extending shelf life, drying can substantially reduce storage and shipping costs by enabling storage at room temperature and reducing weight and packaging volume (Liu et al. 2016; Grabowski et al. 2003).

Drying technology varies from simple methods such as sun drying to more sophisticated techniques such as instant controlled pressure drop drying. Surprisingly, modern drying technology does not always produce the highest commodity quality or value. Drying is a relatively complex, dynamic, unsteady and nonlinear process that is affected by the properties of the wet material, the scale of production and compliance with regulations (e.g. European Organic Regulation), as well as operating and environmental conditions (Aghbashlo et al. 2015). Such factors can impact quality traits including colour, texture, size and shape as well as organoleptic, nutritional and functional properties and thus result in reduced consumer acceptance (Brosnan and Sun 2004; Vega-Gálvez et al. 2012). Drying is one of the most energy-intensive processes in the food industry (Akpınar et al. 2003) and potentially contributes to climate change as most dryers use fossil fuels (Mujumdar 2012).

In order to alleviate these issues, the goal of new drying technologies should be to simultaneously maintain product quality and value, maximize drying rate and minimize environmental impact

(Mujumdar 2012; Su et al. 2015). BSmart drying[^], one of the newest and most promising of emerging drying techniques, involves the use of sensors, tools (e.g. emerging non-destructive technologies) and practices (e.g. monitor and control of quality and drying parameters and/or the conditions of the dryer, etc.) for enhancing drying efficiency. Moreover, smart drying can be cost-effective in both realtime monitoring of food quality and dynamic controlling of operating conditions through the entire drying process. Smart drying is a multi- and inter-disciplinary sector and its recent developments embrace the following R&D areas: artificial intelligence (Aghbashlo et al. 2015), biomimetic (GhasemiVarnamkhasti et al. 2010), computer vision (Brosnan and Sun 2004), microwave/dielectric spectroscopy (Jha et al. 2011), hyper-/multispectral imaging (ElMasry and Sun 2010), magnetic resonance imaging (Clarka et al. 1997; Su et al. 2014), ultrasound imaging (Awad et al. 2012), electrostatic sensing (Chen et al. 2013) and control systems for the drying environment. In addition, visible (Vis) and nearinfrared (NIR) spectroscopy are techniques with potential applications in smart drying in terms of monitoring quality attributes (Nicolai et al. 2007). Furthermore, NIR spectroscopy is a proven on-/in-line tool with high sensitivity to changes in moisture content, particle size and the chemical state of food (Ozaki et al. 2006).

Carrot (*Daucus carota* L.) is one of the most nutritious root crops because of its high vitamin, β -carotene and fibre content (Demiray and Tulek 2014). Dried carrot is an important raw material for the production of ready-to-eat meals such as instant powdered soups, sauces, spices and seasonings (Sánchez-Sáenz et al. 2015), which have become popular in the diet of modern consumers (Yi et al. 2015) in parallel with the human consumption of organic products (FAO 2011). Although carrot quality may be negatively impacted at high temperatures (Demiray and Tulek 2014), it is often blanched in hot-water and then dried using hot-air with the potential for subsequent loss of quality. Beyond quality degradation, conventional uncontrolled methods such as hot-air drying or freeze-drying are associated with a number of drawbacks, such as very long drying time and high energy demand (Mujumdar 2012). Thus, while proper selection of postharvest treatments both before and after carrot drying is critical, careful consideration and monitoring of appropriate drying techniques is also a crucial factor to obtain a high-value end product (Negi and Kumar Roy 2001).

The European Organic Regulation on production and labelling of organic products (i.e. EC No. 834/2007 and EC No. 889/2008) prohibits certain conventional drying treatments for organically grown carrots (e.g. use of restricted chemicals and microwave blanching). In this case, smart drying technologies have the potential to optimize allowed drying processes to obtain comparable results to conventional methods.

While research into carrot drying has been widely reported, little insight is available on smart drying technology applied to carrots, and research of its potential use in the organic sector is totally lacking. Therefore, the objective of this study was to demonstrate the use of near-infrared (NIR) spectroscopy as a smart drying technology that can non-destructively detect and monitor quality changes in organic carrot slices, blanched and not blanched, during hot-air drying.

Materials and methods

Sample preparation

Organic carrots (*Daucus carota* L., var. Romance) were purchased from a local organic trader (Biobox srl, Viterbo, Italy) and immediately stored at 4 ± 1 °C until processing. Sampling was performed by selecting sound carrots with uniform size and thus the same ripening stage. Roots were tempered to room temperature for 15 h before use. The batches were standardized by selecting carrots with a length of 18–20 cm and diameter of 1.5–2 cm. Carrot slices, without core and peel, were prepared by washing and cutting the root into slices (5 mm thick) using a sharp ceramic knife. Samples were visually evaluated and only carrot slices free of decay and/or blemishes were selected for hot-air drying tests. Samples were divided into two groups, one of which was subjected to a hot water blanching pre-treatment at 95 °C for 1.45 min before hot-air drying and one that was dried without pre-treatment. Determination of appropriate blanching time and temperature is described in detail below.

Two hundred seventy carrot slices for each treatment were randomly arranged into 9 batches of 30 samples for the use in drying experiment. Then, carrot slices were subjected to 8-h hot-air drying and batch sampling was performed at 0-, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- and 8-h drying. Each batch was subjected to both NIR spectral data acquisition and determination of CIELab colour, moisture content (wet basis), water activity (a_w), soluble solids content and total carotenoid content.

Hot-Water Blanching Pre-treatment

Hot-water blanching consisted of dipping carrot slices in hot water using a temperature-controlled water bath (Astor 800D, Astori Tecnica, Brescia, Italy). As a control (i.e. unblanched treatment), carrot slices were dipped in distilled water at room temperature.

Determination of Blanching Parameters Based on Peroxidase Activity

The experimental plan is reported in Table 1. Treated samples were immediately cooled for 3 min in ice-water, and the residual peroxidase (POD) enzymatic activity was evaluated.

Enzyme Extraction

Enzyme purification was carried out on the basis of the method of Massantini et al. (2009) with some modifications. Carrot slices were collected after each blanching treatment, frozen with liquid nitrogen and then immediately ground into frozen powder using an analytic mill (IKA A11 basic; IKA

Labortechnik, Staufen, Germany). Three grams of carrot powder were homogenized with 15 mL of chilled phosphate buffer solution (PBS, 0.1 mol L⁻¹, pH 6.5) containing 3% (w/v) of polyvinylpolypyrrolidone. The mixture was centrifuged at 13,800×g for 20 min at 4 °C and the supernatant was used in the experimentation.

Enzyme Activity Measurement

POD activity was measured following the method of Moschetti et al. (2012) with slight modifications. The assay was performed using an UV-Vis scanning spectrophotometer (Lambda 25; PerkinElmer, MA, USA). Changes in the absorbance at 460 nm were monitored for 3 min upon oxidation of the substrates catalysed by the enzyme. Guaiacol (SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA) was used as substrate. The final reaction mixture contained 1 mL of crude enzyme, 1 mL of PBS (0.1 mol L⁻¹, pH 6.5), 1 mL of guaiacol (0.25% v/v) and 0.01 mL of hydrogen peroxide (0.75% v/v). One unit of enzyme activity (1 UEA) was defined as an increase in absorbance of 0.001 min⁻¹. Enzyme activity was measured in triplicate.

Table 1 Experimental design for the hot-water blanching treatment

Temp. (°C)	Time (min)									
	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	5.0	10.0	20.0	
70	✓	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓
80	✓	✗	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓
90	✓	✗	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✗	✗
95	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗

Enzyme Thermal Inactivation

The rate constant for first-order inactivation (k) was computed from the slope of the linear regression of the natural log of residual activity versus time of thermal treatment, according to Eq. 1

$$\ln \frac{E_t}{E_0} = -kt$$

where E_0 is the initial enzyme activity (UEA), E_t is the activity after heating for time t (UEA), t is the time of heating (min) and k is the inactivation rate constant (min^{-1}). The regression coefficient (R) of each regression line was also computed.

A POD inactivation of 90% was fixed as a threshold in order to consider the produce stable for the industrial requirements (Benlloch-Tinoco et al. 2013). Consequently, inactivation time was computed as D - value (or decimal reduction time) as treatment time required to reduce the enzyme activity to at least 0.1 (i.e. 10% of its original value), according to Eq. 2.

$$E_t = E_0 \cdot 10^{-t/D}$$

Hot-Air Dehydration Process

The hot-air drying experiment was performed in a 5-tray dryer (Biosec, Tauro Essicatori srl, Vicenza, Italy). The dryer consisted of a temperature controller and a centrifugal fan that was used to blow air into the heating unit through a 15-cm duct. The air flow was parallel to the drying surface of the carrot slice. The dehydration process was conducted at 40 °C for 8 h on the basis of screening results obtained from tests conducted in the range from 40 to 60 °C. Drying tests at temperatures higher than 40 °C were discarded due to an excessive case hardening effect and the development of a very compact structure. The investigation is in agreement with Xiao et al. (2010).

Near-Infrared Spectroscopy

Spectral Acquisition

Diffuse reflectance spectra were acquired using a Luminar 5030 Acousto-Optic Tunable Filter-Near Infrared (AOTFNIR) Miniature ‘Hand-held’ Analyzer coupled with the bundled ‘SNAP!

2.04' software (Brimrose Corp., Baltimore, USA). The instrument was equipped with a reflectance post-dispersive optical configuration, a pre-aligned dual beam lamp assembly and an indium gallium arsenide (InGaAs) array (range 1100–2300 nm, 2-nm resolution) with an integrating time of 60 msec. The reference spectrum was automatically measured by the instrument following the method used by (Moscetti et al. 2015). Each sample was measured in duplicate on two opposite sides of each carrot slice (i.e. four spectra per sample). Reflectance spectra were converted to absorbance ($A = \log R^{-1}$) and the average spectrum was used for further computations.

Spectral Pre-treatments

Each carrot slice was modelled as a 'data vector', where the spectral absorbance values (otherwise called features) were vector components. Chemometric analysis was performed following spectral pre-treatments including Standard Normal Variate (SNV), Multiplicative Scatter Correction (MSC), and Savitzky-Golay first and second derivatives (D1f and D2f, respectively) with a second or third order polynomial fitted over a window of five (S5), seven (S7), nine (S9) or 11 (S11) features (Savitzky and Golay 1964; Boysworth and Booksh 2008). For each dataset, Mean Centering (MC) was also tested as spectral pre-treatment. Every possible combination of preprocessing was also tested and only best results, in terms of model performances, were retained.

Prediction of Chemical and Physicochemical Changes (Regression Models Development)

Regression models were computed using the partial least squares (PLS) regression through the SIMPLS algorithm (de Jong 1993). PLS is a regression technique used to find useful linear combinations of the original independent variables, thus discarding irrelevant and unstable information, solving any problems with collinearity and, finally, obtaining a more stable regression. In addition, the Interval PLS (iPLS) algorithm was also used to select a subset of wavelengths which could achieve superior prediction compared to PLS models based on all features dataset (Xing et al. 2008). The iPLS algorithm was configured in stepwise forward mode for the selection of a maximum of 10 wavelengths.

As PLS and iPLS regressions perform a dimensionality reduction, it is essential to test each model and select the correct number of latent variables to find the optimal tradeoff between under-fitting and over-fitting. Thus, the samples were randomly split as follows: 75 and 25% of the samples were assigned to the calibration set (C) and the prediction set (P), respectively. Every PLS and iPLS model was optimized by computing a venetian blinds cross-validation with 10 data splits. This cross-validation method was preferred because it is simple and easy to implement, relatively

fast, generally safe and capable of providing a better representation when the dataset contains many samples, as is the case here (Naes et al. 2004; Wise 2009). Root mean square error for calibration, cross-validation and prediction calculations (RMSEC, RMSECV and RMSEP, respectively) were employed to evaluate each regression model with the purpose of selecting the optimal number of latent variables and thus circumvent unrealistic results (Moscetti et al. 2015). Model performances were also evaluated in terms of BIAS and coefficient of determination (R^2). PLS and iPLS models were both computed to predict changes in chemical and physicochemical attributes during 8-h dehydration process.

Prediction of the Drying Phases (Classification Models Development)

Classification models were developed using K-means and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) algorithms in sequence (Fig. 1). As the initial step, K-means was employed to determine the number of drying phases (i.e. classes) and to label each sample as belonging to a specific class on the basis of the observed changes in moisture content, water activity, CIELab colour and soluble solids content. K-means is a partitional clustering method belonging to the group of the unsupervised hierarchical cluster analyses. The selection of the most appropriate cluster solution was performed by computing both actual and random sum of square errors (SSE) for a maximum of nine clusters (i.e. nine times of dehydration). Random SSEs were computed from 300 randomized versions of the original dataset. To determine the optimal cluster level, the scree plots of both (1) the actual SSE versus the cluster solutions and (2) the difference between the actual and random SSEs against the cluster solutions were investigated. The best cluster level was chosen as solution at which the plot of the actual SSE versus clusters produced an ‘elbow’ and the actual SSE differed the most from the average of the random SSEs.

As a final step, the identified class membership was used as the response variable (Y) for the development of PLS-DA models in which the predictor variables (X) were spectral profiles. Thus, PLS-DA was used to assign each carrot slice to a specific dehydration phase on the basis of its spectral profile. Moreover, the interval PLS-DA (iPLS-DA) algorithm was used to identify and test a maximum of 10 features.

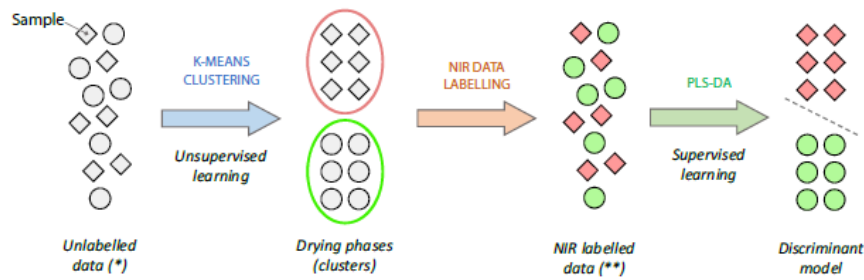


Fig. 1 Flowchart of the development of classification model for drying phases detection using K-means clustering (unsupervised learning) paired to PLS-DA algorithm (supervised learning). (*) Unlabelled data corresponds to changes in water activity, moisture, colour and soluble solids

content values collected during 8-h drying. (**) NIR labelled data corresponds to spectral data (X) acquired during 8-h drying and paired to class membership (i.e. response variable, Y) becoming from K-means

As in the PLS regression model, the RMSE analysis was performed to select the optimal number of latent variables also for both PLS-DA and iPLS-DA classification models (Goodarzi et al 2013). The classification performance of each PLS-DA and iPLS-DA model was determined in terms of sensitivity (Eq. 3), selectivity (Eq. 4) and accuracy (Eq. 5) rates (Dejaegher et al. 2011). The accuracy rate was used to mainly select models in terms of predictivity, while sensitivity and specificity rates were jointly employed to perform a model sub selection in terms of robustness (i.e. the capability of the model to resist to small changes in test conditions).

$$\text{Sensitivity rate} = \frac{\text{True positives}}{\text{True positives} + \text{false negatives}} \quad (3)$$

$$\text{Selectivity rate} = \frac{\text{True negatives}}{\text{False positives} + \text{true negatives}} \quad (4)$$

$$\text{Accuracy rate} = \frac{\text{True positives} + \text{true negatives}}{\text{Total positives} + \text{total negatives}} \quad (5)$$

As previously described for the development of regression models, the dataset was randomly split in calibration and prediction sets (75 and 25% of samples, respectively) and every PLS-DA model was optimized by computing a venetian blinds cross-validation with 10 data splits.

Chemical and Physicochemical Attributes

Both chemical and physicochemical attributes were measured immediately after the NIR spectral acquisitions. Carrot slice colour was measured with a spectrophotometer (CM-2600d, Konica Minolta, Osaka, Japan) with CIE Standard Illuminant D65 (daylight), observer 10° and 6-mm

diameter of measurement aperture mode. Four replications were performed for each sample by performing two colour measurements on two opposite sides of each carrot disc. The results were expressed according to the CIELab colour space and thus in terms of lightness (L^*), redness (a^*), yellowness (b^*), hue angle (h) and chroma (C^*) (Moscetti et al. 2013).

Moisture content was measured following the official method ‘Moisture in Dried Fruits’—AOAC 934.06 and was expressed as a percentage by mass (grams per 100 g) (Horwitz 2005). Water activity (a_w) was determined with an Aqua Lab (3TE, Decagon Devices Inc., WA, USA). Soluble solids content (SSC) was measured with a digital refractometer mod. WM-7 (Atago, Tokyo, Japan) by following the method of Lavelli and Kerr (2012) with slight modifications. The vortexed and centrifuged extract of 350 mg of freeze-dried sample with 10 mL of distilled water was measured. Results were then converted on a fresh weight basis and expressed as °Brix (grams of sucrose per 100 g of fresh product). Carotenoids were extracted by incubating 500 mg of freeze -dried carrot tissues in 10 mL of 2:1:1 hexane, acetone and ethanol mixture for 24 h at room temperature in darkness. The total carotenoid content was determined by measuring absorbance at wavelength of 450 nm, using the Eq. 6 (Scott 2001).

$$\mu\text{g carotenoid mL}^{-1} = \frac{A \times V_1}{A^{1\%}} \times C^{1\%} \quad (6)$$

where A is the absorbance reading of the sample, V_1 is the dilution factor, $A^{1\%}$ is the extinction coefficient of the 1% solution (i.e. 2500 AU) and $C^{1\%}$ is the concentration of the 1% solution (10 mg mL⁻¹). The total carotenoid content was converted in microgram per gram of fresh tissue. Analyses were performed in triplicate.

Data Handling and Data Mining

One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to evaluate statistical differences among the drying times. The Tukey’s pairwise comparison method was performed, and the honestly significant difference (HSD) was calculated for an appropriate level of interaction ($P \leq 0.05$) (Montgomery 2001). Results were reported as the mean and deviation standard of the mean. Before statistical analysis, results relative to moisture content were subjected to angular transformation (i.e. $y = \arcsin [x]^{1/2}$) to homogenize the variance (Bartlett’s test) (Gomez and Gomez 1984). The data reported were back transformed. Data handling and ANOVA were both performed using R v3.3.3 software in combination with ‘dplyr’ v0.5.0 and ‘agricolae’ v1.2-4 R-packages (CRAN

2017). Chemometrics was performed using Matlab software R2015a coupled with PLS_Toolbox software v8.1 (Eigenvector Research Inc., WA, USA).

Results and Discussion

In the present work, the carrot drying process was monitored using NIR spectroscopy. NIR-based regression and classification models were computed and the impact of the hot-water pre-treatment as enzyme inactivator on model performance was also investigated.

Thermal Pre-treatment Selection

The effect of thermal treatment on carrot slices was evaluated for hot-water blanching over the pre-established range of temperature (Table 1). To monitor the thermal treatment, peroxidase was used as indicator enzyme due to its higher thermal stability and easiness in being assayed. In fact, the POD inactivation allows the reasonable assumption that other quality deteriorative enzymes (e.g. pectinesterase and lipoxygenase) are also inactivated (Sergio et al. 2007).

Inactivation kinetics was determined through semi-log plot of residual POD activity versus time. Results showed excellent linear fits ($R = -0.98 \div -1.00$) at all temperatures studied, consistent with inactivation occurring by first-order kinetics (Fig. 2). Although all treatments reached the inactivation threshold (decimal reduction, 90%), considerably faster reductions in POD activity were only achieved at 90 and 95 °C. In fact, both hot-water blanching at 80 and 90 °C were less effective, showing slowest inactivation rate constants (k) (0.20 and 0.57 min^{-1} , respectively) in comparison with 90 and 95 °C (0.77 and 1.60 min^{-1} , respectively). Moreover, hot water blanching at 90 and 95 °C led to more vivid and pleasant color (data not shown). Similar results were reported by Sims et al. (1993) and Bao and Chang (1994), which observed greater hue angle and chroma, and thus better color than those from unblanched carrots. The color of carrots is deeply affected by the presence of α - and β -carotenes, which are known to be relatively heat stable at combination of temperature and time used in our experiments (Behnsnilian and MayerMiebach 2017). In fact, carotenoids degradation and isomerization into cis-isomers are responsible for loss of vivid colour and a shift from orange to more red colour (Howard et al. 1996), which is not our case.

Finally, the lowest decimal reduction time (D) among treatments was achieved by using hot-water blanching at 95 °C for 1.44 min of dipping. Thus, considering that the evaluation of the effects of treatment on nutritional value of product was not part of the present study, hot-water blanching at

95 °C for approx. 1.45 min was selected as the most adequate treatment to obtain colour-stable carrot slices to use further in the experimentation.

Spectral Data Overview

Figure 3 depicts the resulting mean relative absorbance spectra obtained from the AOTF-NIR spectrophotometer in the 1100–2300-nm spectral range. Figure 3a, b provides information about spectral differences between treatments (i.e. control and blanching treatments, respectively) and among drying times. Changes in the spectral profiles during the drying process were evident to the naked eye for both control and blanching treatments. In fact, it should be noted that drying time heavily affected the spectral characteristics in the water absorption bands (1450 and 1940 nm) (Saeys et al. 2008) and, more generally, in the higher wavelength region (1900– 2300 nm), which is notably associated with carbohydrates, sugars and proteins (Ambrose et al. 2016). On the other hand, blanched samples apparently showed more changes in spectral shape during the drying process and pronounced shoulders on either side of the two principal water absorption bands (1450 and 1940 nm). These results suggest that the differences in spectral profile should be mainly due to both water loss and changes in forward scattering and backscattering by flesh tissue as a consequence of the blanching treatment.

Chemical and Physicochemical Changes During Drying

Table 2 summarizes changes in chemical and physicochemical parameters on blanched and unblanched (i.e. control) carrot slices subjected to 8-h drying. ANOVA indicates a significant effect of drying time on each quality parameter. Moisture content and water activity gradually decreased during drying time, while both SSC and total carotenoids content increased due to decline in water content. Results were perfectly in agreement with those of other authors (Suvarnakuta et al. 2005; Lavelli et al. 2007; Markowski and Zielińska 2011).

However, different drying behaviours between treatments were noted. In fact, blanched samples showed a faster decrease in moisture content during drying and a lower experimental variability for SSC, lightness and hue angle. The data also revealed that the colour of blanched carrot slices was significantly different from the untreated slices. Hot-water blanching entailed a lower initial (0-h drying) and final (8-h drying) lightness (L^*) as well as a higher initial and lower final hue angle (h). Thus, hot-water blanching better retained the colour due to reduction in white blush. However, the variation in L^* value was not totally clear, similar to results reported by Krokida et

al. (1998, 2001). Moreover, increased drying time was found to decrease hue angle (h) when the hot-water blanching was applied. The chemical and physicochemical features of 270 carrot slices per treatment were clustered using the K-means algorithm. A cluster analysis was performed in each treatment group. On the basis of the results obtained, the optimal cluster level was identified as three and thus samples were split into three main classes (also named ‘Drying phase I’, ‘Drying phase II’ and ‘Drying phase III’), each one characterized by a specific drying period (Table 2). Results showed that the duration of drying phases did not differ between treatments. In fact, both treatments were characterized by the ‘Drying phase I’ starting from 0 to 2 h of drying, the ‘Drying phase II’ starting from 3 to 5 h of drying and the ‘Drying phase III’ from 6 to 8 h of drying.

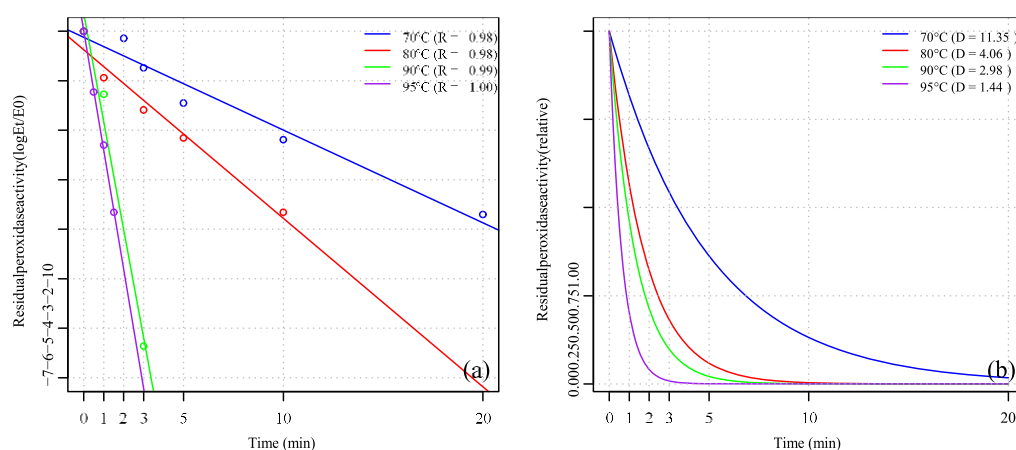


Fig. 2 Semi-log (a) and non-linear (b) first-order plots for carrot slices' peroxidase heat-inactivation at 70, 80, 90 and 95 °C. D- value states for decimal reduction time, which is the treatment time required to reduce the residual peroxidase activity to at least 0.1

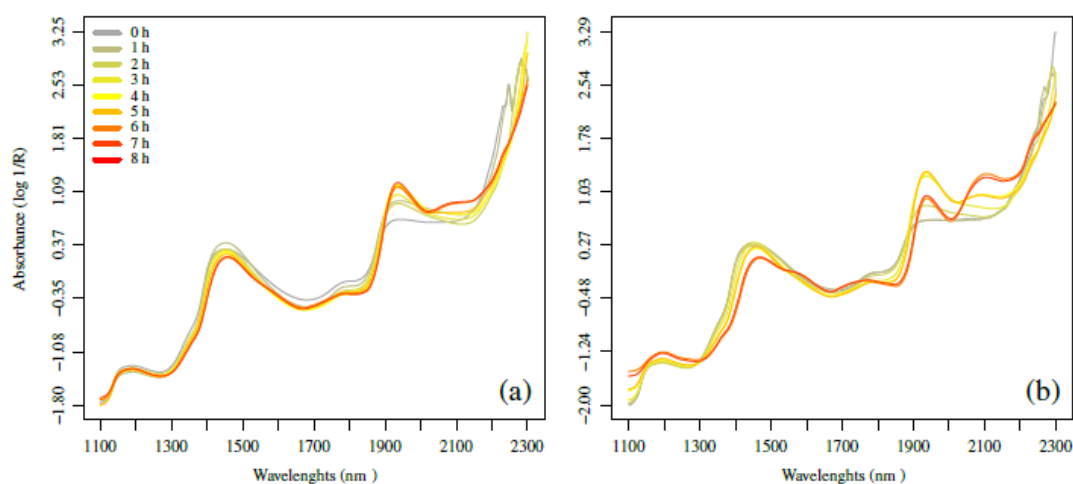


Fig. 3 Mean relative absorbance spectra for control (a) and hot-water blanching (b) treatments at different drying times (i.e. from 0- to 8-h drying with step of 1-h drying)

Table 2 Main effect of drying time on the chemical and physicochemical quality parameters of carrot slices. Mean values with no common letters are statistically different according to HSD ($p \leq 0.05$). Drying times were clustered in drying phases (i.e. I, II and III) according to the results obtained from the K-means cluster analysis

Treatment	Drying phase (K-means)	Drying time (hour)	Water activity (a_w)	Moisture (relative)	SSC ($^{\circ}$ Brix)	Lightness (L^*)	Hue angle (h)	Total carotenoids
Control	I	0	0.88 $\pm$ 0.04a	0.90 $\pm$ 0.02a	6.35 $\pm$ 1.43f	53.61 $\pm$ 1.47f	51.82 $\pm$ 0.37bc	50.75 $\pm$ 3.05d
		1	0.84 $\pm$ 0.04ab	0.86 $\pm$ 0.01ab	8.58 $\pm$ 0.99ef	57.38 $\pm$ 1.36e	53.43 $\pm$ 0.50ab	52.90 $\pm$ 5.66d
		2	0.82 $\pm$ 0.05b	0.85 $\pm$ 0.01ab	8.56 $\pm$ 1.27ef	58.70 $\pm$ 1.60de	53.32 $\pm$ 0.62bc	66.26 $\pm$ 15.09d
	II	3	0.64 $\pm$ 0.03c	0.82 $\pm$ 0.03b	10.57 $\pm$ 1.64de	61.65 $\pm$ 4.28bcd	50.40 $\pm$ 1.38c	154.88 $\pm$ 37.01c
		4	0.62 $\pm$ 0.03c	0.67 $\pm$ 0.09c	14.69 $\pm$ 3.15bc	64.67 $\pm$ 2.14ab	50.18 $\pm$ 0.95c	205.63 $\pm$ 87.36bc
		5	0.45 $\pm$ 0.03d	0.72 $\pm$ 0.05c	12.02 $\pm$ 3.54cde	62.86 $\pm$ 2.68abc	53.17 $\pm$ 1.93bc	261.22 $\pm$ 81.76ab
	III	6	0.46 $\pm$ 0.04d	0.49 $\pm$ 0.15d	14.09 $\pm$ 5.80 cd	65.12 $\pm$ 1.49a	55.16 $\pm$ 2.32ab	294.65 $\pm$ 61.04a
		7	0.45 $\pm$ 0.04d	0.45 $\pm$ 0.09d	18.67 $\pm$ 5.25ab	58.86 $\pm$ 2.69de	51.89 $\pm$ 1.17bc	297.32 $\pm$ 44.30a
		8	0.42 $\pm$ 0.02d	0.25 $\pm$ 0.07e	20.02 $\pm$ 7.25a	60.63 $\pm$ 2.23de	50.52 $\pm$ 0.96c	178.68 $\pm$ 29.63c
		<i>p</i> value	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
		HSD	0.04	0.06	3.99	2.72	1.84	71.30
Hot-water blanching	I	0	0.91 $\pm$ 0.03a	0.91 $\pm$ 0.01a	5.75 $\pm$ 0.51c	49.00 $\pm$ 1.89c	56.55 $\pm$ 1.98a	35.74 $\pm$ 6.25d
		1	0.90 $\pm$ 0.02a	0.89 $\pm$ 0.01a	5.35 $\pm$ 0.75c	50.55 $\pm$ 2.33c	56.12 $\pm$ 1.66a	45.27 $\pm$ 11.11d
		2	0.88 $\pm$ 0.03a	0.86 $\pm$ 0.02a	7.13 $\pm$ 2.21c	51.42 $\pm$ 1.84bc	55.00 $\pm$ 1.41a	65.18 $\pm$ 17.70 cd
	II	3	0.77 $\pm$ 0.03b	0.63 $\pm$ 0.07b	7.40 $\pm$ 1.69c	59.91 $\pm$ 2.72a	51.86 $\pm$ 1.36b	89.97 $\pm$ 24.46 cd
		4	0.70 $\pm$ 0.08c	0.44 $\pm$ 0.14c	15.96 $\pm$ 6.14b	60.13 $\pm$ 2.33a	49.77 $\pm$ 2.30 cd	239.58 $\pm$ 47.43b
		5	0.68 $\pm$ 0.07c	0.49 $\pm$ 0.08c	19.55 $\pm$ 7.37b	60.96 $\pm$ 2.25a	50.61 $\pm$ 2.01bc	234.04 $\pm$ 78.81b
	III	6	0.50 $\pm$ 0.07d	0.20 $\pm$ 0.07d	35.79 $\pm$ 8.08a	54.82 $\pm$ 7.16b	48.79 $\pm$ 1.89de	292.47 $\pm$ 69.77a
		7	0.49 $\pm$ 0.08d	0.19 $\pm$ 0.03d	31.68 $\pm$ 6.09a	52.63 $\pm$ 3.47bc	47.50 $\pm$ 1.38e	275.45 $\pm$ 27.87ab
		8	0.40 $\pm$ 0.02e	0.17 $\pm$ 0.02d	32.71 $\pm$ 8.72a	54.72 $\pm$ 6.27c	47.66 $\pm$ 1.08e	304.57 $\pm$ 31.62a
		<i>p</i> value	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
		HSD	0.05	0.06	5.53	3.83	1.71	42.54

Data from the analysis of quality parameters and labels from the K-means analysis were both used as Y-vector for the development of regression and classification models, respectively.

Regression models

The complete calibration and prediction performances of the regression models are summarized in Table 3. Poor results ($R^2 < 0.70$) were obtained for the prediction of the soluble solids content for the unblanched treatment. Conversely, regression models with good ($R^2 \geq 0.80$), very good ($R^2 \geq 0.90$) or excellent ($R^2 \geq 0.95$) predictability were obtained to monitor changes in soluble solids content (only for blanched carrots); and a_w (Fig. 4a), moisture content (Fig. 4b), total carotenoids content (Fig. 4c) and colour changes (Fig. 4d) of carrot slices during drying, regardless of thermal treatment and number of features used in the model. In detail, except for calibration model for colour changes, the coefficient of determination (R^2) was higher than 0.90 for the aforementioned parameters. Thus, for the test set validation with one quarter of the data (randomly selected)

RMSEPs ranging from 0.03–0.04 for a_w , 0.03–0.04 for moisture content and 22.62–29.51 for total carotenoids content were obtained. Moreover, although results from colour analysis showed good fittings, development of colour prediction models was totally affected by the pretreatment used. In fact, blanched samples showed the best fitting metrics in predicting changes in hue angle (h), while for unblanched carrot slices, which were prone to the white blush discoloration, multivariate models were successfully computed only for the monitoring of changes in lightness (L^*).

The aforementioned performance parameters were comparable with both calibration and cross-validation results. Moreover, models obtained from feature selection (i.e. iPLS model) usually allowed the use of a lower number of latent variables in comparison with a full-spectrum model (i.e. PLS model).

Although the colour models resulted in R^2 below 0.85, good performance were still obtained with RMSEP values ranging from 1.66 to 1.79 for the lightness (L^*) and from 1.34 to 1.46 for hue angle (h). Considering that the 1100–2300-nm spectral band is not directly related to colour information, results obtained by the indirect measurement of changes in both L^* and h can be considered acceptable. However, it can be speculated that by including the visible range the model performance might be improved considerably.

Generally, with respect to the treatment, iPLS algorithm led to a higher number of selected features for blanched samples, which also differed from the unblanched treatment in terms of selected wavelengths. Results suggest that the effect of hot water blanching on water loss and changes in microstructure was pronounced, affecting the model development.

Table 3 Summary of performance metrics for the combinations of treatment, spectral pre-processing and regression algorithm (i.e. PLS and iPLS) complexity which gave the best results during 8-h drying

Treatment	Parameter	Algorithm	Number of features	Wavelengths (nm)	Spectral pre-treatment		LVs ⁱ RMSE ^l		Bias		R ²	
					SG ^e	SC ^f	MC ^g	C ^m	P ⁿ	C	P	C
Control	a _w ^a	PLS ^c	601	1100-2300	9	SNV ^h	Yes	0.03	0.04	4.4E-16	-4.7E-04	0.92
		iPLS ^d	5	1134, 1408, 1724, 2166, 2224				0.03	0.03	3.0E-16	-6.2E-05	0.93
	Moisture (w.b.)	PLS	601	1100-2300	-	SNV	Yes	0.04	0.04	4.0E-04	4.0E-04	0.97
		iPLS	5	1100, 1396, 1558, 1726, 1930				0.03	0.03	-1.0E-16	2.6E-05	0.98
	SSC ^b	PLS	601	1100-2300	7	SNV	Yes	3.59	3.68	0.0E+00	1.6E-02	0.63
		iPLS	8	1108, 1128, 1166, 1320, 1392, 1874, 2088, 2114				3.29	3.43	1.2E-13	-3.4E-02	0.69
	Luminance (L*)	PLS	601	1100-2300	9	SNV	Yes	1.55	1.79	0.0E+00	6.2E-03	0.85
		iPLS	8	1292, 1548, 1778, 1842, 2042, 2160, 2250, 2286				1.56	1.66	7.3E-15	-1.1E-02	0.85
	Carotenoids	PLS	601	1100-2300	9	SNV	Yes	27.95	29.51	2.8E-14	-3.0E-02	0.93
		iPLS	5	1100, 1474, 1868, 2050, 2256				27.38	28.17	-1.1E-13	1.2E-01	0.93
Hot-warmer blanching	a _w	PLS	601	1100-2300	7	SNV	Yes	0.04	0.04	4.4E-16	-2.8E-04	0.96
		iPLS	6	1126, 1268, 1400, 1514, 1868, 2300				0.04	0.04	-2.7E-17	9.3E-05	0.96
	Moisture (w.b.)	PLS	601	1100-2300	7	SNV	Yes	0.04	0.04	-1.7E-16	-3.9E-04	0.98
		iPLS	6	1118, 1388, 1588, 1870, 1894, 2216				0.04	0.04	-1.8E-16	-2.0E-04	0.99
	SSC	PLS	601	1100-2300	7	SNV	Yes	4.32	4.40	0.0E+00	1.0E-02	0.88
		iPLS	6	1116, 1278, 1376, 1378, 2098, 2118				4.13	4.19	-3.1E-14	1.3E-02	0.89
	Hue angle (h)	PLS	601	1100-2300	-	SNV	Yes	1.40	1.46	-7.1E-15	-1.0E-02	0.86
		iPLS	8	1316, 1372, 1544, 2186, 2236, 2256, 2270, 2278				1.28	1.34	-1.8E-14	5.1E-03	0.88
	Carotenoids	PLS	601	1100-2300	9	SNV	Yes	21.75	23.10	-2.8E-14	-3.4E-01	0.96
		iPLS	6	1100, 1394, 1754, 1900, 2038, 2236				22.17	22.62	2.0E-01	2.4E-01	0.96

^a Water activity

^b Soluble solids content

^c Partial least squares regression

^d Interval partial least squares regression

^e Savitzky-Golay filter window

^f Scatter correction algorithm

^g Standard normal variate

^h Mean centering

ⁱ Latent variables

^l Root mean squared error

^m Calibration

ⁿ Prediction

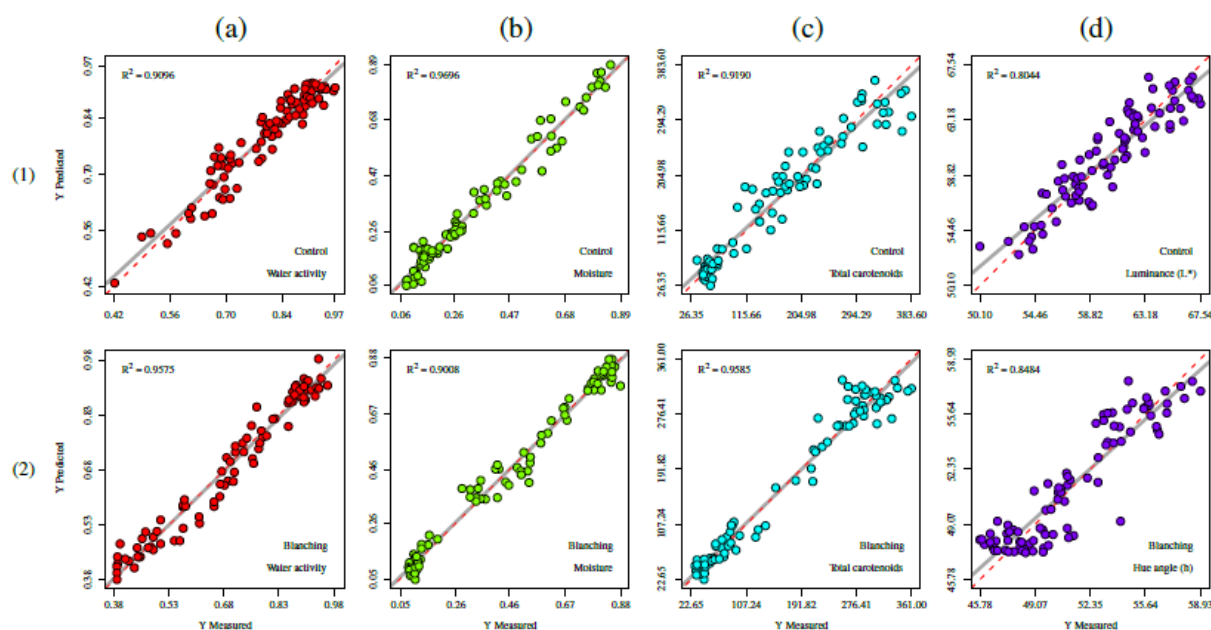


Fig. 4 PLS regression plots of Y-measured (reference) and Y-predicted (NIR) values for water activity (column a), moisture (column b), total carotenoids content (column c) and colour changes (column d) monitored during 8-h drying in both unblanched (row 1) and blanched (row 2) carrots. PLS regression plots refer to models based obtained from the full spectrum

Table 3 also gives an overview of the spectral pretreatments effectively used in the selected models. In general, reducing and/or removing uninformative variance from the raw spectral data was essential for the development of well performing regression models as all best models use spectral pre-treatments. In fact, it can be inferred that SNV scatter correction was necessary to minimize the RMSE and thus obtain the highest R^2 . This may mean that the variation in light scattering negatively interfered with spectral information related to chemical and physicochemical parameters. Savitzky Golay smoothing improved the prediction performance for most of the regression models. Thus, the need for smoothing suggests that spectral data were slightly affected by noise. Mean centering was effective in improving regression performance through spectral resolution enhancement; in fact, this technique led to superior results as compared to those obtained from non-mean-centered spectra (data not shown).

Classification Models

The combinations of spectral pre-treatments, discriminant algorithms and features which gave the best classification performance for the assignment of each carrot slice to a specific drying phase on the basis of its spectral profile are summarized in Table 4. The optimal combination of spectral

preprocessing treatments was similar to those previously selected for the development of regression models. Pre-treatment methods such as SNV (for baseline correction), SavitzkyGolay smoothing filter (for noise reduction) and mean centering (for resolution enhancement) were selected as best combination for removing/reducing unwanted background information (i.e. light scattering and noise arising from various physical and/or chemical processes).

All models yielded good (> 85%) to excellent (> 95%) sensitivity and specificity for all drying phases (i.e. 'Drying Phase I', 'Drying Phase II' and 'Drying Phase III'). Thus, the models had greater ability to discriminate between the classes with respect to another class. In particular, all models had the highest sensitivity and specificity for 'Drying Phase I' and 'Drying Phase III'. This indicates that the classification of carrot slices as belonging or not belonging to both initial and final drying phases was the most accurate. Moreover, it should be noted that the worst predictive ability was always paired to 'Drying Phase II'. This can probably be explained by the fact that the variation in the properties of carrot slices classified as 'Drying Phase II' was much higher than variation in properties of carrot slices classified as belonging to 'Drying Phase I' or 'Drying Phase III'. In addition, as already observed for the case of regression models, discriminant analysis classifiers using blanched carrots resulted in better prediction ability than those from unblanched samples.

Finally, models obtained from a reduced number of features (i.e. iPLS-DA) showed discriminant performances very similar to models computed from the full spectrum (i.e. PLS-DA). Moreover, iPLS-DA models were always characterized by a higher variance explained by a lower number of latent

Table 4 Summary of performance metrics for the combinations of treatment, spectral pre-processing and classification algorithm (i.e. PLS-DA and iPLS-DA) complexity which gave the best results during 8-h drying

Treatment	Algorithm	Number of features	Wavelengths (nm)	Spectral pre-treatment			LVs ^g	Drying phase (K-means)	Drying time (h)	Sensitivity		Specificity		Accuracy	
				SG ^c	SC ^d	MC ^e				C ^h	P ⁱ	C	P	C	P
Control	PLS-DA ^a	601	1100-2300	9	SNV ^e	Yes	3	I	0-2	0.87	0.86	0.94	0.94	0.91	0.90
								II	3-5	0.91	0.91	0.59	0.59	0.75	0.75
								III	6-8	0.85	0.85	0.87	0.87	0.86	0.86
	iPLS-DA ^b	5	1868, 2152, 2248, 2290, 2294	9	SNV	Yes	5	I	0-2	0.89	0.89	0.96	0.96	0.93	0.92
								II	3-5	0.92	0.91	0.64	0.63	0.78	0.77
								III	6-8	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
	PLS-DA	601	1100-2300	9	SNV	Yes	4	I	0-2	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96
								II	3-5	0.86	0.86	0.89	0.88	0.87	0.87
								III	6-8	0.96	0.96	0.94	0.94	0.95	0.95
Hot-water blanching	iPLS-DA	6	1376, 1386, 1540, 1980, 2042, 2264	9	SNV	Yes	5	I	0-2	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97
								II	3-5	0.88	0.89	0.91	0.91	0.90	0.90
								III	6-8	0.97	0.97	0.93	0.94	0.95	0.95

^a Partial least squares discriminant analysis

^b Interval partial least squares discriminant analysis

^c Savitzky-Golay filter window

^d Scatter correction

^e Standard normal variate

^f Mean centering

^g Latent variables

^h Calibration

ⁱ Prediction

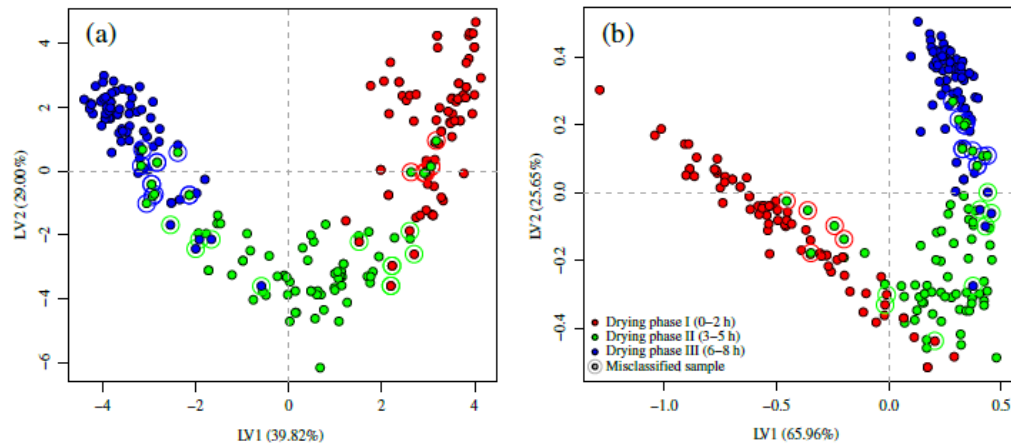


Fig. 5 Drying phases' spatial distribution plots obtained from PLS-DA (a) and iPLS-DA (b) models for '0-2 h', '3-5 h' and '6-8 h' classes (i.e. drying phases) of the unblanched treatment. Percentages of the explained variance are reported in parentheses on the axes. Red point with green outline corresponds to 'Drying Phase II' sample erroneously classified as belonging to 'Drying Phase I'. Green point with red outline corresponds

to 'Drying Phase I' sample erroneously classified as belonging to 'Drying Phase II'. Green point with blue outline corresponds to 'Drying Phase III' sample erroneously classified as belonging to 'Drying Phase II'. Blue point with green outline corresponds to 'Drying Phase II' sample erroneously classified as belonging to 'Drying Phase III'

variables (data not shown). This is confirmed by both Fig. 5a, b, which show pattern similarity between scores from PLS-DA and iPLS-DA models. Finally, yet importantly, the results demonstrated a remarkable effect of hot-water blanching treatment on the performances of both PLS-DA and iPLS-DA models. Moreover, feature selection seems to be affected by the thermal

treatment as selected wavelengths were slightly different between treatments. Thus, prior to implementation in industry, this approach should be further validated on a larger sample size covering the most important variations expected from structural changes in carrots due to the effect of thermal treatment and drying process.

Conclusions

In this study, the potential of near-infrared (NIR) spectroscopy in the 1100–2300-nm spectral range was evaluated to proactively and non-destructively detect and monitor changes in quality parameters (i.e. water activity, moisture content, total carotenoids content, colours and SSC) of carrot slices (*Daucus carota* L. var. *Romance*) during hot-air drying. For this purpose, regression and classification models were developed and the impact of the hot-water blanching (at 95 °C for 1.45 min) as enzyme inactivator on model performance was also investigated. Optimal features were also selected for both regression (PLS) and discriminant (PLS-DA) analysis by using the interval PLS algorithm configured in stepwise forward mode. Both iPLS and iPLS-DA models showed similar or better performances than model obtained using the full spectrum. In general, both PLS and PLS-DA models obtained either very good or excellent results. Specifically, for regression analysis, models characterized by remarkable performances were obtained for water activity ($R^2 = 0.91\text{--}0.96$; RMSEP = 0.03–0.04), moisture content ($R^2 = 0.97\text{--}0.98$; RMSEP = 0.03–0.04), total carotenoids content ($R^2 = 0.92\text{--}0.96$; RMSEP = 22.62–29.51 $\mu\text{g g}^{-1}$ fresh sample), lightness for unblanched carrots ($R^2 = 0.80\text{--}0.83$; RMSEP = 1.66–1.79) and hue angle for blanched samples ($R^2 = 0.85\text{--}0.87$; RMSEP = 1.34–1.46). In addition, while soluble solids content was poorly predicted for both treatments (RMSEP = 3.43–4.40), blanched carrots showed better coefficients of determination (i.e. $R^2 > 0.85$) than unblanched samples (i.e. $R^2 < 0.70$). Regarding the discriminant analysis, PLS-DA algorithms obtained high accuracy in classifying drying phases based on the spectral profile. However, better results were obtained for models computed using blanched carrots. Specifically, NIR spectroscopy showed an excellent classification accuracy (>0.90) for carrot slices belonging to ‘Drying phase I’ and ‘Drying phase III’. On the other hand, misclassified carrot slices were primarily assigned to ‘Drying phase II’, which, however, showed accuracy greater than 0.85. It should be noted that the development of regression and classification models were affected by the blanching treatment in terms of number of features, selected wavelengths and model performances. Consequently, the proposed method should be further validated to circumvent model robustness issues due to both water loss and microstructural changes in carrots due to thermal treatments.

Finally, the approach presented in this research lays the foundation for an accurate smart-drying system based on NIR spectroscopy in terms of regression and classification performances, non-destructive analysis and automation. However, the number of wavelengths required in an online drying device would depend on the spectral pre-treatment used. Consequently, future research should include wavebands not covered by the spectrophotometer used for this study, increasing the light-beam intensity, and/or combining other chemometric methods, as these could improve the performance and the robustness of the smart-drying system. These promising results encourage additional research to develop low-cost dynamic multi factorial process control strategies (based on a Quality by Design approach) using machine learning architectures to produce quality dried products while reducing the environmental impact of the drying processes.

Acknowledgments: The authors gratefully acknowledge CORE Organic Plus consortium (Coordination of European Transnational Research in Organic Food and Farming System, ERA-NET action) and Mipaaf (Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali - Italy) for financial support through the SusOrganic project titled: ‘Development of quality standards and optimized processing methods for organic produce’ (Nr: 2814OE006). Moreover, our sincere thanks to the MCs Chiara Di Pietro for his valuable help and support during the experimentation.

References

- Aghbashlo, M., Hosseinpour, S., & Mujumdar, A. S. (2015). Application of artificial neural networks (ANNs) in drying technology: a comprehensive review. *Drying Technology*, 33(12), 1397–1462.
- Akpınar, E. K., Bicer, Y., & Yildiz, C. (2003). Thin layer drying of red pepper. *Journal of Food Engineering*, 59(1), 99–104.
- Ambrose, A., Lohumi, S., Lee, W. H., & Cho, B. K. (2016). Comparative nondestructive measurement of corn seed viability using Fourier transform near-infrared (FT-NIR) and Raman spectroscopy. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 224, 500–506.
- Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., & Youssef, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: a review. *Food Research International*, 48(2), 410–427.
- Bao, B., & Chang, K. C. (1994). Carrot juice color, carotenoids, and nonstarchy polysaccharides as affected by processing conditions. *Journal of Food Science*, 59(6), 1155–1158. doi:10.1111/j.13652621.1994.tb14665.x.
- Behnsnlian, D., & Mayer-Miebach, E. (2017). Impact of blanching, freezing and frozen storage on the carotenoid profile of carrot slices (*Daucus carota* L. cv. Nutri Red). *Food Control*, 73, 761–767. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.09.045.
- Benlloch-Tinoco, M., Igual, M., Rodrigo, D., & Martinez-Navarrete, N. (2013). Comparison of microwaves and conventional thermal treatment on enzymes activity and antioxidant capacity of kiwifruit puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19, 166–172.
- Boysworth, M. K., & Booksh, K. S. (2008). Aspects of multivariate calibration applied to near-infrared spectroscopy. In D. A. Burns & E. W. Ciurczak (Eds.), *Handbook of near-infrared analysis* (3rd ed., pp. 207–229). New York: CRC Press.
- Brosnan, T., & Sun, D. W. (2004). Improving quality inspection of food products by computer vision—a review. *Journal of Food Engineering*, 61(1 SPEC), 3–16.
- Chen, Q., Zhang, C., Zhao, J., & Ouyang, Q. (2013). Recent advances in emerging imaging techniques for non-destructive detection of food quality and safety. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 52, 261–274.
- Clarka, C. J., Hockings, P. D., Joyce, D. C., & Mazucco, R. A. (1997). Application of magnetic resonance imaging to pre- and post-harvest studies of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 11(1), 1–21.
- CRAN. (2017). Comprehensive R Archive Network. URL <http://cran.rproject.org>.
- de Jong, S. (1993). SIMPLS: an alternative approach to partial least squares regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 18(3), 251–263.
- Dejaegher, B., Dhooghe, L., Goodarzi, M., Apers, S., Pieters, L., & Vander Heyden, Y. (2011). Classification models for neocryptolepine derivatives as inhibitors of the β -haematin formation. *Analytica Chimica Acta*, 705(1–2), 98–110.
- Demiray, E., & Tulek, Y. (2014). Color degradation kinetics of carrot (*Daucus carota* L.) slices during hot air drying. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39. doi:10.1111/jfpp.12290.

- Demirhan, E., & Özbek, B. (2009). Color change kinetics of microwavedried basil. *Drying Technology*, 27(1), 156–166.
- ElMasry, G., & Sun, D.-W. (2010). Hyperspectral imaging for food quality analysis and control. In D.-W. Sun (Ed.), *Hyperspectral imaging for food quality analysis and control* (Vol. 1, pp. 3–43). London: Academic Press.
- FAO. (2011). Global Trends and Future Challenges for the Work of the Organization, 155. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/meeting/025/md883E.pdf>
- Ghasemi-Varnamkhasti, M., Mohtasebi, S. S., & Siadat, M. (2010). Biomimetic-based odor and taste sensing systems to food quality and safety characterization: an overview on basic principles and recent achievements. *Journal of Food Engineering*, 100(3), 377–387.
- Gomez, K. A., & Gomez, A. (1984). *Statistical procedures for agricultural research* (second ed.). New York: John Wiley & Sons Inc..
- Goodarzi, M., Heyden, Y. V., & Funar-Timofei, S. (2013). Towards better understanding of feature-selection or reduction techniques for quantitative structure–activity relationship models. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 42, 49–63.
- Grabowski, S., Marcotte, M., & Ramaswamy, H. S. (2003). Drying of fruits, vegetables and spices. In A. Chakraverty, A. S. Mujumdar, G. S. Vijaia Raghavan, & H. S. Ramaswamy (Eds.), *Handbook of postharvest technology: cereals, fruits, vegetables, tea, and spices* (pp. 653–695). New York: Marcel Dekker, Inc..
- Horwitz, W. (2005). *Official methods of analysis of AOAC international*, 18th Edition.
- Howard, L. R., Braswell, D. D., & Aselage, J. (1996). Chemical composition and color of strained carrots as affected by processing. *Journal of Food Science*, 61(2), 327–330.
- Jha, S. N., Narsaiah, K., Basediya, A. L., Sharma, R., Jaiswal, P., Kumar, R., & Bhardwaj, R. (2011). Measurement techniques and application of electrical properties for nondestructive quality evaluation of foods-a review. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 387–411.
- Krokida, M. K., Maroulis, Z. B., & Saravacos, G. D. (2001). The effect of the method of drying on the colour of dehydrated products. *International Journal of Food Science and Technology*, 36(1), 53–59.
- Krokida, M. K., Tsami, E., & Maroulis, Z. B. (1998). Kinetics on color changes during drying of some fruits and vegetables. *Drying Technology*, 16(3–5), 667–685.
- Lavelli, V., & Kerr, W. (2012). Apple pomace is a good matrix for phytochemical retention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(22), 5660–5666.
- Lavelli, V., Zanoni, B., & Zaniboni, A. (2007). Effect of water activity on carotenoid degradation in dehydrated carrots. *Food Chemistry*, 104(4), 1705–1711. doi:10.1016/j.foodchem.2007.03.033.
- Liu, C., Liu, W., Lu, X., Chen, W., Yang, J., & Zheng, L. (2016). Potential of multispectral imaging for real-time determination of colour change and moisture distribution in carrot slices during hot air dehydration. *Food Chemistry* 195. Elsevier Ltd.
- Markowski, M., & Zielińska, M. (2011). Kinetics of water absorption and soluble-solid loss of hot-air-dried carrots during rehydration. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(6), 1122–1128. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02589.x.

- Massantini, R., Moschetti, R., Monarca, D., Cecchini, M., Contini, M., & Alfani, L. M. (2009). The influence of cover crops and double harvest on storage of fresh hazelnuts (*Corylus avellana* L.). *Advances in Horticultural Science*, 23(4), 231–237. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77951741603&partnerID=tZOtx3y1>
- Mayor, L., & Sereno, A. M. (2004). Modelling shrinkage during convective drying of food materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 61(3), 373–386.
- Montgomery, D. C. (2001). *Design and analysis of experiments* (fifth edit.). New York: Wiley & Sons, Inc..
- Moschetti, R., Carletti, L., Monarca, D., Cecchini, M., Stella, E., & Massantini, R. (2013). Effect of alternative postharvest control treatments on the storability of Bgolden delicious^ apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(11), 2691–2697.
- Moschetti, R., Frangipane, M. T., Monarca, D., Cecchini, M., & Massantini, R. (2012). Maintaining the quality of unripe, fresh hazelnuts through storage under modified atmospheres. *Postharvest Biology and Technology*, 65, 33–38.
- Moschetti, R., Haff, R. P., Stella, E., Contini, M., Monarca, D., Cecchini, M., & Massantini, R. (2015). Feasibility of NIR spectroscopy to detect olive fruit infested by *Bactrocera oleae*. *Postharvest Biology and Technology*, 99, 58–62.
- Moschetti, R., Saeys, W., Keresztes, J. C., Goodarzi, M., Cecchini, M., Danilo, M., & Massantini, R. (2015). Hazelnut quality sorting using high dynamic range short-wave infrared hyperspectral imaging. *Food and Bioprocess Technology*, 8(7), 1593–1604.
- Mujumdar, A. S. (2012). Editorial: the role of drying technology in sustainable R&D and innovation. *Drying Technology*, 30(13).
- Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T., & Davies, T. (2004). *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification*. Chichester: NIR publications.
- Negi, P. S., & Kumar Roy, S. (2001). The effect of blanching on quality attributes of dehydrated carrots during long-term storage. *European Food Research and Technology*, 212(4), 445–448. doi:[10.1007/s002170000279](https://doi.org/10.1007/s002170000279).
- Nicolaï, B. M., Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K. I., & Lammertyn, J. (2007). Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: a review. *Postharvest Biology and Technology*, 46(2), 99–118.
- Ozaki, Y., McClure, W. F., & Christy, A. A. (Eds.). (2006). *Near-infrared spectroscopy in food science and technology*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
- Saeys, W., Velazco-Roa, M. A., Thennadil, S. N., Ramon, H., & Nicolaï, B. M. (2008). Optical properties of apple skin and flesh in the wavelength range from 350 to 2200 nm. *Applied Optics*, 47(7), 908–919.
- Sánchez-Sáenz, C. M., de Oliveira, R. A., & Park, K. J. (2015). HTST pre-drying influence on vacuum drying kinetics and carrot slices quality parameters evaluation. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 1636–1646. doi:[10.1111/jfpp.12393](https://doi.org/10.1111/jfpp.12393).
- Savitzky, A., & Golay, M. J. E. (1964). Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry*, 36(8), 1627–1639.
- Scott, K. J. (2001). Detection and measurement of carotenoids by UV/VIS spectrophotometry. In *Current protocols in food analytical chemistry*. New York: Wiley & Sons, Inc..

- Sergio, L., Pieralice, M., Di Venere, D., & Cardinali, A. (2007). Thermostability of soluble and bound peroxidases from artichoke and a mathematical model of its inactivation kinetics. *Food Technology and Biotechnology*, 45(4), 367–373.
- Sims, C. A., Balaban, M. O., & Matthews, R. F. (1993). Optimization of carrot juice color and cloud stability. *Journal of Food Science*, 58(5), 1129–1131. doi:10.1111/j.1365-2621.1993.tb06130.x.
- Su, Y., Zhang, M., & Mujumdar, A. S. (2014). Recent developments in smart drying technology. *Drying Technology*, 33(3), 260–276 Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2s2.0-84921436780&partnerID=tZOtx3y1>.
- Su, Y., Zhang, M., & Mujumdar, A. S. (2015). Recent developments in smart drying technology. *Drying Technology*, 33(3), 260–276.
- Suvarnakuta, P., Devahastin, S., & Mujumdar, A. S. (2005). Drying kinetics and β -carotene degradation in carrot undergoing different drying processes. *Journal of Food Science*, 70(8), s520–s526. doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb11528.x.
- Vega-Gálvez, A., Ah-Hen, K., Chacana, M., Vergara, J., MartínezMonzó, J., García-Segovia, P., Lemus-Mondaca, R., & Di Scala, K. (2012). Effect of temperature and air velocity on drying kinetics, antioxidant capacity, total phenolic content, colour, texture and microstructure of apple (var. Granny Smith) slices. *Food Chemistry*, 132(1), 51–59.
- Wise, B. M. (2009). Eigen vector research wiki - Using Cross-Validation. URL <http://wiki.eigenvector.com>. Accessed 11 Sep 2015.
- Xiao, H. W., Gao, Z. J., Lin, H., & Yang, W. X. (2010). Air impingement drying characteristics and quality of carrot cubes. *Journal of Food Process Engineering*, 33(5), 899–918. doi:10.1111/j.1745-4530.2008.00314.x.
- Xing, J., Guyer, D., Ariana, D., & Lu, R. (2008). Determining optimal wavebands using genetic algorithm for detection of internal insect infestation in tart cherry. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 2(3), 161–167.
- Yi, J., Zhou, L., Bi, J., Chen, Q., Liu, X., & Wu, X. (2015). Impacts of pre-drying methods on physicochemical characteristics, color, texture, volume ratio, microstructure and rehydration of explosion puffing dried pear chips. *Journal of Food Processing and Preservation*, 1–11.

9.2 Real-time monitoring of organic apple (var. Gala) during hot-air drying using near infrared spectroscopy



Roberto Moschetti^a, Flavio Raponi^a, Serena Ferri^b, Andrea Colantoni^b, Danilo Monarca^b, Riccardo Massantini^{a,*}

^a Department for Innovation in Biological, Agro-food and Forest System, University of Tuscia, Via S. Camillo de Lellis snc, 01100 Viterbo, Italy

^b Department of Agricultural and Forestry Sciences, University of Tuscia, Via S. Camillo de Lellis snc, 01100 Viterbo, Italy

Abstract

Dried apple (*Malus domestica* B.) shows a growing trend to its worldwide consumption as raw material used to produce organic snacks, integral breakfast foods, chips, etc. Apple is often dried by conventional methods (e.g. hot-air drying, freeze-drying, etc.), which are usually uncontrolled and then prone to product quality deterioration. Thus, to allow the production of high-value end products, there is a need for developing new drying systems. In this study, it was investigated the feasibility of an implementation of NIR spectroscopy in smart drying systems to non-destructively detect and monitor physicochemical changes in organic apples wedges during 8-h hot-air drying at 60 °C. Moreover, the impact of microwave heating pre-treatment (at 850 W for 45 s) as enzyme inactivators on model performances was also evaluated. Partial least squares (PLS) regression models were successfully developed to monitor changes in water activity ($R^2 = 0.97 \pm 0.09$), moisture content ($R^2 = 0.97 \pm 0.09$), SSC ($R^2 = 0.96 \pm 0.09$) and chroma ($R^2 = 0.77 \pm 0.08$) during drying. Classification analysis was performed for the development of discriminant models able to recognise dehydration phases of apple wedges on the basis of their spectral profile. The classification models were computed using K-means and Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) algorithms in sequence. The performance of each PLS-DA model was defined based on its accuracy, sensitivity and specificity rates. All of the selected models provided a very-good (>0.90) or excellent (>0.95) sensitivity and specificity rates for the predefined drying phases. Feature selection procedures allowed to obtain both regression and classification models with

performances very similar to models computed from the full spectrum. Results suggest that effect of microwave heating on both water loss and microstructure of apple tissue was pronounced, mainly affecting the features selection procedure in terms of number of features and selected wavelengths.

Keywords: *Malus domestica* B.Apple wedges Convective air drying Smart drying Chemometrics Feature selection

Introduction

Globalization of markets entails the availability of horticultural products regardless of their harvest date, pursued through innovation in products and processes to obtain fruit and vegetables with improved shelf-life, organoleptic quality, nutritional value, safety and healthiness during the whole agri-food chain. Consequently, market value of perishable commodity mainly depends on the preservation method used to guarantee food stability and, thus, to delay physicochemical, biochemical and microbiological spoilage. In fact, the preservation method directly affects processing, storage, transportation and distribution costs. Among postharvest operations, drying is one of the oldest, typical, effective and viable preservation processes throughout the world. It consists of three main interlinked steps that can be summarized as: (1) product formulation or treatment selection, (2) dehydration process and (3) quality and properties assessment (Aghbashlo et al., 2015). Drying prevents both food spoilage and decay through moisture removal due to simultaneous heat and mass transfer, allowing foods to be stored for long periods with minimal deterioration occurring (Nadian et al., 2015). Moreover, drying is particularly effective in enabling storability of food at room temperature and in simplifying the handling of the products through their reduction of weight and packaging volume (Liu et al., 2016). Drying technology may vary from simple methods (e.g. sun drying) to relatively advanced techniques (e.g. instant controlled pressure drop drying); nevertheless, modern technology schemes are not always paired with good/excellent quality and high commodity value (Chong et al., 2014; Nadian et al., 2015). In fact, drying is a relatively complex, dynamic, unsteady and nonlinear process that may suffer from properties of wet material, scale of production and compliance with regulations, as well as operating and environmental conditions (Aghbashlo et al., 2015). These factors may be responsible for quality degradation, with a reduction of consumer acceptance as a result of the undesirable changes in colour, texture, size and shape as well as the organoleptic, nutritional and functional properties (Brosnan and Sun, 2004; Vega-Galvez et al., 2012). Last but not least, drying is one of the most energy-intensive processes in food industry (Akpınar et al., 2003); in fact, it adversely

effects climate change as most dryers use fossil fuels (Mujumdar, 2012). Consequently, new drying technologies must be designed around the quality attributes of the raw material to ensure valuable products at the highest drying rate and the lowest carbon footprint, which means minimal/optimal energy demand and negligible environmental impact (Mujumdar, 2012; Su et al., 2015). Among emerging drying technologies, smart drying is one of the newest and most promising techniques. It consists in at-/in-/on-line implementation of innovative and reliable sensors, resources, tools and practices, which allow to monitor and control the dryer operating conditions to yield high-value dried products while enhancing energy conservation and environmental sustainability. Smart drying is a multi- and inter-disciplinary sector and its recent developments embrace the following R&D areas: artificial intelligence (Aghbashlo et al., 2015), biomimetic (Ghasemi-Varnamkhasti et al., 2010), computer vision (Brosnan and Sun, 2004), microwave/ dielectric spectroscopy (Jha et al., 2011), visible (Vis) and nearinfrared (NIR) spectroscopy (Nicolai et al., 2007), hyper-/multispectral imaging (ElMasry and Sun, 2010), magnetic resonance imaging (Clarka et al., 1997; Su et al., 2014), ultrasound imaging (Awad et al., 2012), electrostatic sensing (Chen et al., 2013) and control system for drying environment. Among commercial fruits, apple shows a growing trend in worldwide consumption. Dried apple in particular plays a major role in food industry as raw material in the production of snacks, integral breakfast foods, chips, etc., which became popular in the diet of modern consumers (Vega-Galvez et al., 2012; Yi et al., 2015) in parallel with the human consumption of organic products (Sacilik and Elicin, 2006). Despite apple tissue exhibits extensive and not homogeneous discoloration during drying (Fernandez et al., 2005), it is nowadays often dried by conventional methods (e.g. hot-air drying, freeze-drying, etc.) which, however, are usually uncontrolled and then prone to product quality deterioration as well as the fact of being affected by a number of drawbacks, such as very long drying time and, of course, high energy demand (Chong et al., 2014; Nadian et al., 2015). Thus, treatment selection before apple drying is a mandatory (but not sufficient) step to obtain a high-value end product. However, since the European Organic Regulation does not allow every conventional drying pre-/treatments on production and labelling of organic products (i.e. EC No. 834/2007 and EC No. 889/2008), drying of organic apples should be carefully optimized in order to obtain comparable results to conventional methods in terms of quality and safety of the final product. Therefore, the main objective of the proposed study was to investigate the feasibility of near-infrared spectroscopy (NIR) to proactively and non-destructively detect and monitor quality change in organic apple wedges during hot-air drying. Based on authors' best knowledge, apple drying has been widely addressed in literature; nevertheless, little insight is available on smart drying of apples since many authors focused their attention only on monitoring browning

development through computer vision (Aghilinategh et al., 2016; Gao et al., 2017, 2016; Wang et al., 2017), while knowledge of its potential use in the organic sector is totally lacking. Consequently, NIR spectroscopy coupled with chemometrics was investigated as a proved and versatile at-/on-/in-line tool with high sensitivity to changes in moisture content, particle size and chemical/physicochemical state of food (Ozaki et al., 2006).

Materials and methods

Sample preparation

Organic apples (*Malus domestica* B. var. Gala) were purchased from an Italian organic farm (La Parrina, Grosseto, Italy), and immediately stored at 4 ± 1 °C until processing. Fruit sampling was performed by selecting sound apples, with uniform size and same ripening stage. Fruits were tempered to room temperature 15 h before starting the experimental activities. Apple wedges (Fig.1a), without core and peel, were prepared by washing and cutting fruit into discs (5-mm thick) and subsequently dividing each disc into quarters using a cork borer and a sharp ceramic knife. Samples were visually evaluated for quality assessment and only apple wedges free from decay and/or blemish were used in the experimentation to perform (1) hot-water blanching and microwave heating treatments and (2) hot-air drying tests. About 100 g of apple wedges were used for both hot-water and microwave treatment experiments, while 270 apple wedges were randomly arranged into 9 batches of 30 samples each for the use in drying experiment. Fruit wedges were subjected to 8-h hot-air drying and batch sampling was performed at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 h drying. Each batch was subjected to both NIR spectral data acquisition and determination of CIELab colour, moisture content, water activity (a_w) and soluble solids content.

Treatment before hot-air dehydration

Hot-water blanching

Hot-water blanching (Fig.1b) consisted of dipping apple wedges in hot-water with a temperature controlled water bath (Astor 800D, Astori Tecnica, Brescia, Italy). As a control, apple wedges were dipped in distilled water at room temperature. The experimental plan (i.e. 14 different temperature and time combinations) is reported in Table 1. Treated samples were immediately cooled for 3 min in ice-water, and the residual POD enzymatic activity was evaluated.

Table 1: Experimental design for the hot-water and the microwave blanching treatments.
HW e hot-water blanching; MW e microwave heating.

Hot-water blanching			Microwave heating		
ID	Temp. (C)	Time (min)	ID	Power (W)	Time (min)
HW-80-0	80	0.0	MW-350-0	350	0.00
HW-80-1	80	1.5	MW-350-1	350	0.25
HW-80-2	80	3.0	MW-350-2	350	0.55
HW-80-3	80	5.0	MW-350-3	350	0.75
HW-80-4	80	10.0	MW-350-4	350	1.00
HW-90-0	90	0.0	MW-650-0	650	0.00
HW-90-1	90	1.5	MW-650-1	650	0.25
HW-90-2	90	3.0	MW-650-2	650	0.50
HW-90-3	90	5.0	MW-650-3	650	0.75
HW-95-0	95	0.0	MW-650-4	650	1.00
HW-95-1	95	0.5	MW-850-0	850	0.00
HW-95-2	95	1.0	MW-850-1	850	0.25
HW-95-3	95	1.5	MW-850-2	850	0.50
HW-95-4	95	3.0	MW-850-3	850	0.75
			MW-850-4	850	1.00

Microwave heating

A turntable domestic microwave oven (MT243, Whirlpool Co., Michigan, United States) with a continuous output-power (2450 MHz, 1000 W) was used to treat apple wedges (Fig. 1b). An experimental design based on a factorial design (i.e. 15 different power and time combinations) was applied (Table 1). Powers and times of treatment were chosen by taking into consideration the results of preliminary experiments aimed at identifying proper process conditions to allow apple wedges to be uniformly treated. After treatment, apple wedges were removed from the microwave oven and immediately dipped in ice-water for 3 min to accelerate cooling. Residual POD activity was then evaluated.

Peroxidase activity

Blanching treatments were set up to ensure a peroxidase inactivation of 90%. This level of inactivation was fixed as threshold in order to allow the produce to be stable and, thus, in line with industrial requirements (Benlloch-Tinoco et al., 2013).

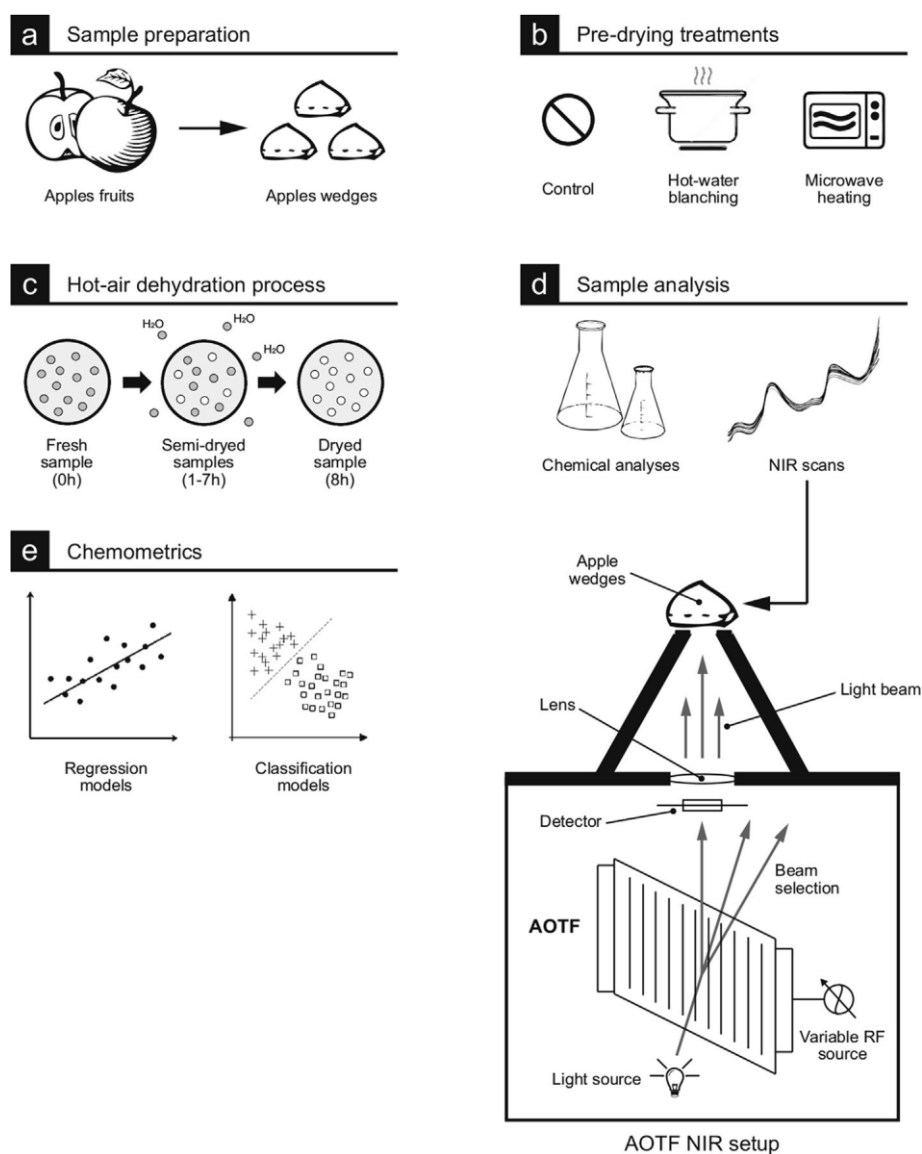


Fig. 1. Simplified step-by-step representation of the experimental procedure and NIR setup which were used to carry out the research.

Enzyme extraction

Enzyme extraction was carried out on the basis of the method of Massantini et al. (2009) with some modifications. Apple wedges were collected after each blanching treatment, frozen with liquid nitrogen and then immediately grinded into frozen powder by an analytic mill (IKA A11 basic; IKA Labortechnik, Staufen, Germany). Three grams of apple powder were homogenized with 15 mL of chilled phosphate buffer solution (PBS, 0.1 mol L⁻¹, pH 6.5) containing 3% (w/v) of polyvinylpolypyrrolidone. The mixture was centrifuged at 13,800 g for 20 min at 4 °C and the supernatant was used in the experimentation.

Enzyme activity measurement

Peroxidase (POD) activity was measured by following the method of Moschetti et al. (2012) with slight modifications. The assay was performed using an UV-Vis scanning spectrophotometer (Lambda 25; PerkinElmer, Massachusetts, United States). Changes in the absorbance at 460 nm were monitored for 3 min upon oxidation of the substrates catalyzed by the enzyme. Guaiacol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, United States) was used as substrate. The final reaction mixture contained 1 mL of crude enzyme, 1 mL of PBS (0.1 mol L⁻¹, pH 6.5), 1 mL of guaiacol (0.25% v/v) and 0.01 mL of hydrogen peroxide (0.75% v/v). One unit of enzyme activity (1 UEA) was defined as an increase in absorbance of 0.001 min⁻¹. Enzyme activity was measured in triplicate.

Enzyme thermal inactivation

The rate constant for first-order inactivation (k) was computed from the slope of the linear regression of the natural log of residual activity versus time of thermal treatment, according to Eq.(1)

$$\ln E_t = E_0 - kt \quad (1)$$

where E_0 is the initial enzyme activity (UEA), E_t is the activity after heating for time t (UEA), t is the time of heating (min) and k is the inactivation rate constant (min⁻¹). The coefficient of determination (R^2) of each regression line was also computed.

The inactivation time was computed as D-value (or decimal reduction time), which is the treatment time required to reduce the enzyme activity to at least 0.1 (i.e. 10%) of its original value, according to Eq. (2).

$$E_t = E_0 \cdot 10^{-t/D} \quad (2)$$

Hot-air dehydration process

The hot-air drying experiment (Fig. 1c) was performed in a 5tray dryer (Biosec, Tauro Essicatori srl, Vicenza, Italy). The dryer consisted in a temperature controller and a centrifugal fan that was used to blow air into the heating unit through a 15-cm duct. The air flow was parallel to the drying surface of the apple wedge. The dehydration process was conducted at 60 °C for 8 h on the basis of screening results obtained from tests conducted in the range from 40 to 60 °C. Drying tests at

temperatures lower than 60 °C were discarded due samples developing browning within the first 2 h of dehydration.

Near infrared spectroscopy

Spectral acquisition

Diffuse reflectance spectra were acquired using a Luminar 5030 Acousto-Optic Tunable Filter-Near Infrared (AOTF-NIR) Miniature ‘Hand-held’ Analyzer coupled with the bundled ‘SNAP! 2.04’ software (Brimrose Corp., Baltimore, USA) (Fig.1d). The instrument was equipped with a reflectance post-dispersive optical configuration, a pre-aligned dual beam lamp assembly and an indium gallium arsenide (InGaAs) array (range 1100-2300 nm, 2-nm resolution) with an integrating time of 60 msec. The reference spectrum was automatically measured by the instrument following the method used by Moschetti et al. (2013b). Each sample was measured in duplicate on two opposite sides of each apple wedge (i.e. 4 spectra per sample). Reflectance spectra were converted to absorbance ($A = -\frac{1}{4} \log R^1$) and the average spectrum was used for further computation.

Spectral pre-treatments

Each apple wedge was modelled as a ‘data vector’, where the spectral absorbance values (otherwise called features) were vector components. Chemometric analysis was performed following spectral pre-treatments including Standard Normal Variate (SNV), Multiplicative Scatter Correction (MSC), and Savitzky-Golay first and second derivatives (D1f and D2f, respectively) with a second or third order polynomial fitted over a window of five (S5), seven (S7), nine (S9) or eleven (S11) features (Boysworth and Booksh, 2008; Savitzky and Golay, 1964). For each dataset, Mean Centering (MC) was also tested as spectral pre-treatment. Every possible combination of pre-processing was also tested and only the best results, in terms of model performances, were retained.

Chemometrics

Prediction of chemical and physicochemical changes (regression models development). Regression models (Fig. 1e) were computed using the partial least squares (PLS) regression through the SIMPLS algorithm (de Jong, 1993). PLS is a regression technique used to find some linear combinations of the original independent variables. By using these linear combinations alone, PLS allows to discard irrelevant and unstable information, solve collinearity problem and, finally, obtain a more stable regression equation.

In addition, the Interval PLS (iPLS) algorithm was used as iterative routine for the extraction of features from spectra which could describe superior results compared to the prediction of PLS models based on all features dataset (Xing et al., 2008). The iPLS algorithm was configured in stepwise forward mode in order to allow the selection of a maximum of 10 and a minimum of 1 wavelength. As PLS and iPLS regressions perform a dimensionality reduction, it is essential to test each model and select the correct number of latent variables to obtain the optimal trade-off between underfitting and over-fitting. Thus, the samples were randomly split as follows: 75% and 25% of the samples were assigned to the calibration set (C) and the prediction set (P), respectively. Every PLS and iPLS model was optimized by computing a venetian blinds cross-validation with 10 data splits. This cross-validation method was preferred because it is simple and easy to implement, relatively fast, generally safe and capable of providing a better representation when the dataset contains many samples, as is the case here (Naes et al., 2004; Wise, 2009). Root Mean Squared Error for calibration, cross-validation and prediction calculations (RMSEC, RMSECV and RMSEP, respectively) were employed to evaluate each regression model with the purpose of selecting the optimal number of latent variables and thus circumvent unrealistic results (Moscetti et al., 2015). Model performances were also evaluated in terms of BIAS and coefficient of determination (R^2).

PLS and iPLS models were both computed to predict changes in chemical and physicochemical attributes during 8-h dehydration process. Prediction of the drying phases (classification models development). Classification models (Fig. 1e) were developed using Kmeans and Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) algorithms in sequence (Fig. 2). As initial step, K-means was employed to determine the number of drying phases (i.e. classes) and to label each sample as belonging to a specific class on the basis of the observed changes in moisture content, water activity, CIELab colour and soluble solids content. K-means is a partitional clustering method belonging to the group of the unsupervised hierarchical cluster analyses. The selection of the most appropriate cluster solution was performed by computing both actual and random

sum of squared errors (SSE) for a maximum of 9 clusters (i.e. 9 times of dehydration). Random SSEs were computed from 300 randomized versions of the original dataset. In order to determine the optimal cluster level, the scree plots of both (1) the actual SSE versus the cluster solutions and (2) the difference between the actual and random SSEs against the cluster solutions were investigated. The best cluster level was chosen as solution at which the plot of the actual SSE versus clusters produced an “elbow” and the actual SSE differed the most from the average of the random SSEs. As a final step, the identified class membership was used as response variable (Y) for developing PLS-DA models in which the predictor variables (X) were spectral profiles. Thus, PLS-DA was used to assign each apple wedge to a specific dehydration phase on the basis

$$\text{Sensitivity rate} = \frac{\text{True Positives}}{\text{True Positives} + \text{False Negatives}} \quad (3)$$

$$\text{Selectivity rate} = \frac{\text{True Negatives}}{\text{False Positives} + \text{True Negatives}} \quad (4)$$

$$\text{Accuracy rate} = \frac{\text{True Positives} + \text{True Negatives}}{\text{Total Positives} + \text{Total Negatives}} \quad (5)$$

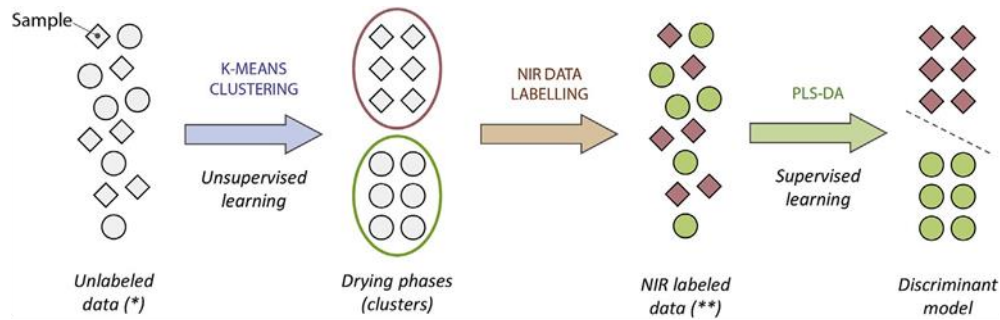


Fig.2 Flowchart of the development of classification model for drying phases detection using K-means clustering (unsupervised learning) paired to PLS-DA algorithm (supervised learning). (*) Unlabeled data corresponds to changes in water activity, moisture, colour and soluble solids content values collected during 8-h drying. (**) NIR labeled data corresponds to spectral data (X) acquired during 8-h drying and paired to class membership (i.e. response variable, Y) becoming from K-means. (For interpretation of the references

of its spectral profile. Moreover, the Interval PLS-DA (iPLSDA) algorithm was used to identify and test a maximum of 10 and a minimum of 1 wavelength. As in PLS regression model, the RMSE analysis was performed to select the optimal number of latent variables also for both PLS-DA and iPLS-DA classification models (Goodarzi et al., 2013). The classification performance of each PLSDA and iPLS-DA model was determined in terms of sensitivity (Eq. (3)), selectivity (Eq. (4)) and accuracy (Eq. (5)) rates (Dejaegher et al., 2011). In detail, accuracy rate was mainly used to select models in terms of predictivity, while sensitivity and specificity rates were jointly employed to perform a model sub-selection in terms of robustness (i.e. the capability of the model to resist to small changes in test conditions).

Similarly to what already described for the development of regression models, the dataset was randomly split in calibration and prediction sets (75% and 25% of samples, respectively) and every PLS-DA model was optimized by computing a venetian blinds cross-validation with 10 data splits.

Chemical and physicochemical attributes

Both chemical and physicochemical attributes (Fig. 1d) were immediately measured after the NIR spectral acquisitions. Colour of apple wedge was measured with a spectrophotometer (CM-2600d, Konica Minolta, Osaka, Japan). The mode used for acquiring data was CIE Standard Illuminant D65 (Daylight), Observer 10 and 6-mm diameter of measurement aperture. Four replications were performed for each sample by performing two colour measurements on two opposite sides of each apple wedge. The results were expressed according to the CIELab colour space and thus in terms of lightness (L^*), redness (a^*), yellowness (b^*), hue angle (h) and chroma (C^*) (Moscetti et al., 2013a). Moisture content was measured following the official method ‘Moisture in Dried Fruits’ - AOAC 934.06 and was expressed as a percentage by mass (grams per 100 g) (Horwitz, 2005). Water activity (a_w) was determined with an Aqua Lab (3TE, Decagon Devices Inc., Washington, USA). Soluble solids content (SSC) was measured with a digital refractometer mod. WM-7 (Atago, Tokyo, Japan) by following the method of Lavelli and Kerr (2012) with slight modifications. The vortexed and centrifuged extract of 350 mg of freeze-dried sample with 10 mL of distilled water was measured. Results were then converted on a fresh weight basis and expressed as Brix (grams of sucrose per 100 g of fresh product).

Statistical analysis and data mining

One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to evaluate statistical differences among the drying times. The Tukey's pairwise comparison method was performed, and the Honestly Significant Difference (HSD) was calculated for an appropriate level of interaction ($P < 0.05$) (Montgomery, 2001). Results were reported as the mean and standard error of the mean. Before statistical analysis, results relative to moisture content were subjected to angular transformation (i.e. $y = \frac{1}{4} \arcsin [x]^{1/2}$) to homogenize the variance (Bartlett's test) (Gomez and Gomez, 1984). The data reported in the tables and figures were back transformed.

Data handling and ANOVA were both performed using R v3.2.4 software in combination with ‘agricolae’ v1.2-3 R-package (CRAN, 2017). Chemometrics was performed using Matlab software R2015a coupled with PLS_Toolbox software v8.1 (Eigenvector Research Inc., WA, USA).

Results and discussion

In the present research work, the apple drying process was monitored using NIR spectroscopy. NIR-based regression and classification models were computed, and, in addition, it was investigated the impact of thermal treatments as enzyme inactivators on model performances.

Thermal treatment selection

The effect of thermal treatments on apple wedges was evaluated for both hot-water blanching and microwave heating treatments at pre-established range of temperature and power, respectively (Table 1). To monitor the thermal treatment, peroxidase was used as indicator enzyme due to its higher thermal stability and easiness in being assayed. In fact, the POD inactivation gives reasonable assumption that other quality-deteriorative enzymes (e.g. pectinmethylesterase, polyphenol oxidase, etc.) are also inactivated.

Inactivation kinetics were determined through semi-log plot of residual POD activity versus time. Results showed excellent linear fits ($R^2 \geq 0.93$) at all temperatures/powers studied, consistent with inactivation occurring by first-order kinetics (Fig. 3). Although all treatments reached the inactivation threshold (decimal reduction, 90%), considerably faster reductions in POD activity were only achieved with microwave heating (Fig. 3b).

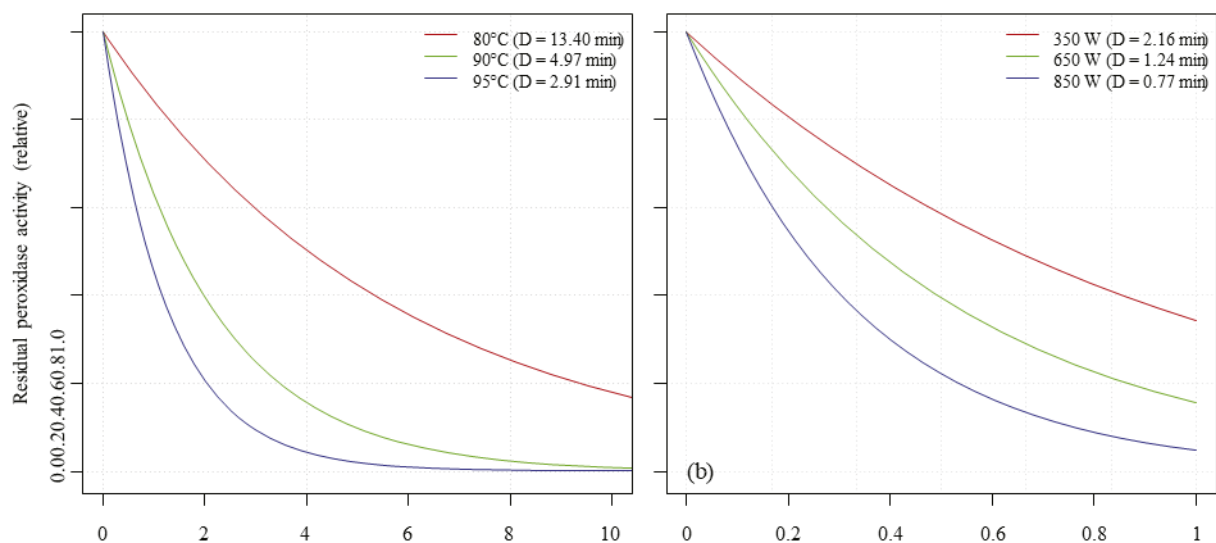


Fig. 3. First-order kinetics of the residual peroxidase activity for control (a) and microwaves (b) treatments. D-value states for decimal reduction time, which is the treatment time required to reduce the residue POD activity to at least 0.1.

In fact, hot-water blanching was less effective, showing slowest inactivation rate constants (k) (0.17, 0.46 and 0.79 min^{-1} at 80, 90 and 95 C, respectively) in comparison with microwave heating (1.08, 1.81 and 3.03 min^{-1} at 350, 650 and 850 W, respectively). Moreover, microwave treatment led to better colour retention in apple wedges than hot-water blanching (data not shown). Although the mechanism is still unclear and several controversial opinions must be faced (Awuah et al., 2007), similar results were reported by several authors (Awuah et al., 2007; Latorre et al., 2012; Matsui et al., 2008; Rattanadecho and Makul, 2016; Zheng and Lu, 2011). It seems that microwave irradiation may be more effective and faster for facing enzyme inactivation when compared with conventional methods, because of concurrent thermal (i.e. heat denaturation of protein) and non-thermal (i.e. microwaves interaction with polar and/or charged moieties of protein) effects of microwaves (Kermasha et al., 1993; Matsui et al., 2008; Olsen et al., 1966; Rattanadecho and Makul, 2016).

Eventually, the lowest decimal reduction time (D) among treatments was achieved by using microwave at 850 W for 0.77 min (~46.2 s) of irradiation. Thus, considering that the evaluation of the effects of thermal treatment on nutritional value of product was not part of the present study, microwave heating at 850 W for 45 s was selected as the most adequate treatment to obtain colour-stable apple wedges to use further in the experimentation.

Spectral data overview

Fig. 4 depicts the resulting mean relative absorbance spectra obtained from the AOTF-NIR spectrophotometer in the 1100e2300- nm spectral range. Fig. 4a and b provide information about spectral differences between treatments (i.e.control and microwave heating treatments, respectively) and among drying times. Specifically, changes in the spectral profiles during the drying process were evident to the naked eye for the control treatment only. In fact, it should be noted that drying time heavily affected the spectral characteristics in the water absorption bands (1450 and 1940 nm) (Saeys et al., 2008) and, more generally, in the higher wavelength region (1900e2300 nm), which is notably associated with carbohydrates, starch and proteins (Ambrose et al., 2016). On the other hand, microwave-heated samples apparently showed less changes in spectral shape during the drying process and less pronounced shoulders on either side of the two principal water absorption bands (1450 and 1940 nm). Results allow to speculate that those differences in spectral profile should be mainly due to both water loss and changes in forward scattering and backscattering by flesh tissue as consequence of the microwave heating treatment.

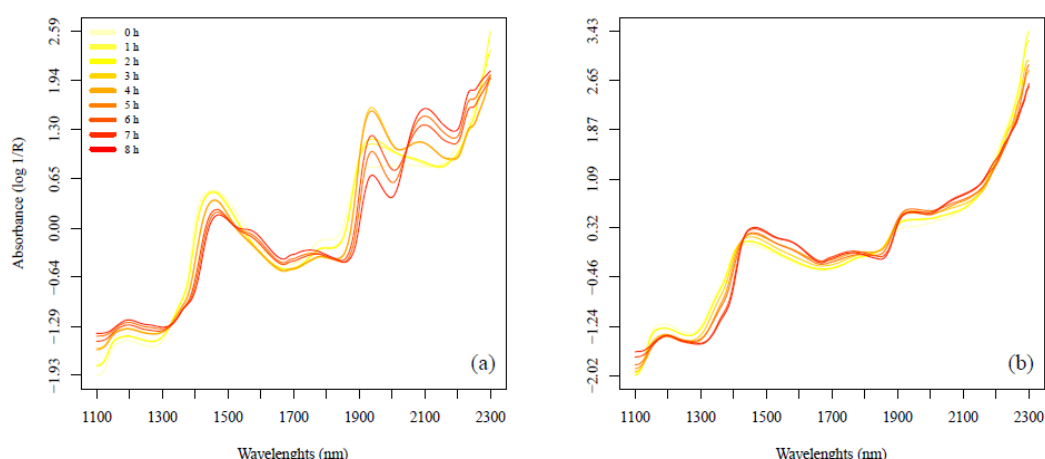


Fig. 4. Mean relative absorbance spectra for control (a) and microwave heating (b) treatments at different drying times (i.e. from 0- to 8-h drying with step of 1-h drying).

Table 2
Main effect of drying time on the chemical and physicochemical quality parameters of apple wedges. Mean values with no common letters are statistically different according to HSD ($p \leq 0.05$). Drying times were clustered in drying phases (i.e. I, II and III) according to the results obtained from the K-means cluster analysis.

Treatment	Drying phase (K-means)	Drying time (hour)	Water activity (a_w)	Moisture (relative)	SSC (Brix)	Lightness (L^*)	Redness (a^*)	Yellowness (b^*)	Hue angle (h)	Chroma (C^*)
Control	I	0	0.88 ± 0.04 a	0.89 ± 0.00 a	11.39 ± 1.43	e 71.66 ± 1.65 d	2.92 ± 0.96 c	23.30 ± 1.83 g	82.93 ± 1.97 a	23.49 ± 1.89 f
		1	0.84 ± 0.04 ab	0.85 ± 0.02 a	13.01 ± 0.35	e 71.23 ± 2.53 de	5.01 ± 0.73 b	28.71 ± 1.33 f	80.13 ± 1.02 bc	29.14 ± 1.42 e
		2	0.82 ± 0.05 b	0.83 ± 0.03 a	14.74 ± 0.52	e 68.89 ± 1.56 d	6.06 ± 0.80 b	31.59 ± 1.76 e	79.17 ± 0.99 bcd	32.17 ± 1.85 d
	II	3	0.64 ± 0.03 c	0.58 ± 0.09 b	24.85 ± 1.96	d 75.20 ± 2.38 bc	8.16 ± 1.24 a	37.67 ± 2.76 bcd	77.79 ± 1.44 de	38.56 ± 2.86 bc
		4	0.62 ± 0.03 c	0.50 ± 0.09 c	35.77 ± 4.40	c 76.65 ± 1.84 ab	6.17 ± 1.05 b	36.07 ± 2.55 d	80.34 ± 1.23 bc	36.60 ± 2.65 c
		5	0.45 ± 0.03 d	0.16 ± 0.06 e	38.85 ± 2.29	c 78.46 ± 2.69 ab	6.46 ± 2.00 b	39.28 ± 2.44 abc	80.75 ± 2.35 b	39.84 ± 2.67 ab
	III	6	0.46 ± 0.04 d	0.25 ± 0.11 d	58.50 ± 4.93	b 76.22 ± 2.85 ab	8.34 ± 2.03 a	40.48 ± 2.49 a	78.43 ± 2.50 cde	41.37 ± 2.67 ab
		7	0.45 ± 0.04 d	0.10 ± 0.04 ef	69.11 ± 5.42	a 73.13 ± 1.89 cd	8.89 ± 1.19 a	37.49 ± 2.65 cd	76.63 ± 1.73 e	38.55 ± 2.65 bc
		8	0.42 ± 0.02 d	0.10 ± 0.04 f	75.48 ± 2.64	a 73.25 ± 3.27 cd	9.03 ± 1.76 a	40.07 ± 1.67 ab	77.33 ± 2.30 de	41.11 ± 1.78 ab
		p value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
		HSD	0.04	0.06	7.59	2.72	1.60	2.56	2.09	2.68
Microwave heating	I	0	0.91 ± 0.03 a	0.87 ± 0.02 a	11.97 ± 1.15	d 44.21 ± 2.59 abc	-2.07 ± 0.45 c	13.61 ± 2.25 d	98.70 ± 1.46 ab	13.77 ± 2.27 d
		1	0.92 ± 0.02 a	0.83 ± 0.02 ab	15.20 ± 1.21	d 42.05 ± 1.46 bcd	-2.03 ± 0.75 c	13.19 ± 2.54 d	99.35 ± 4.40 a	13.38 ± 2.45 d
		2	0.88 ± 0.04 a	0.81 ± 0.02 b	16.84 ± 3.36	d 45.46 ± 1.86 ab	-1.48 ± 0.59 c	16.32 ± 2.54 cd	95.31 ± 2.14 bc	16.40 ± 2.53 cd
	II	3	0.75 ± 0.07 b	0.62 ± 0.04 c	34.25 ± 11.43	c 46.44 ± 1.16 a	-1.52 ± 0.70 c	19.28 ± 2.22 c	94.72 ± 2.34 c	19.35 ± 2.18 c
		4	0.60 ± 0.12 c	0.42 ± 0.09 d	46.75 ± 9.74	b 43.29 ± 3.98 abcd	0.54 ± 1.86 b	25.08 ± 3.95 ab	89.17 ± 3.92 d	25.14 ± 4.00 ab
		5	0.58 ± 0.11 c	0.36 ± 0.06 e	48.63 ± 12.31	b 44.44 ± 3.84 ab	1.23 ± 1.90 b	27.23 ± 3.56 a	87.80 ± 3.63 d	27.31 ± 3.64 a
	III	6	0.36 ± 0.02 d	0.19 ± 0.01 f	73.21 ± 13.23	a 40.46 ± 1.70 d	0.98 ± 0.90 b	24.64 ± 2.85 ab	87.87 ± 2.00 d	24.68 ± 2.87 ab
		7	0.35 ± 0.02 d	0.18 ± 0.02 f	63.49 ± 6.14	a 40.85 ± 2.83 cd	0.79 ± 2.03 b	22.95 ± 2.37 b	88.28 ± 4.64 d	23.04 ± 2.45 b
		8	0.32 ± 0.02 d	0.19 ± 0.03 f	73.22 ± 3.80	a 43.49 ± 7.86 abcd	3.87 ± 3.32 a	25.75 ± 6.21 ab	82.19 ± 5.37 e	26.15 ± 6.58 ab
		p value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
		HSD	0.08	0.04	10.73	3.58	1.64	3.37	3.54	3.46

Chemical and physicochemical changes

Table 2 summarizes changes in chemical and physicochemical parameters on treated (i.e. microwave heated) and untreated (i.e. control) apple wedges subjected to 8-h drying. ANOVA indicates a significant effect of drying time on each quality parameter. Moisture content and water activity gradually decreased during drying time, while SSC increased due to decline in water content. Results were perfectly in agreement with those of other authors (Denes et al., 2012; Romano et al., 2011). However, different drying behaviors between treatments were noted. In fact, microwave treated samples showed a faster decrease in water activity during drying and a higher experimental variability for SSC, probably due to the higher heterogeneity of the raw material. The data also pointed that colour of treated apple wedges was totally different from the untreated one. Microwave heating entailed less colour changes during drying and it was responsible for lower initial (0-h drying) and final (8-h drying) CIELab values of lightness (L^*), redness (a^*) and yellowness (b^*) of product. Although microwave heating better retained the colour due to reduction in enzymatic browning, colour changes during drying showed a similar trend between treatments, probably due to Maillard reaction occurrence. In general, the variation in L^* value was unclear and practically independent of thermal treatment, similarly to the results obtained by Krokida et al. (1998, 2001); while drying time was found to increase redness (a^*), yellowness (b^*) and chroma (C^*) and to decrease hue-angle (h).

The chemical and physicochemical features of 270 apple wedges per treatment were clustered using the K-means algorithm. A cluster analysis was performed in each treatment group. On the basis of the scree plots obtained for the difference between the actual and random SSEs against the cluster solutions (data not shown), the optimal cluster level was identified as three and thus samples were split into three main classes, each characterized by a specific drying period (also named ‘Drying phase I’, ‘Drying phase II’ and ‘Drying phase III’) (Table 2). Results showed that the duration of drying phases slightly differed between treatments. In fact, the control treatment showed a shorter ‘Drying phase II’ (i.e. from 3 to 4 h of drying) in comparison with the microwave heating treatment (i.e. from 3 to 5 h of drying). Data from the analysis of quality parameters and labels from the K-means analysis were both used as Y-vector for the development of regression and classification models, respectively.

Regression models

The complete calibration and prediction performances of the regression models are summarized in Table 3. PLS regression models with good or excellent predictability were obtained to monitor changes in a_w (Fig. 5a), moisture content (Fig. 5b), chroma (Fig. 5c) and SSC (Fig. 5d) of apples wedges during drying, regardless both thermal treatment and number of features used in the model. In detail, except for calibration model for chroma, the coefficient of determination (R^2) was higher than 0.96 for all the aforementioned quality parameters. Thus, for the test set validation with one quarter of the data (randomly selected) RMSEPs ranging from 0.03 to 0.04 for a_w , 0.04e0.05 for moisture content and 4.54e4.99 for SSC were obtained. The latter performance parameter was comparable with both calibration and cross-validation results. Moreover, the model obtained from feature selection (i.e. iPLS model) usually allowed to use a lower number of latent variables in comparison with full-spectrum model (i.e. PLS model). The model for chroma determination resulted in lower R^2 but still in good performance. In fact, although the correlation was smaller (R^2 from 0.77 to 0.86), the model performance was acceptable, showing a RMSEP ranging from 2.31 to 2.75. Considering that the 1100e2300-nm spectral band is not directly related to colour information, results obtained by the indirect measurement of changes in chroma can be considered very good. However, it can be speculated that by including the visible range the model performance could be improved considerably. Generally, with respect to the treatment, iPLS algorithm led to a higher number of selected features for microwave-heated samples, which also differed from the control treatment in terms of selected wavelengths. Results suggest that effect of microwave heating on water loss and changes in microstructure was pronounced, affecting the model development. Table 3 also gives an overview of the spectral pre-treatments effectively used in the selected models. In general, reducing and/ or removing uninformative variance from the raw spectral data was essential for the development of well-performing regression models as all best models use spectral pre-treatments. In fact, it can be inferred that SNV scatter correction was necessary to minimize the RMSE and thus to obtain the highest R^2 . This may either mean that the variation in light scattering negatively interfered with spectral information related to chemical and physicochemical parameters. Savitzky-Golay smoothing filter improved the prediction performance for all regression challenges. Thus, the need for a smoothing filter suggests that spectral data were slightly affected by issues due to noise and other irrelevant information. Mean centering was effective in improving regression performance through spectral resolution enhancement; in fact, this technique led to superior results as compared to those obtained from none an-centered spectra.

Table 3

Summary of performance metrics for the combinations of treatment, spectral pre-processing and regression algorithm (i.e. PLS and iPLS) complexity which gave the best results during 8-h drying.

Treatment	Parameter	Algorithm	Number of features	Wavelengths (nm)	Spectral pre-treatment			LVs ¹		RMSE ²		Bias		R ²	
					SG ³	SC ⁴	MC ⁵	C ⁶	P ⁷	C	P	C	P		
Control	a _w ^a	PLS ^c	601	1100–2300	5	SNV ⁸	Yes	4	0.03	0.03	2.2E-16	–5.7E-05	0.98	0.97	
		iPLS ^d	6	1144, 1496, 1876, 2118, 2166, 2290				4	0.02	0.03	–3.5E-16	9.1E-05	0.98	0.98	
	Moisture	PLS	601	1100–2300	5	SNV	Yes	5	0.04	0.04	1.1E-16	–4.2E-04	0.98	0.98	
		iPLS	2	1330, 1878				2	0.04	0.04	–3.1E-16	–1.3E-04	0.98	0.98	
	SSC ^b	PLS	601	1100–2300	9	SNV	Yes	5	4.48	4.86	0.00E+00	6.07E-03	0.97	0.96	
		iPLS	2	1310, 1878				2	4.61	4.63	4.49E-14	1.09E-02	0.97	0.97	
	Chroma (C*)	PLS	601	1100–2300	15	SNV	Yes	6	2.23	2.43	–7.1E-15	–1.5E-02	0.87	0.85	
		iPLS	4	1156, 1630, 2180, 2244				4	2.25	2.33	1.8E-14	–1.3E-02	0.87	0.86	
Microwave heating	a _w	PLS	601	1100–2300	9	SNV	Yes	6	0.04	0.04	0.0E+00	–7.2E-05	0.98	0.97	
		iPLS	8	1340, 1444, 1534, 1652, 1658, 1768, 1868, 1888				4	0.04	0.04	5.4E-17	3.0E-04	0.98	0.97	
	Moisture	PLS	601	1100–2300	7	SNV	Yes	8	0.04	0.05	–1.1E-16	–1.4E-03	0.98	0.97	
		iPLS	7	1140, 1354, 1424, 1438, 1876, 1892, 2108				5	0.04	0.04	4.4E-16	–3.4E-05	0.98	0.98	
	SSC	PLS	601	1100–2300	9	SNV	Yes	3	4.73	5.01	0.0E+00	–2.6E-02	0.96	0.96	
		iPLS	3	1152, 1336, 1890				2	4.48	4.59	–1.0E-14	8.5E-04	0.96	0.96	
	Chroma (C*)	PLS	601	1100–2300	5	SNV	Yes	4	2.58	2.77	–7.1E-15	–7.3E-03	0.80	0.77	
		iPLS	5	1162, 1272, 1518, 2128, 2182				5	2.40	2.48	3.0E-15	–9.2E-03	0.82	0.81	

^a Water activity.

^b Soluble Solids Content.

^c Partial Least Squares regression.

^d Interval Partial Least Squares regression.

^e Savitzky-Golay filter window.

^f Scatter correction algorithm.

^g Standard Normal Variate.

^h Mean Centering.

ⁱ Latent Variables.

^j Root Mean Squared Error.

^k Calibration.

^l Prediction.

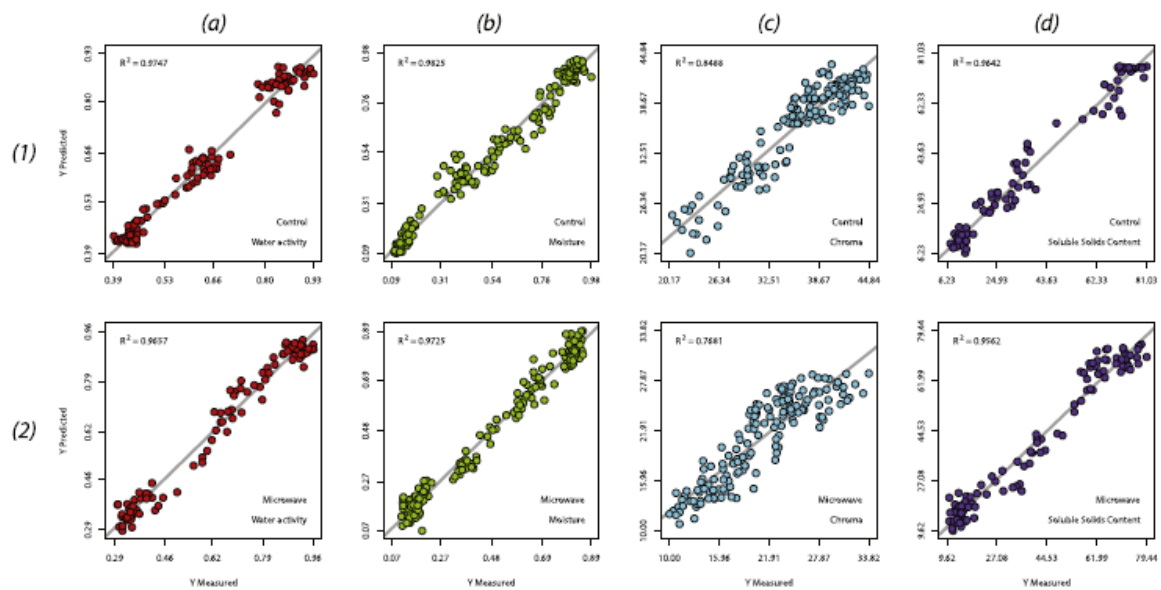


Fig. 5. PLS regression plots of Y-measured (reference) and Y-predicted (NIR) values for water activity (column a), moisture (column b), chroma (column c) soluble solids content (column d) monitored during 8-h drying in both control (row 1) and microwave (row 2) treated apples. PLS regression plots refer to models based obtained from the full spectrum.

Classification models

In Table 4 are summarized the combinations of spectral pretreatments, discriminant algorithms and features which gave the best classification performance for the assignment of each apple wedge to a specific drying phase on the basis of its spectral profile. The optimal combination of spectral pre-processing was similar of those already selected for the development regression models. Thus, in this case also, pre-treatment methods such as SNV (for baseline correction), Savitzky-Golay smoothing filter (for noise reduction) and Mean Centering (for resolution enhancement) were selected as best combination for removing/reducing unwanted background information (i.e. light scattering and noise arising from various physical and/or chemical processes). Considering the large variability observed in samples during drying, models show very high classification performances. In fact, all the models possessed very-good (>0.90) or excellent (>0.95) sensitivity and specificity rates for all drying phases (i.e. ‘Drying Phase I’, ‘Drying Phase II’ and ‘Drying Phase III’). This means that the models had a greater ability to discriminate between the classes with respect to another class. In particular, all models had the highest sensitivity rate and specificity rate for ‘Drying Phase I’ and ‘Drying Phase III’. This indicates that the classification of apple wedges as belonging or not belonging to both initial and final drying phases was the most accurate. Moreover, it should be noted that the worst predictive ability was always paired to ‘Drying Phase II’. This can probably be explained by the fact that ‘Drying phase II’ showed (1) a lower within-class similarity and (2) a higher between-class similarity than both ‘Drying Phase I’ or ‘Drying Phase III’. Feature selection demonstrated that development of a drying-phase recognition model based on few wavelengths is feasible. In particular, models obtained from a reduced number of features (i.e. iPLS-DA) showed discriminant performances very similar to models computed from the full spectrum (i.e. PLS-DA). Moreover, iPLS-DA models were always characterized by a higher variance explained by a lower number of latent variables. This is confirmed by both Fig. 6a and b, which show an example of tight pattern similarity between scores from PLS-DA and iPLS-DA models. Finally, yet importantly, the experimentation showed a negligible effect of microwave heating treatment on the performances of both PLS-DA and iPLS-DA models. However, feature selection seems to be affected by the thermal treatment as selected wavelengths were totally different between treatments. Thus, prior to implementation in industry this approach should be further validated on a larger sample size covering the most important variations expected from structural changes in apples due to the effect of both thermal treatment and drying process. Moreover, additional possible variations expected from growing apples in different regions, crop years, agro-pedo-climatic conditions and degree of

ripeness must be also investigated. Furthermore, on the basis of the results obtained, it could be very interesting to push forward the use of NIR spectroscopy for real-time monitoring of food drying in order to prove its real potential in comparison with other emerging technologies in the smart-drying sector (i.e. the electronic mucosa) (Ghasemi-Varnamkhasti and Aghbashlo, 2014).

Conclusions

In this study, the potential of near-infrared (NIR) spectroscopy in the 1100e2300-nm spectral range has been evaluated to proactively and non-destructively detect and monitor changes in quality parameters (i.e. water activity, moisture content, SSC and colour) of apple wedges (*Malus domestica* B. var. Gala) during hot-air drying. For this purpose, both PLS regression and PLS-DA classification models were developed. PLS models obtained either very good or excellent results related to the prediction of water activity, moisture content, SSC and chroma. PLS-DA algorithms obtained high accuracy rate in classifying the apple wedges in relation to drying phases based on the spectral profile. Optimal features were selected by using the interval PLS (iPLS) and PLS-DA (iPLS-DA) algorithms, which were both configured in stepwise forward mode. The impact of the microwave heating (at 850 W for 45 s) as enzyme inactivator on model performance was also investigated. Results showed that the development of regression and classification models was affected by the microwave heating treatment in terms of number of features and selected wavelengths. Consequently, the proposed method should be further validated to circumvent model robustness issues due to both water loss and microstructural changes in apples as consequence of thermal treatments. The approach proposed in this research lays the foundations for an accurate smart-drying system based on NIR spectroscopy in terms of regression and classification performances, nondestructive analysis and automation. However, the number of wavelengths required in an online drying device would be conditional of the spectral pre-treatment used. Future research should include testing wavelengths not measured by the spectrophotometer used for this study, increasing the light-beam intensity, and/or combining other chemometric methods, as these could improve the performance and the robustness of the smart-drying system. Finally, this study represents a significative step towards the development of a large-scale NIR-based smart drying systems, which allow to reduce energy demands as well as product deterioration, thus, positively impacting on overall sustainability and product quality. Currently, there is a growing need for smart processing systems which allow for simultaneous multi factor control (i.e. air temperature, velocity, humidity) to guarantee high-value end products, while enhancing energy demand and resource efficiency, by implementing innovative and reliable microcontrollers, sensors, resources,

tools and practices at low cost and embracing various R&D areas (e.g. computer vision, Vis/NIR spectroscopy, spectral imaging, deep learning, etc.).

Table 4

Summary of performance metrics for the combinations of treatment, spectral pre-processing and classification algorithm (i.e. PLS-DA and iPLS-DA) complexity which gave the best results during 8-h drying.

Treatment	Algorithm	Number of features	Wavelengths (nm)	Spectral pre-treatment			LVs ^f	Drying phase (K-means)	Drying period (hours)	Sensitivity		Specificity		Accuracy	
				SG ^c	SC ^d	MC ^e				C ^h	P ⁱ	C	P	C	P
Control	PLS-DA ^a	601	1100–2300	9	SNV ^c	Yes	3	I	0–2	1.00	1.00	0.97	0.97	0.98	0.99
								II	3–4	0.96	0.96	0.92	0.92	0.94	0.94
								III	5–8	0.97	0.97	0.99	0.99	0.98	0.98
	iPLS-DA ^b	4	1548, 1852, 2146, 2184	9	SNV	Yes	2	I	0–2	1.00	1.00	0.97	0.97	0.99	0.99
								II	3–4	0.96	0.96	0.93	0.93	0.95	0.95
								III	5–8	0.98	0.98	0.99	0.99	0.99	0.99
Microwave heating	PLS-DA	601	1100–2300	9	SNV	Yes	6	I	0–3	0.99	0.99	0.97	0.97	0.98	0.98
								II	4–5	0.95	0.92	0.87	0.87	0.91	0.89
								III	6–8	0.98	0.97	0.96	0.96	0.97	0.96
	iPLS-DA	4	1126, 1154, 1620, 2192	9	SNV	Yes	3	I	0–3	0.99	0.98	0.97	0.97	0.98	0.98
								II	4–5	0.96	0.96	0.85	0.84	0.91	0.90
								III	6–8	0.97	0.97	0.98	0.98	0.97	0.98

^a Partial Least Squares Discriminant Analysis.

^b Interval Partial Least Squares Discriminant Analysis.

^c Savitzky-Golay filter window.

^d Scatter correction.

^e Standard Normal Variate.

^f Mean Centering.

^g Latent Variables.

^h Calibration.

ⁱ Prediction.

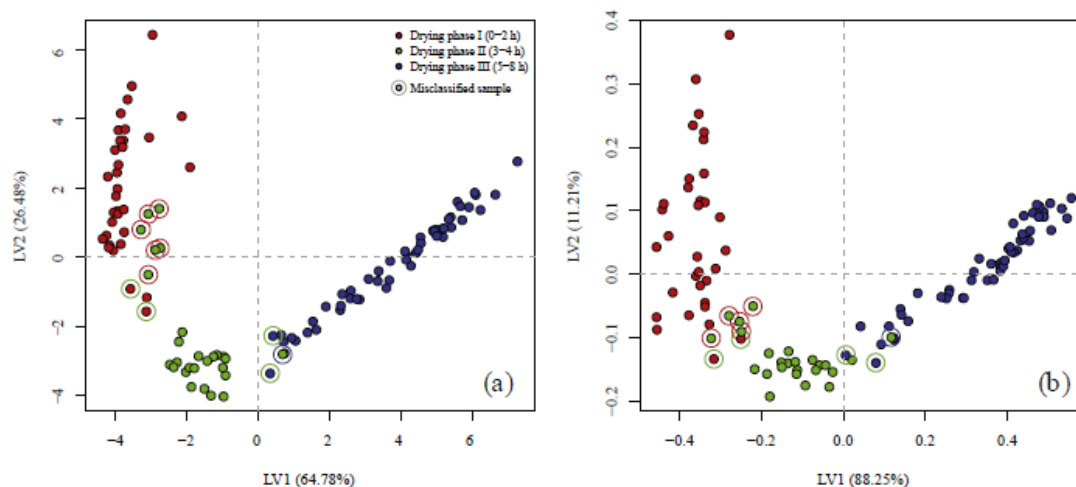


Fig. 6. Drying phases' spatial distribution plots obtained from PLS-DA (a) and iPLS-DA (b) models for '0–2 h', '3–4 h' and '5–8 h' classes (i.e. drying phases) of the control treatment. Percentages of the explained variance are reported in parentheses on the axes. Green point with red outline corresponds to 'Drying Phase II' sample misclassified as 'Drying Phase I'. Red point with green outline corresponds to 'Drying Phase I' sample misclassified as 'Drying Phase II'. Blue point with green outline corresponds to 'Drying Phase III' sample misclassified as 'Drying Phase II'. Green point with blue outline corresponds to 'Drying Phase II' sample misclassified as 'Drying Phase III'. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge CORE Organic Plus consortium (Coordination of European Transnational Research in Organic Food and Farming System, ERA-NET action) (Nr: 2814OE006) and Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali (Mipaaf, Italy) for

financial support through the SusOrganic project titled: ‘Development of quality standards and optimized processing methods for organic produce’ (Nr: 2814OE006). Moreover, our sincere thanks to the MCs Mirko Grilli for his valuable help and support during the experimentation.

Appendix A. Supplementary data
Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.11.023>.

References

- Aghbashlo, M., Hosseinpour, S., Mujumdar, A.S., 2015. Application of artificial neural networks (ANNs) in drying technology: a comprehensive review. *Dry. Technol.* 33, 1397e1462.
- Aghilinategh, N., Rafiee, S., Hosseinpour, S., Omid, M., Mohtasebi, S.S., 2016. Realtime color change monitoring of apple slices using image processing during intermittent microwave convective drying. *Rev. Agroquímica Tecnol. Aliment* 22, 634e646. <https://doi.org/10.1177/1082013216636263>.
- Akpınar, E.K., Bicer, Y., Yildiz, C., 2003. Thin layer drying of red pepper. *J. Food Eng.* 59, 99e104.
- Ambrose, A., Lohumi, S., Lee, W.H., Cho, B.K., 2016. Comparative nondestructive measurement of corn seed viability using Fourier transform near-infrared (FTNIR) and Raman spectroscopy. *Sensors Actuators, B Chem.* 224, 500e506.
- Awad, T.S., Moharram, H.A., Shaltout, O.E., Asker, D., Youssef, M.M., 2012. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: a review. *Food Res. Int.* 48, 410e427.
- Awuah, G.B., Ramaswamy, H.S., Economides, A., 2007. Thermal processing and quality: principles and overview. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 46, 584e602.
- Benlloch-Tinoco, M., Igual, M., Rodrigo, D., Martínez-Navarrete, N., 2013. Comparison of microwaves and conventional thermal treatment on enzymes activity and antioxidant capacity of kiwifruit puree. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 19, 166e172.
- Boysworth, M.K., Booksh, K.S., 2008. Aspects of multivariate calibration applied to near-infrared spectroscopy. In: Burns, D.A., Ciurczak, E.W. (Eds.), *Handbook of Near-infrared Analysis*. CRC Press, New York, USA, pp. 207e229.
- Brosnan, T., Sun, D.W., 2004. Improving quality inspection of food products by computer vision - a review. *J. Food Eng.* 61, 3e16.
- Chen, Q., Zhang, C., Zhao, J., Ouyang, Q., 2013. Recent advances in emerging imaging techniques for non-destructive detection of food quality and safety. *Trac. Trends Anal. Chem.* 52, 261e274.
- Chong, C.H., Figiel, A., Law, C.L., Wojdyło, A., 2014. Combined drying of apple cubes by using of heat pump, vacuum-microwave, and intermittent techniques. *Food Bioprocess Technol.* 7, 975e989.
- Clarka, C.J., Hockings, P.D., Joyce, D.C., Mazucco, R.A., 1997. Application of magnetic resonance imaging to pre- and post-harvest studies of fruits and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 11, 1e21.
- CRAN, 2017. Comprehensive R Archive Network. <http://cran.r-project.org>.
- de Jong, S., 1993. SIMPLS: an alternative approach to partial least squares regression. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 18, 251e263.

- Dejaegher, B., Dhooghe, L., Goodarzi, M., Apers, S., Pieters, L., Vander Heyden, Y., 2011. Classification models for neocryptolepine derivatives as inhibitors of the b-haematin formation. *Anal. Chim. Acta* 705, 98e110.
- Denes, L., Zsom-Muha, V., Baranyai, L., Felföldi, J., 2012. Modelling of apple slice moisture content by optical methods. *Acta Aliment.* 41, 39e51.
- ElMasry, G., Sun, D.-W., 2010. Hyperspectral imaging for food quality analysis and control. In: Sun, D.-W. (Ed.), *Hyperspectral Imaging for Food Quality Analysis and Control*. Academic Press, London, UK, pp. 3e43.
- Fernandez, L., Castellero, C., Aguilera, J.M., 2005. An application of image analysis to dehydration of apple discs. *J. Food Eng.* 67, 185e193.
- Gao, K., Chen, Q., Bi, J., Liu, X., Wu, X., Wang, X., 2016. Changes in browning-related components of apple slices during different stages of instant controlled pressure drop-assisted hot air drying (AD-DIC). *Int. J. Food Sci. Technol.* 51, 2242e2250. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13195>.
- Gao, K., Zhou, L., Bi, J., Yi, J., Wu, X., Zhou, M., Wang, X., Liu, X., 2017. Evaluation of browning ratio in an image analysis of apple slices at different stages of instant controlled pressure drop-assisted hot-air drying (AD-DIC). *J. Sci. Food Agric.* 97, 2533e2540. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8070>.
- Ghasemi-Varnamkhasti, M., Aghbashlo, M., 2014. Electronic nose and electronic mucosa as innovative instruments for real-time monitoring of food dryers. *Trends Food Sci. Technol.* 38, 158e166. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.05.004>.
- Ghasemi-Varnamkhasti, M., Mohtasebi, S.S., Siadat, M., 2010. Biomimetic-based odor and taste sensing systems to food quality and safety characterization: an overview on basic principles and recent achievements. *J. Food Eng.* 100, 377e387.
- Gomez, K.A., Gomez, A., 1984. *Statistical Procedures for Agricultural Research*, second ed. John Wiley & Sons Inc., New York, NY, USA.
- Goodarzi, M., Heyden, Y. Vander, Funar-Timofei, S., 2013. Towards better understanding of feature-selection or reduction techniques for Quantitative Structure-Activity Relationship models. *Trac. Trends Anal. Chem.* 42, 49e63.
- Horwitz, W., 2005. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, eighteenth ed.
- Jha, S.N., Narsaiah, K., Basediya, A.L., Sharma, R., Jaiswal, P., Kumar, R., Bhardwaj, R., 2011. Measurement techniques and application of electrical properties for nondestructive quality evaluation of foods-a review. *J. Food Sci. Technol.* 48, 387e411.
- Kermasha, S., Bisakowski, B., Ramaswamy, H., Van de Voort, F.R., 1993. Thermal and microwave inactivation of soybean lipoxygenase. *LWT - Food Sci. Technol.* 26, 215e219.
- Krokida, M.K., Maroulis, Z.B., Saravacos, G.D., 2001. The effect of the method of drying on the colour of dehydrated products. *Int. J. Food Sci. Technol.* 36, 53e59.
- Krokida, M.K., Tsami, E., Maroulis, Z.B., 1998. Kinetics on color changes during drying of some fruits and vegetables. *Dry. Technol.* 16, 667e685.
- Latorre, M.E., Bonelli, P.R., Rojas, A.M., Gerschenson, L.N., 2012. Microwave inactivation of red beet (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva*) peroxidase and polyphenoloxidase and the effect of radiation on vegetable tissue quality. *J. Food Eng.* 109, 676e684.
- Lavelli, V., Kerr, W., 2012. Apple pomace is a good matrix for phytochemical retention. *J. Agric. Food Chem.* 60, 5660e5666.

- Liu, C., Liu, W., Lu, X., Chen, W., Yang, J., Zheng, L., 2016. Potential of Multispectral Imaging for Real-time Determination of Colour Change and Moisture Distribution in Carrot Slices during Hot Air Dehydration, *Food Chemistry*. Elsevier Ltd.
- Massantini, R., Moschetti, R., Monarca, D., Cecchini, M., Contini, M., Alfani, L.M., 2009. The influence of cover crops and double harvest on storage of fresh hazelnuts (*Corylus Avellana* L.). *Adv. Hortic. Sci.* 23, 231e237.
- Matsui, K.N., Gut, J.A.W., de Oliveira, P.V., Tadini, C.C., 2008. Inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in green coconut water by microwave processing. *J. Food Eng.* 88, 169e176.
- Montgomery, D.C., 2001. *Design and Analysis of Experiments*, fifth ed. Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Moscetti, R., Carletti, L., Monarca, D., Cecchini, M., Stella, E., Massantini, R., 2013a. Effect of alternative postharvest control treatments on the storability of “Golden Delicious” apples. *J. Sci. Food Agric.* 93, 2691e2697.
- Moscetti, R., Frangipane, M.T., Monarca, D., Cecchini, M., Massantini, R., 2012. Maintaining the quality of unripe, fresh hazelnuts through storage under modified atmospheres. *Postharvest Biol. Technol.* 65, 33e38.
- Moscetti, R., Haff, R.P., Aernouts, B., Saeys, W., Monarca, D., Cecchini, M., Massantini, R., 2013b. Feasibility of Vis/NIR spectroscopy for detection of flaws in hazelnut kernels. *J. Food Eng.* 1e7.
- Moscetti, R., Saeys, W., Keresztes, J.C., Goodarzi, M., Cecchini, M., Danilo, M., Massantini, R., 2015. Hazelnut quality sorting using high dynamic range shortwave infrared hyperspectral imaging. *Food Bioprocess Technol.* 8, 1593e1604.
- Mujumdar, A.S., 2012. Editorial: the role of drying technology in sustainable R&D and innovation. *Dry. Technol.* 30.
- Nadian, M.H., Rafiee, S., Aghbashlo, M., Hosseinpour, S., Mohtasebi, S.S., 2015. Continuous real-time monitoring and neural network modeling of apple slices color changes during hot air drying. *Food Bioprod. Process* 94, 263e274.
- Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T., Davies, T., 2004. *A User-friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. NIR publications, Chichester, UK.
- Nicolai, B.M., Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K.I., Lammertyn, J., 2007. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: a review. *Postharvest Biol. Technol.* 46, 99e118.
- Olsen, C.M., Drake, C.L., Bunch, S.L., 1966. Some biological effects of microwave energy. *J. Microw. Power* 1, 45e56.
- Ozaki, Y., McClure, W.F., Christy, A.A. (Eds.), 2006. *Near-infrared Spectroscopy in Food Science and Technology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Rattanadecho, P., Makul, N., 2016. Microwave-Assisted drying: a review of the state-of-the-art. *Dry. Technol.* 34, 1e38.
- Romano, G., Nagle, M., Argyropoulos, D., Müller, J., 2011. Laser light backscattering to monitor moisture content, soluble solid content and hardness of apple tissue during drying. *J. Food Eng.* 104, 657e662.
- Sacilik, K., Elicin, A.K., 2006. The thin layer drying characteristics of organic apple slices. *J. Food Eng.* 73, 281e289.
- Saeys, W., Velazco-Roa, M. a, Thennadil, S.N., Ramon, H., Nicolai, B.M., 2008. Optical properties of apple skin and flesh in the wavelength range from 350 to 2200 nm. *Appl. Opt.* 47, 908e919.

- Savitzky, A., Golay, M.J.E., 1964. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.* 36, 1627e1639.
- Su, Y., Zhang, M., Mujumdar, A.S., 2015. Recent developments in smart drying technology. *Dry. Technol.* 33, 260e276.
- Su, Y., Zhang, M., Mujumdar, A.S., 2014. Recent developments in smart drying technology. *Dry. Technol.* 33, 260e276.
- Vega-Galvez, A., Ah-Hen, K., Chacana, M., Vergara, J., Martínez-Monzo, J., GarcíaSegovia, P., Lemus-Mondaca, R., Di Scala, K., 2012. Effect of temperature and air velocity on drying kinetics, antioxidant capacity, total phenolic content, colour, texture and microstructure of apple (var. Granny Smith) slices. *Food Chem.* 132, 51e59.
- Wang, D., Martynenko, A., Corscadden, K., He, Q., 2017. Computer vision for bulk volume estimation of apple slices during drying. *Dry. Technol.* 35, 616e624. <https://doi.org/10.1080/07373937.2016.1196700>.
- Wise, B.M., 2009. Eigen Vector Research Wiki - Using Cross-validation. <http://wiki.eigenvector.com>. (Accessed 11 September 2015).
- Xing, J., Guyer, D., Ariana, D., Lu, R., 2008. Determining optimal wavebands using genetic algorithm for detection of internal insect infestation in tart cherry. *Sens. Instrum. Food Qual. Saf.* 2, 161e167.
- Yi, J., Zhou, L., Bi, J., Chen, Q., Liu, X., Wu, X., 2015. Impacts of pre-drying methods on physicochemical characteristics, color, texture, volume ratio, microstructure and rehydration of explosion puffing dried pear chips. *J. Food Process. Preserv* 1e11.
- Zheng, H., Lu, H., 2011. Effect of microwave pretreatment on the kinetics of ascorbic acid degradation and peroxidase inactivation in different parts of green asparagus (*Asparagus officinalis* L.) during water blanching. *Food Chem.* 128, 1087e1093.

9.3 Effects of hot-water and steam blanching of sliced potato on polyphenol oxidase activity

Roberto Moschetti,¹ Flavio Raponi,¹ Danilo Monarca,² Giacomo Bedini,¹ Serena Ferri²
& Riccardo Massantini^{1*}



International Journal of Food Science and Technology 2018

¹ Department for Innovation in Biological, Agro-food and Forest System (DIBAF), University of Tuscia, Via S. Camillo de Lellis snc, 01100

Viterbo, Italy

² Department of Agricultural and Forestry Sciences (DAFNE), University of Tuscia, Via S. Camillo de Lellis snc, 01100 Viterbo, Italy

Summary

The worldwide potato production is considered the fourth-most important food sector due to the increasing use of potatoes as raw materials for high-convenience food. Enzymatic browning, due to polyphenol oxidase (PPO), is related to unacceptability by consumer. Among antibrowning agents, thermal treatments are viable alternatives. In this study, the efficacy of hot-water and steam blanching at 80–90 °C of potato slices (1-cm thick) was evaluated in terms of colour changes as well as PPO inactivation kinetics, substrate specificity and transition state parameters. In general, all treatments [1] bleached the slices, [2] inactivated PPO and [3] reduced its kinetic efficiency. Results from thermal inactivation kinetics promoted hot-water blanching at 90 °C for approx. 2 min as the fastest treatment to obtain enzymatic-stable potato slices. Moreover, steam blanching required more energy (53.93 1.24 kJ mol⁻¹) than hot-water treatment (41.41 4.51 kJ mol⁻¹) to reach the transition state and then to unfold the PPO enzyme.

Keywords Inactivation kinetic, PPO, *Solanum tuberosum* L. (var. Jelly), substrate specificity, thermal treatment, transition state.

Introduction

During the recent years, potato (*Solanum tuberosum* L.) world production has largely increased and nowadays is considered the fourth-most important food sector with a worldwide consumption of 230 million tons per year (FAOSTAT, 2017). In this context, the market demand for fresh-cut, dried, frozen and fried potatoes grown in order to respond to the increasing consumers demand for high-convenience food. Processing ability and final quality of potato products, as with many other processed fruit and vegetables, are mainly affected by pre-harvest (e.g. genotype) and post-harvest factors (e.g. processing operations), which may have an impact on product susceptibility to nutritional and sensorial losses. Consequently, preservation methods that enhance food stability by delaying physicochemical, biochemical and microbiological spoilage affect market values of perishable commodities (Moscetti et al., 2017, 2018). Colour and appearance of cut potato are crucial quality attributes; in fact, discoloration due to enzymatic browning is one of the main reasons for unacceptability by consumers. In addition, enzymatic browning also deteriorates nutritional values since phenols are oxidized to o-quinones, which are highly reactive with amino acids, proteins and other phenols, undergoing irreversible brown colour development (Ali et al., 2016). In general, the most important factors which determine the rate of enzymatic browning in cut potato are oxidative enzyme activity (i.e. polyphenol oxidase, PPO), oxygen and phenols availability as well as pH, temperature and water activity of the reaction medium (Hou et al., 2014). Thus, understanding the enzymatic oxidative processes is fundamental to (i) select and tune the proper treatment for minimizing the occurrence of browning reactions in the after-cutting stages (i.e. washing, sorting, drying, freezing, frying, packaging, storage, transportation, etc.), (ii) avoid food waste and (iii) maintain viability of producers and exporters (He & Luo, 2007). Various approaches have been extensively studied to minimize the occurrence of enzymatic browning. These methods focus on the use of cultivar selection, appropriate cutting operations, ozone treatment, blanching (e.g. hot-water, steam, etc.), additives (e.g. antioxidants, plant extracts, calcium salts, coatings, etc.), controlled atmosphere, refrigeration, packaging selection, etc. The most common additives used for quality maintenance of cut potatoes are sulphites, which are inexpensive and very effective against browning but affected by off-flavour development as well as health hazard (e.g. bronchial asthma) and marketing issues. In fact, sulphites cause symptoms similar to allergic reactions and, consequently, are subjected to government regulation in several countries (Gendel, 2012). Alternatively, blanching is frequently used prior frying, drying or freezing of cut potatoes because its capability of inactivating enzymes, and then improving appearance, processability and shelf-life of products. However, heat treatment may also lead to

quality loss and therefore it must be performed for the minimum time required to completely deactivate deleterious enzymes (Anthon & Barrett, 2002). Consequently, the duration of heat treatments is often monitored using an indicator enzyme. Blanching methods includes hot water (i.e. solution containing or not acids and/or salts), steam, microwave, infrared, ohmic and radio frequency heating (Zhang et al., 2018). While research on potato antibrowning treatments is widely reported, little insight is available on thermal inactivation of PPO enzyme in potato slices, and studies of its thermal stability and inactivation energy during blanching are poor or totally lacking. The results of the present work are a contribution to the studies on reducing enzymatic browning of cut potato by heat inactivation. For the intended purpose, the study was carried out on Jelly potato variety which is of German origin, basically created for industrial production of cut potatoes, and also suitable for packaging. Therefore, the research activity was focused on investigating the way which different factors such as type (i.e. hot water and steam blanching) and temperature of treatment (i.e. 80 and 90 °C) affect the blanching of sliced potato in terms of efficacy against PPO enzyme activity. The studies of changes in colour due to treatment as well as inactivation kinetics, substrate specificity and transition state parameters were used to measure the effectiveness of treatment applied on sample.

Materials and methods

Samples preparation

Potato tubers (*Solanum tuberosum* L. var. Jelly) were provided by an Italian fresh-cut processor (CO.P.A.VIT., Acquapendente, Italy), and immediately stored at 14 ± 0.5 °C until processing. Tubers sampling was performed by selecting sound potatoes, with uniform size. Potato tubers were washed in chlorinated water (sodium hypochlorite, NaClO 200 ppm) for 3 min, peeled and cut into slices (1-cm thick and 1.2-cm diameter; corresponding to approx. 10 ± 0.1 g) using an electric stainless-steel food slicer mod. 380 (ALA2000, Treviso, Italy). Finally, potato slices were held in chlorinated water (NaClO 50 ppm) for 3 min and then gently dried by hand with cheesecloth (Figure S1a). With the aim of complying with GMP for fresh-cut products (including sliced fresh potato), NaClO was exclusively used as antimicrobial agent because of potato susceptibility to *Bacillus* and *Clostridium* contaminations, which can survive and grow in cooked potato products (Thomas et al., 2002). Blanching is not a sterilization procedure and, thus, a two-step washing with NaClO was performed in the concentration range reported by Ruiz-Cruz et al.(2007).

Finally, samples were visually evaluated and only slices free from decay and/or blemishes were used in the experimentation.

Blanching treatments

Two different blanching methods were tested: (i) hot water and (ii) steam blanching. Both blanching methods were conducted at 80 and 90 °C for 0–10 min of heating on the basis of screening results obtained from tests conducted in a range from 60 to 90 °C. Blanching treatments at temperature lower than 80 °C were not considered in the experimentation either because D value (or decimal reduction time) exceeding 5 min or because of lack of effectiveness in reducing PPO enzymatic activity for a limited time of 15 min (Figure S2). In fact, blanching tests were set up to ensure a polyphenol oxidase inactivation of 90% in a reasonable treatment time. This level of inactivation was fixed as threshold in order to allow the produce to become stable and, thus, in line with industrial requirements (Moscetti et al., 2017, 2018). The experimental plan is reported in Table S1. Both hot-water and steam blanching treatments were performed in a temperature-controlled water bath with a maximum capacity of 25 L (Astor 800D, Astori Tecnica, Brescia, Italy) (Figure S1b and c respectively). Regarding the steam blanching, it consisted in injecting steam through an ~8.75-L chamber (i.e. ~10 9 35 9 25 cm) in which potato slices were placed. Steam temperature was monitored with a 10-k Ω thermistor coupled to an Arduino Micro board, calibrated and validated in a temperature range of 20–90 °C (Figure S3). In all treatments, almost 0.5 kg potatoes were blanched. Regarding hot-water blanching, potato slices were uniformly dipped and the product:water ratio was 1:10 (w/v).

After blanching treatment, samples were immediately cooled for 3 min in ice-water and the residual PPO enzymatic activity was evaluated. Each blanching treatment was repeated in triplicate.

Colour analysis

Potato slice colour before and after blanching was measured with a spectrophotometer (CM-2600d, Konica Minolta, Osaka, Japan) according to Radicetti et al. (2016). Eight potato slices were used for each blanching condition and four replications were performed for each sample. Results were expressed according to the CIELab colour space. Colour was also evaluated in terms of white/yellow ratio (L^*b^{*1}) and whiteness index ($WI = [(100 L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$) (Pathare et al., 2013).

Polyphenol oxidase activity

Enzyme extraction

Enzyme extraction was carried out in accordance with Massantini et al. (2009). Fresh-cut potato samples were collected, submerged in liquid nitrogen until completely frozen, and then immediately grinded into frozen powder by an analytic mill (IKA A11 basic; IKA Labortechnik, Staufen, Germany). Ten grams of potato powder were homogenized with 10 mL of chilled phosphate-buffered saline solution (PBS, 0.1 M, pH 7.2) containing 1.5% (w/v) of polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) and 0.1% of Triton X-100. The mixture was centrifuged at 12 000 g for 20 min at 4 ± 0.5 °C; the supernatant was collected and stored at 4 ± 1 °C prior to the enzymatic assay.

Enzyme activity measurement

Polyphenol oxidase (PPO) activity was measured by following the method of Moschetti et al. (2012) with slight modifications. The assay was performed using an UV-Vis scanning spectrophotometer (Lambda 25; PerkinElmer, Waltham, MA, USA) at 420 nm for 2 min. The final reaction mixture contained 0.2 mL of crude enzyme, 1.5 mL of PBS (0.1 M, pH 7.2), 0.15 mL of catechol 1 M and 1.2 mL of distilled water. One unit of enzyme activity (U) was defined as an increase in absorbance of 0.001 min⁻¹. PPO enzymatic activity was expressed on dry weight basis. Enzyme activity was measured in triplicate.

Thermal inactivation kinetic

The rate constant for first-order inactivation (k) was computed from the slope of the linear regression of natural log of residual activity vs. time of thermal treatment, according to eqn 1.

$$\ln \frac{V_t}{V_0} = -kt,$$

where V_0 is the initial enzyme activity (U), t is the time of heating (min), V_t is the activity after heating for time t , and k is the inactivation rate constant (min⁻¹).

The non-linear (weighted) least-squares algorithm was used to estimate the optimal k -value of the non-linear inactivation model. Model performances were evaluated in terms of coefficient of determination (R^2) and Root Mean Squared Errors (RMSE).

The inactivation time was computed as D-value (or decimal reduction time), which is the treatment time required to reduce the enzyme activity to at least 0.1 (i.e. 10%) of its original value, according to eqn. 2.

$$D = \frac{2.303}{k},$$

Finally, both Z-value and the half-life time ($t_{1/2}$) were computed, which are defined as the number of degrees temperature needed to be increased in order to achieve a 1 $\log_{10}$ reduction in the D-value and the time required for the enzyme activity to reduce to 50% its initial value respectively.

Substrate specificity

The inhibition type of thermal processing on PPO activity was determined for both hot-water and steam blanching at 80 and 90 °C. The reaction mixture consisted of nine different concentrations of catechol ranging from 0.01 to 1 M and 0.2 mL of the crude enzyme. Results were plotted as a Lineweaver–Burk plot, according to Eqns 3 and 4.

where V is the reaction rate (U gDW^{-1}), K_m is the Michaelis–Menten constant expressed as molar concentration (M), $V_{\max}$ is the maximum reaction rate ($\text{U gDW}^{-1} \text{ M}^{-1}$) and $[S]$ is the catechol

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]},$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}},$$

concentration (M). The catalytic efficiency was calculated as $V_{\max} K_m^{-1}$ ratio.

Transition state parameters

The inactivation kinetics (k) dependence from the temperature and the activation energy ($\Delta E^\ddagger$) were both determined using the Arrhenius's law (eqn 5).

$$\ln(k) = \ln(k_{\text{ref}}) - \frac{\Delta E^\ddagger}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{ref}}} \right),$$

where k_{ref} is the inactivation rate at the reference temperature (T_{ref}) and R is the universal gas constant ($8.3144 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$). By establishing k and $\Delta E^\ddagger$ values, it is possible to obtain transition

$$\Delta H^\ddagger = \Delta E^\ddagger - RT,$$

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln \frac{kh}{K_B T},$$

$$\Delta S^\ddagger = \frac{(\Delta H^\ddagger - \Delta G^\ddagger)}{T},$$

state parameters according to absolute reaction rate theory (Forsyth et al., 1999). Consequently, changes in the activation enthalpy ($\Delta H^\ddagger$), activation Gibbs free energy ($\Delta G^\ddagger$), $\ddagger$ activation entropy ($\Delta S^\ddagger$) and normalised activation $\ddagger$ entropy (TDS) for enzyme heat-inactivation were determined using Eqs. 6–8.

Where K_B is the Boltzmann's constant ($1.3806 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), h is the Planck's constant ($6.6262 \cdot 10^{-34} \text{ J s}^{-1}$), and k is the inactivation rate constant (s^{-1}) at the studied temperature. Finally, the isokinetic temperature was graphically determined using the criterion proposed by Exner (1970).

Statistical analysis

Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed to evaluate statistical differences among factors. The Tukey's pairwise comparison method was performed and the Honestly Significant Difference (HSD) was calculated for an appropriate level of interaction ($P \leq 0.05$). Results were reported as the mean and standard error of the mean. Lineweaver–Burk and velocity substrate profile were computed using Matlab software R2015a. Data handling and ANOVA were both performed using R v3.2.4 software in combination with 'agricolae' v1.2-3 R-package.

Results and discussion

Potato slices were treated with hot-water and steam blanching; the impact of each treatment as PPO enzyme inactivator was investigated by evaluating non-linear first-order inactivation kinetics, substrate specificity and transition state parameters. In addition, the impact of treatments on slices colour was also investigated.

Thermal inactivation kinetic

The effect of thermal treatment on potato slices was evaluated for both hot-water and steam blanching over the pre-established range of temperature (i.e. 80 and 90 °C) (Table 1), which was chosen on the basis of the well-known potato heat-injury resistance (Yemenicioglu, 2002). To monitor the thermal treatment, PPO was used as indicator enzyme due to its relationship with enzymatic browning (Martinez & Whitaker, 1995).

Inactivation kinetics was determined through semilog plot of residual PPO activity vs. time. Results showed excellent linear fits ($R = 0.97/0.99$), and the straight lines extrapolated back to a common point for all treatments, consistent with the inactivation occurring by first-order kinetics (Fig. 1a). Moreover, investigation through non-linear least square regression demonstrated that the non-linear first-order kinetic well fits the process over the heating time (Fig. 1b).

Factors	k (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	D (min)	Z (°C)
Blanching (B)				
Water	$0.996 \pm 0.087\text{a}$	0.725 ± 0.062	2.403 ± 0.208	$60.66 \pm 5.99\text{a}$
Steam	$0.742 \pm 0.083\text{b}$	0.995 ± 0.110	3.307 ± 0.366	$45.68 \pm 1.23\text{b}$
<i>Pr</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.01
<i>HSD</i>	0.065	—	—	13.04
Temperature (T)				
80 °C (353.15°K)	$0.682 \pm 0.056\text{b}$	1.052 ± 0.085	3.493 ± 0.283	
90 °C (363.15°K)	$1.057 \pm 0.060\text{a}$	0.668 ± 0.038	2.217 ± 0.126	
<i>Pr</i>	<0.001	<0.001	<0.001	
<i>HSD</i>	0.065	—	—	
Blanching (B) $\times$ Temperature (T)				
Water 80 °C (353.15°K)	0.805 ± 0.015	$0.863 \pm 0.015\text{b}$	$2.863 \pm 0.052\text{b}$	
Water 90 °C (363.15°K)	1.187 ± 0.030	$0.587 \pm 0.013\text{d}$	$1.943 \pm 0.047\text{d}$	
Steam 80 °C (353.15°K)	0.558 ± 0.005	$1.240 \pm 0.012\text{a}$	$4.123 \pm 0.035\text{a}$	
Steam 90 °C (363.15°K)	0.926 ± 0.018	$0.750 \pm 0.015\text{c}$	$2.490 \pm 0.053\text{c}$	
<i>Pr</i>	ns	<0.001	<0.001	
<i>HSD</i>	—	0.085	0.085	

k , first-order reaction rate constant; $t_{1/2}$, half-life time; D , decimal reduction time, Z , thermal resistance constant.

Table 1 Summary of the main effects of blanching and temperature on thermal inactivation parameters. Mean values ($\pm$ SE) belonging to the same factor without common letters are statistically different according to HSD ($P \leq 0.05$)

Model showed that half the total of PPO activity was rapidly inactivated in less than 1 min in all treatments except for the steam blanching at 80 °C, which showed a half-life time ($t_{1/2}$) of 1.240 min. In fact, the magnitude of non-linearity observed was greater during approx. 1 min of treatment. Thus, in our experimentation, the observed rapid loss of PPO activity seemed to be related with a simple first-order model that assumed two isoforms of the enzyme. The existence of labile and resistant isoforms of PPO was already demonstrated in various fruit and vegetables (Ayaz et al., 2008); however, different patterns of PPO isoforms were found in potato tubers among cultivars and during the time-course of storage (Marri et al., 2003). These multiple isoforms

seems to be responsible for complex inactivation kinetics at heating temperature lower than 70 °C, as already observed by Anthon & Barrett (2002).

Although all heat-inactivation processes reached the inactivation threshold (i.e. decimal reduction time, Dvalue), considerably faster reduction in PPO activity was obtained by treatments at 90 °C, which showed a faster inactivation rate constant ($k = 1.057 \text{ min}^{-1}$) in comparison with the 80 °C ones ($k = 0.682 \text{ min}^{-1}$). Moreover, the k constant revealed the minor effectiveness of steam blanching in reducing PPO activity. Infact, assuming the same temperature of treatment, hotwater blanching always outdid steam blanching in terms of D-value, probably because water ensure a better contact between product and medium which resulted in higher heat transfer rate (Sotome et al., 2009). Specifically, the lowest D-value among treatments was achieved by hot-water blanching at 90 °C for 1.943 min of dipping. Regarding the Z-value, which is the temperature needed to vary D-value one log-unit, it was smallest in steam treatment. This indicates that a variation in steam temperature affected more intensely the stability of PPO activity in potato slices.

Finally, although blanching treatments were performed to be as uniformly as possible, considering that evaluation of typical issues from both steam blanching (i.e. the high risk of non-uniform blanching effect) and hot-water blanching (i.e. loss of flavours and nutrients such as vitamins, minerals, carbohydrates, sugars, phenols and proteins caused mainly by leaching and/or diffusion) (Xiao et al., 2017) were not part of this study and should be further investigated, results from thermal inactivation kinetics allows to speculate that hot-water blanching at 90 °C for approx. 2 min may be considered as the most adequate treatment in order to ensure a PPO inactivation of 90% in potato slices of 1-cm thickness.

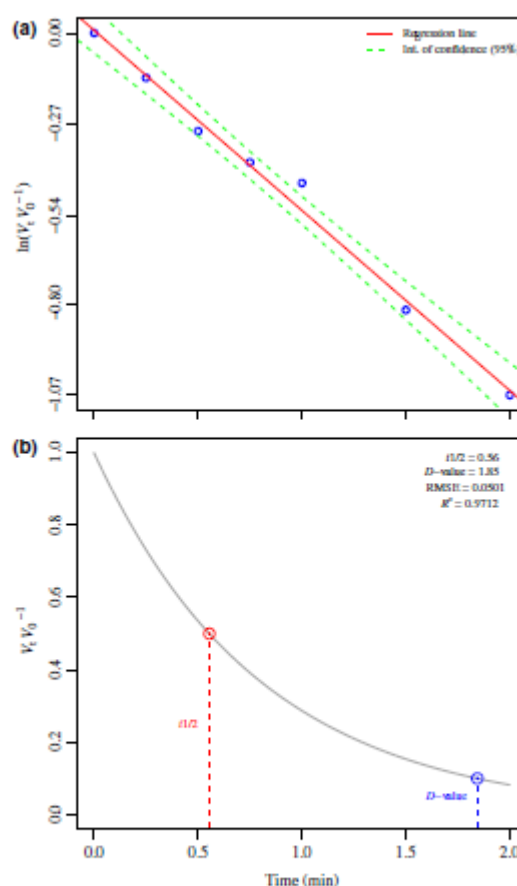


Figure 1 Semi-log (a) and non-linear (b) first-order plots for the heat inactivation of potato slices' polyphenol oxidase in hot-water at 90 °C. Half-life time ($t_{1/2}$) and decimal reduction time (D-value) are treatment times required to reduce the residual polyphenol oxidase activity to at least 0.5 and 0.1 respectively

Effect of blanching on substrate specificity

PPO activity showed a typical Michaelis–Menten profile in all tests. Kinetic parameters were calculated from the Lineweaver–Burk double reciprocal plot (Fig. 2a) and in all cases regressions were linear, showing coefficient of determination ranging from 0.98 to 0.99. Results were reported in Table 2. The K_m values showed that potato PPO had lower affinity for the substrate (i.e. catechol) when samples were subjected to hot-water blanching. In fact, PPO enzyme became kinetically less reactive in potato slices blanched in hot-water. Regarding V_{max} value (Fig. 2b), which is positively related to the enzyme concentration, it significantly dropped in all heating treatments. In addition, the catalytic efficiency (i.e. $V_{max} K_m^{-1}$) provided additional useful information to establish which was the most performing treatment in reducing enzyme efficiency. Thus, the lowest $V_{max} K_m^{-1}$ value corresponded to the hot-water blanching, then followed by the steam treatment, while, as expected, the control was characterized by the highest catalytic efficiency. Results did not show any impact of treatment temperature on the $V_{max} K_m^{-1}$ value. Finally, it is possible to assert that both hot-water and steam blanching not only inactivated part of the enzyme, but also affected the kinetic efficiency of the remaining PPO. However, the overall assumption is that hot-water blanching was more effective in reducing substrate specificity of potato's PPO.

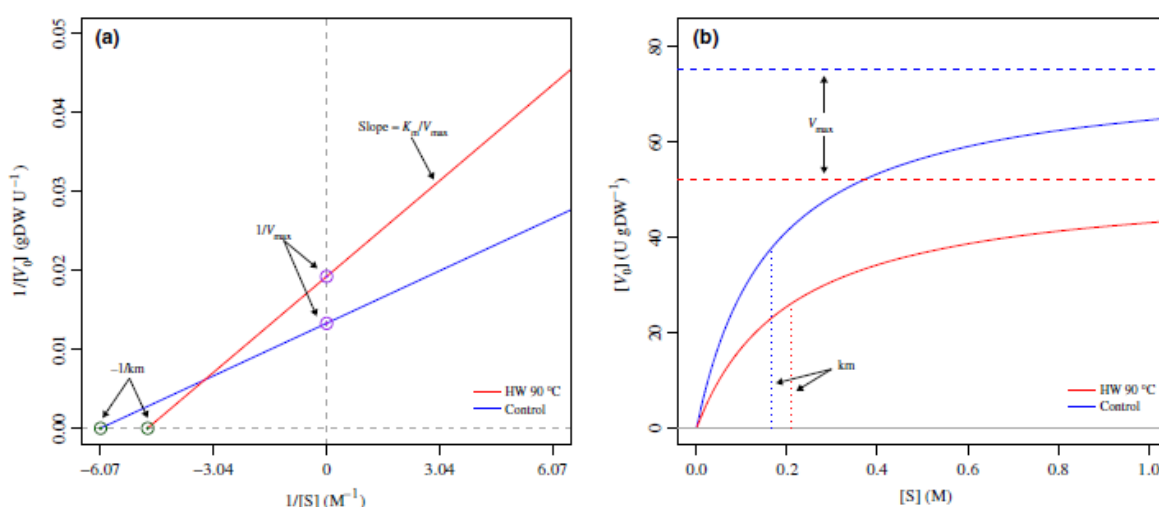


Figure 2 Lineweaver–Burk double reciprocal plot (a) and velocity substrate profile (b) for polyphenol oxidase extract from control (blue line) and blanching (red line, i.e. hot-water at 90 °C) samples. K_m = Michaelis constant; V_{max} = maximum velocity.

Table 2 Summary of the main effects of thermal treatment on kinetic parameters. Mean values ($\pm$ SE) without common letters are statistically different according to HSD ($P \leq 0.05$)

Factor	K_m (M)	V_{max} (U gDW ⁻¹)	$V_{max} K_m^{-1}$ (U gDW ⁻¹ M ⁻¹)
Control	0.133 $\pm$ 0.025ab	87.06 $\pm$ 4.81a	708.10 $\pm$ 162.23a
Hot-water @ 80 °C	0.213 $\pm$ 0.027a	37.93 $\pm$ 3.14c	180.60 $\pm$ 9.44b
Hot-water @ 90 °C	0.208 $\pm$ 0.003a	52.19 $\pm$ 0.84b	251.00 $\pm$ 0.98b
Steam @ 80 °C	0.109 $\pm$ 0.009b	48.50 $\pm$ 0.89bc	449.70 $\pm$ 29.56ab
Steam @ 90 °C	0.100 $\pm$ 0.016b	47.63 $\pm$ 2.18bc	494.80 $\pm$ 51.49ab
<i>Pr</i>	<0.01	<0.001	<0.01
<i>LSD</i>	0.08	12.56	63.63

K_m , Michaelis constant; V_{max} , maximum velocity; $V_{max} K_m^{-1}$, catalytic efficiency.

Transition state parameters

The activation energy of PPO inactivation ($DE^\ddagger$) for both hot-water and steam blanching treatments is reported in Table 3. In general, the low $DE^\ddagger$ values highlighted the fragility of the potato PPO enzyme and then its easiness to be inactivated by heat exposure, regardless the blanching factor. The different type of thermal treatment significantly affected the amount of activation energy required. In fact, hot-water blanching acted by lowering the $DE^\ddagger$ and then showed a slightly superior effectiveness in inactivating the PPO in comparison with the steam treatment. In addition, results necessarily mean that the inactivation process in steam treatment was more temperature dependent than in hot-water, and that the inactivation process through steam blanching run very slowly at low temperature, but relatively fast at high temperatures.

$DH^\ddagger$, $DS^\ddagger$ and $TDS^\ddagger$ are enthalpy, entropy and normalized entropy of activation for transition state reaction respectively. $DH^\ddagger$ represents the difference in energy between ground state and transition state in the potato PPO inactivation process, whereas both $DS^\ddagger$ and $TDS^\ddagger$ correspond to the change in entropy when the enzyme changes from its initial state to transition state. Those parameters provide useful information about the mechanism for enzyme inactivation, such as the amount of non-covalent bonds broken and the net enzyme/solvent disorder change related with the transition state reaction (Ortega et al., 2004).

From Table 3, it is showed how higher $DH^\ddagger$ values corresponded to greater amounts of energy required to form the transition state, whereas negative $DS^\ddagger$ (or positive $TDS^\ddagger$) values suggested

conglomeration of partially unfolded enzymes (Owusu & Berthelon, 1993), which were predominantly produced during protein exposure to high temperature (Dannenberg & Kessler, 1988). In addition, $DH^\ddagger$ and $DS^\ddagger/TDS^\ddagger$ gave information about enthalpic and/or entropic heat resistance of potato PPO enzyme. Specifically, enthalpic stabilization was referred to a positive $DH^\ddagger$ value and entropic stabilization occurred when $DS^\ddagger$ was negative (or $TDS^\ddagger$ was positive). According to the obtained results, steam blanching was characterized by the highest $DH^\ddagger$ value; consequently, it required more energy than hot-water treatment to reach the transition state and then to unfold the PPO enzyme. Moreover, both hot-water and steam treatments showed enthalpic and entropic stabilization, as well as possible aggregation of partially unfolded enzyme molecules. Finally, the interaction of ‘blanching $\times$ temperature’ had significant effect on activating Gibbs free energy, which tended to increase when blanching was carried out with steam and/or using a 90 °C blanching temperature. Despite this, all $DG^\ddagger$ were at the order of magnitude expected for protein denaturation.

Table 3 Summary of the main effects of blanching and temperature on activation energy, activation enthalpy, activation Gibbs free energy, activation entropy and normalised activation entropy change values. Mean values ($\pm$ SE) belonging to the same factor without common letters are statistically different according to HSD ($P \leq 0.05$).

Factors	$\Delta E^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta H^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta G^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta S^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	$-T\Delta S^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)
Blanching (B)					
Water	41.41 $\pm$ 4.51b	38.43 $\pm$ 2.85b	100.50 $\pm$ 0.39	-0.173 $\pm$ 0.008b	62.09 $\pm$ 2.89a
Steam	53.93 $\pm$ 1.24a	50.95 $\pm$ 0.79a	101.40 $\pm$ 0.32	-0.141 $\pm$ 0.002a	50.48 $\pm$ 0.88b
Pr	<0.10	<0.01	<0.001	<0.01	<0.01
HSD	9.97	11.10	—	0.031	11.18
Temperature (T)					
80 °C (353.15°K)		44.74 $\pm$ 3.49	100.20 $\pm$ 0.24	-0.157 $\pm$ 0.009	55.45 $\pm$ 3.29
90 °C (363.15°K)		44.65 $\pm$ 3.49	101.80 $\pm$ 0.17	-0.157 $\pm$ 0.009	57.11 $\pm$ 3.39
Pr		ns	<0.001	ns	ns
HSD		—	—	—	—
Blanching (B) $\times$ Temperature (T)					
Water 80 °C (353.15°K)		38.48 $\pm$ 4.51	99.65 $\pm$ 0.05d	-0.173 $\pm$ 0.013	61.18 $\pm$ 4.46
Water 90 °C (363.15°K)		38.39 $\pm$ 4.51	101.40 $\pm$ 0.08b	-0.174 $\pm$ 0.013	62.99 $\pm$ 4.58
Steam 80 °C (353.15°K)		51.00 $\pm$ 1.24	100.70 $\pm$ 0.03c	-0.141 $\pm$ 0.004	49.73 $\pm$ 1.27
Steam 90 °C (363.15°K)		50.91 $\pm$ 1.24	102.10 $\pm$ 0.06a	-0.141 $\pm$ 0.004	51.22 $\pm$ 1.30
Pr		ns	<0.05	ns	ns
HSD		—	0.257	—	—

$\Delta E^\ddagger$, activation energy; $\Delta H^\ddagger$, activation enthalpy; $\Delta G^\ddagger$, activation Gibbs free energy; $\Delta S^\ddagger$, activation entropy; $-T\Delta S^\ddagger$, normalised activation entropy.

Figure 3 shows that the temperature dependence of the k-value was adequately described by the Arrhenius equation. From those data, an isokinetic temperature (i.e. the temperature at which all inactivation processes proceed at the same rate) of 103.33 °C was also computed. Results indicated that the sensitivity of the k value towards temperature variations was bigger in steam blanching than in hot-water treatment. However, it also meant that, below the isokinetic temperature, PPO

was more stable in steam than in hot-water. By way of explanation, under the tested conditions, the thermal inactivation of potato PPO was enhanced by the hot-water treatment.

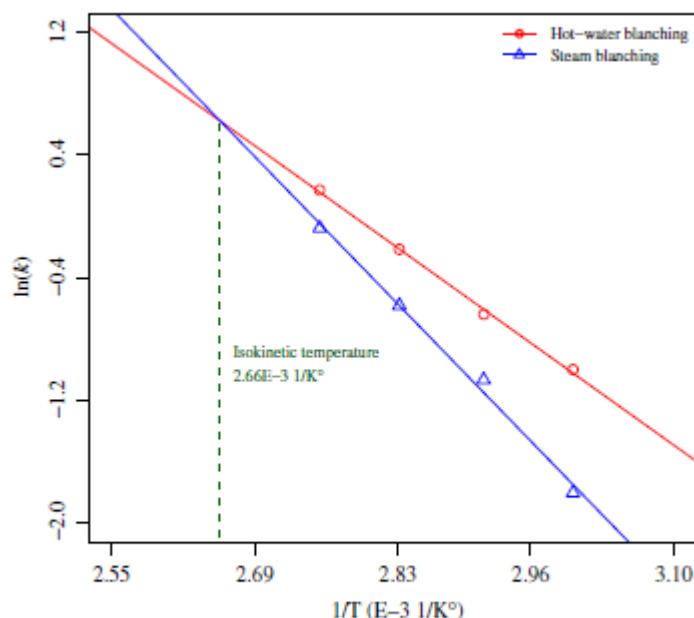


Figure 3 Temperature dependence of the k -values for thermal inactivation of PPO subjected to hot-water and steam blanching.

Colour changes due to blanching treatment

Table S2 summarizes colour changes on potato slices subjected to blanching. The two-way ANOVA indicates a significant effect only of the blanching factor on slices colour ($P \leq 0.05$). In details, the L^* value (i.e. luminance) and h (i.e. hue angle) increased in all heating treatments, especially in hot water; the a^* value (i.e. redness) equally decreased in steam and hot-water treatments, whereas no significant changes in the b^* value (i.e. yellowness) and the C^* (i.e. chroma) were noticed among levels. Although those results are extremely clear, the understanding of colour changes can be improved through both the white/yellow ratio (i.e. L^*b^{*1}) and the whiteness index (WI). In fact, a higher L^*b^{*1} value correspond to a brighter colour (Alvarez et al., 2005), whereas a lower WI-index value means potato slices tend to be whiter. Finally, results showed a more pronounced bleaching effect in hot-water blanching. No treatments were responsible for heat injury or browning development.

Conclusions

The results showed that both thermal treatments can efficiently inactivate potato PPO in less than 5 min. However, although all thermal treatments showed their feasibility in reducing the tendency

of browning in minimally processed potatoes, type and temperature of treatment significantly affected the inactivation rate constant and stability of enzyme ($P \leq 0.05$). Consistent with blanching temperature, hot-water enhanced thermal inactivation of PPO and was always faster than steam in reducing PPO activity to at least 10% of its original value. Below the isokinetic temperature (i.e. 103.33 °C) PPO was more stable in steam than in hot water. In fact, results showed that steam blanching required more energy than hot-water treatment to reach the transition state and then to unfold the PPO enzyme. Despite this, all treatments were able to inactivate part of the enzyme and reduce the kinetic efficiency of remaining PPO. All blanching treatments were responsible for potato slices' discoloration (i.e. bleaching), although the effect was significantly more pronounced in hot-water. Finally, although this study provides valuable information in order to understand the effect of both hot water and steam blanching treatments at 80 and 90 °C on the PPO enzyme stability, the selection of the best blanching method cannot disregard the impact of treatment on sensorial and nutritional quality of freshcut potato (var. Jelly) as well as its storability.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge [1] CORE Organic Plus consortium (ERA-NET action) and Mipaaf (Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali - Italy) for financial support through the SusOrgPlus project (D.M. 20/12/2017, n. 92350) and [2] the 'Departments of excellence 2018' program (i.e. 'Dipartimenti di eccellenza') of the Italian Ministry of Education, University and Research for the financial support through the 'Landscape 4.0 food, wellbeing and environment' (DIBAF department of University of Tuscia) Moreover, our sincere thanks to (1) the CO.P.A.VIT. (Acquapendente, Latium region, Italy) for the potato samples and (2) Gianpaolo Moschetti for the English language revision of the manuscript.

References

- Ali, H.M., El-Gizawy, A.M., El-Bassiouny, R.E.I. & Saleh, M.A. (2016). The role of various amino acids in enzymatic browning process in potato tubers, and identifying the browning products. *Food Chemistry*, 192, 879–885.
- Alvarez, M.D., Fernandez, C. & Canet, W. (2005). Effect of freezing/thawing conditions and long-term frozen storage on the quality of mashed potatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2327–2340.
- Anthon, G.E. & Barrett, D.M. (2002). Kinetic parameters for the thermal inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes kinetic parameters for the thermal inactivation of qualityrelated enzymes in carrots and potatoes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 4119–4125.
- Ayaz, F.A., Demir, O., Torun, H., Kolcuoglu, Y. & Colak, A. (2008). Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. *Food Chemistry*, 106, 291–298.
- Dannenberg, F. & Kessler, H.-G. (1988). Reaction kinetics of the denaturation of whey proteins in milk. *Journal of Food Science*, 53, 258–263.
- Exner, O. (1970). Determination of the isokinetic temperature. *Nature*, 227, 366–367.
- FAOSTAT (2017). Production quantities of Potatoes by country [Internet document].
- Forsyth, J.L., Apenten, R.K.O. & Robinson, D.S. (1999). The thermostability of purified isoperoxidases from *Brassica oleracea* VAR. *gemmifera*. *Food Chemistry*, 65, 99–109.
- Gendel, S.M. (2012). Comparison of international food allergen labeling regulations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 63, 279–285.
- He, Q. & Luo, Y. (2007). Enzymatic browning and its control in fresh-cut produce. *Stewart Postharvest Review*, 3, 1–7.
- Hou, Z., Feng, Y., Wei, S. & Wang, Q. (2014). Effects of curing treatment on the browning of fresh-cut potatoes. *American Journal of Potato Research*, 91, 655–662.
- Marri, C., Frazzoli, A., Hochkoeppler, A. & Poggi, V. (2003). Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry*, 63, 745–752.
- Martinez, M.V. & Whitaker, J.R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 195–200.
- Massantini, R., Moschetti, R., Monarca, D., Cecchini, M., Contini, M.-M. & Alfani, L.M. (2009). The influence of cover crops and double harvest on storage of fresh hazelnuts (*Corylus avellana* L.). *Advances in Horticultural Science*, 23, 231–237.

- Moscetti, R., Frangipane, M.T., Monarca, D., Cecchini, M. & Massantini, R. (2012). Maintaining the quality of unripe, fresh hazelnuts through storage under modified atmospheres. *Postharvest Biology and Technology*, 65, 33–38.
- Moscetti, R., Haff, R.P., Ferri, S. et al. (2017). Real-time monitoring of organic carrot (var. Romance) during hot-air drying using nearinfrared spectroscopy. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 2046– 2059.
- Moscetti, R., Raponi, F., Ferri, S., Colantoni, A., Monarca, D. & Massantini, R. (2018). Real-time monitoring of organic apple (var. Gala) during hot-air drying using near-infrared spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 222, 139–150.
- Ortega, N., De Diego, S., Perez-Mateos, M. & Busto, M.D. (2004). Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chemistry*, 88, 209–217.
- Owusu, R.K. & Bertholon, N. (1993). A test for the two-stage thermoinactivation model for chymotrypsin. *Food Chemistry*, 48, 231–235.
- Pathare, P.B., Opara, U.L. & Al-Said, F.A.J. (2013). Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 36–60.
- Radicetti, E., Massantini, R., Campiglia, E., Mancinelli, R., Ferri, S. & Moscetti, R. (2016). Yield and quality of eggplant (*Solanum melongena* L.) as affected by cover crop species and residue management. *Scientia Horticulturae*, 204, 000–000.
- Ruiz-Cruz, S., Acedo-Felix, E., Diaz-Cinco, M., Islas-Osuna, M.A. & Gonzalez-Aguilar, G.A. (2007). Efficacy of sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* populations on fresh-cut carrots. *Food Control*, 18, 1383–1390.
- Sotome, I., Takenaka, M., Koseki, S. et al. (2009). Blanching of potato with superheated steam and hot water spray. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 1035–1040.
- Thomas, L.V., Ingram, R.E., Bevis, H.E., Davies, E.A., Milne, C.F. & Delves-Broughton, J. (2002). Effective use of nisin to control *Bacillus* and *Clostridium* spoilage of a pasteurized mashed potato product. *Journal of Food Protection*, 65, 1580–1585.
- Xiao, H.W., Pan, Z., Deng, L.Z. et al. (2017). Recent developments and trends in thermal blanching – A comprehensive review. *Information Processing in Agriculture*, 4, 101–127.
- Yemenicioglu, A. (2002). Control of polyphenol oxidase in whole potatoes by low temperature blanching. *European Food Research and Technology*, 214, 313–319.
- Zhang, Z., Wang, J., Zhang, X. et al. (2018). Effects of radio frequency assisted blanching on polyphenol oxidase, weight loss, texture, color and microstructure of potato. *Food Chemistry*, 248, 173–182.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Simplified step-by-step representation of (a) sample preparation, (b) hot-water blanching and (c) steam blanching procedures.

Figure S2. Screening results of the effects of blanching (i.e. hot-water blanching and steam blanching) and temperature (i.e. 60, 70, 80 and 90 °C) on both halflife time ($t_{1/2}$) and decimal reduction time (D-value). Tests were carried out for 0, 0.5, 1, 1.5, 3, 5, 10 and 15 min of treatment. PPO enzyme activity was measured in triplicate. (*) No thermal inactivation was observed for sample blanched at 60 °C, regardless the type of blanching treatment.

Figure S3. Linear regression plot (a) and prediction error plot (b) of Y-measured (reference temperature) vs. Y-predicted (predicted temperature) and Y-measured vs. prediction error, respectively, from data obtained using a digital thermometer based on the Arduino microcontroller.

Table S1. Experimental design for the hot-water and the steam blanching treatments. HW, hot-water blanching; ST, Steam blanching

Table S2. Summary of the main effects of blanching on colour parameters. Mean values (SE) belonging to the same factor without common letters are statistically different according to HSD ($P \leq 0.05$).

10.0 Pubblicazioni in fase di stesura

10.1 Application of low-cost RGB sensor to detect basil (*Ocimum basilicum* L.) nutritional status at pilot scale level

Massimo Brambilla^{1*}, Elio Romano¹, Marina Buccheri², Maurizio Cutini¹, Pietro Toscano¹, Sonia Cacini³, Daniele Massa³, Serena Ferri⁵, Danilo Monarca⁵, Marco Fedrizzi⁴, Gianluca Burchi³ and Carlo Bisaglia¹

¹ Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Research Centre for Engineering and Agro-Food Processing, via Milano 43, 24047 Treviglio (BG), Italy;

² Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), -Research Centre for Engineering and Agro-Food Processing, Via G. Venezian, 26 - 20133 – Milan, Italy.

³ Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Research Centre for Vegetable and Ornamental Crops, Via dei Fiori, 8 - 51017 – Pescia (PT), Italy

⁴ Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Research Centre for Engineering and Agro-Food Processing, Via della Pascolare 16 - 00015 – Monterotondo (Roma), Italy

⁵ Department of agricultural and Forestry Sciences (DAFNE), University of Tuscia, Via S. Camillo de Lellis snc, 01100 Viterbo Italy

Abstract

In this work, basil plants were fertilized with 0, 2.5 mM and 10 mM nitrogen (with different NO₃/NH₄ ratios), and then monitored using a low-power technique based on optical leaf meter and low-cost RGB sensors interfaced with the Arduino UNO board. The aim of the study was to investigate possible relations between the concentration of some plant compounds (i.e., leaf chlorophyll and flavonoids content) and the nitrogen balance index with the output data of the low-cost RGB sensor to point out its capability in discriminating among different nutritional statuses. The acquired data underwent univariate and multivariate processing. Univariate data processing pointed out that the TCS3200 readings, albeit following the different development plant had at varying administered nitrogen, can't suffice in finding suitable indices relating the sensor output with the plant nutritional status. According to multivariate processing, the indices most related to plant metabolic efficiency and colour were those the different nitrogen levels affected the most. Comparing the discriminating power of optical leaf meter and TCS3200 sensors pointed out similar discriminating behaviours even though the optical leaf meter readings allowed for better performance.

The results of this work give valuable information on what may be achieved using this approach, not only on a pilot-scale but also on full-scale greenhouse systems, with different soil and/or soilless management. A more significant number of cases are however necessary to create a more robust model for future implementation of the application of such kind of sensor.

Keywords: TCS 3200, Arduino UNO, Plant monitoring, Optical leaf meter, Nitrogen, Leaf colour

Introduction

The critical role remote sensing plays in the monitoring of agricultural crops (e.g., plant growth and development, nutritional status, biotic and abiotic stresses, and yield and quality) has been widely discussed and analyzed (Bauer, 1985; FAO, 2011, Tripodi et al. 2018). The growing dependency of agricultural practices and potential users on information timeliness requires efforts to set up easy to access data derived tools to obtain information products in a straightforward way (Atzberger 2013).

Precise management of crops relies on the monitoring of the canopy biomass and comprises deep knowledge of the production factors (i.e., fertilization, pest, diseases and weeds control, soil physicochemical characteristics, yield prediction). The achievement of this is possible with a wide variety of sensors. Among these, colour sensors allow the quantification of colour images by Red (R), Green (G) and Blue (B) values that represent the integrated responses over RGB spectral bands measured through colour filters: the RGB colour model is an additive colour model in which red, green and blue light are added together in various ways to reproduce a broad array of colours (Süsstrunk et al. 1999).

However, the specific configuration of the colour vision system affects RGB values. An accurate calibration of the sensor output (Chang and Reid 1996a and 1996b; Trémeau et al. 2008) allows the creation of a machine vision systems that makes it possible to identify agricultural crops and to estimate in real-time both yield and biomass information of the cultivated species (Kondo et al. 2000; Gejima et al. 2004; Palaniappan et al. 2004; Bendig et al. 2014; Ballestreros et al. 2018).

Within the RGB model, green has peculiar importance. As a matter of fact, the green colour is the colour of chlorophyll that is fundamental for plant metabolism (Shuvalov, 2007; Milne et al. 2015; Kume 2017) as it provides experienced farmers with useful information on plant nutritional status so that, based on it, they can set up appropriate plant management techniques (Van Niel et al. 2004; Isaac et al. 2018).

Besides plant senescence and seasonal changes, many factors like aboveground stresses and poor soil condition affect the colour of the leaves (Sicher 1999; Olszewska et al. 2008; Doi 2012; Adams et al. 1999). Among these, there are nutritional deficiencies such as nitrogen (N) deficiency that results in a yellowish colour of leaves (Pagani et al. 2009). This is extremely important in leafy crops, where the blade colour (being the outcome of the combined effect of species and growing conditions) is also a fundamental market parameter.

Sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) is one of the most widely consumed herbs in many countries (Makri et al. 2008). Its use (fresh, dried and processed) has increased worldwide following the growing interest the “Mediterranean cuisine” and in consideration of the importance of the

phenolic compounds basil plants contain (Sgherri et al. 2010; Tenore et al. 2017). These act as antioxidants, free radical scavengers and metal chelators (Rice-Evans et al. 1996; Tsai et al. 2007; Carochio et al. 2015). Many factors influence the concentrations of vitamins and phenolics in basil leaves, including soil, irrigation and climatic conditions (Nurzyńska-Wierdak et al. 2013; Chandra et al. 2014; Muráriková et al. 2017) and research has been carried out on leaf spectral profiles to help plant diagnosis when biomass measurements were not adequate (Doi 2012).

In this work, a non-intrusive, low-power monitoring technique with a low-cost RGB sensor coupled with a portable optical leaf meter is proposed to evaluate the different vigour of basil seedling fertilized with different N levels. Following sensor calibration, the data underwent univariate and multivariate processing (principal component analysis, linear discriminant analysis) to investigate a possible relation between the concentration of some plant compounds (measured with the portable optical leaf meter) and the output of the RGB sensors.

We wish to emphasize that our study was not designed as a verification of the identification “accuracy” of the leaf colour but rather to investigate an alternative way of improving the usefulness of the RGB colour system for the quality assessment of leafy vegetables by image processing.

Material and methods

The experiment took place at the CREA experimental facility of Treviglio (Bergamo, Italy: 45° 31.284' N, 9° 33.845' E). Basil seedlings were transplanted in plastic pots and grown under a tunnel greenhouse to undergo characterization at the flowering. Details on plant growing, sensor calibration and data processing are hereafter reported.

Plant growing conditions

Three hundred basil plants (*Ocimum basilicum* L.), belonging to the ‘Genovese basil’ cultivar, were hand transplanted on 25 June 2018 in one hundred 4.7-L plastic pots (three plants per pot), filled with a professional growing media, peat:perlite 50:50 v v-1.

After a week of acclimatization, meanwhile the seedlings were watered with tap water, the pots were arranged under a 12 m long, 2.5 m wide and 2 m high tunnel greenhouse covered with PVC, and they started being irrigated with five nutrient solutions characterized by three different concentrations of total nitrogen (0, 2.5 and 10 mM) and two NO₃/NH₄ ratios (Table 1). Inside the tunnel, the position of each treatment was in random order. Overall, five treatments (one for each nutrient solution, labelled T1 to T5) of 20 pots each were set up (Table 1).

Plant watering took place twice a day, and plant protection against fungi and insects made use of commercial formulations based on fluopicolide, propamocarb and deltamethrin active substances.

Element concentrations and electric conductivity	T1	T2	T3	T4	T5
N-NO₃ (mM)	-	2.50	1.67	10.0	6.67
N-NH₄ (mM)	-	-	0.83	-	3.33
P (mM)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
K (mM)	5.00	6.00	5.50	6.00	6.00
Ca (mM)	3.00	3.50	3.50	4.50	4.00
Mg (mM)	1.50	1.50	1.50	2.00	1.50
S-SO₄ (mM)	6.00	6.00	6.50	4.00	6.00
Fe (μM)	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
B (μM)	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
Cu (μM)	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Zn (μM)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Mn (μM)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Mo (μM)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
EC (mS cm ⁻¹)	1.52	1.71	1.74	2.00	2.12

Table 1 Composition of the solutions used to water the basil seedlings after the acclimatization period

At flowering, on 26th July 2018, plants underwent sampling for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll (Chl tot) and epidermal flavonoids (Flav) content (Dualox units),

and nitrogen balance index (NBI) (Cerovic et al. 2012) with the Dualex Scientific™ optical leaf-clip meter (Force -A, Paris, France). RGB values acquisition took place on the same leaves used for the above analyses using a programmable low-cost colour sensor (TCS3200 - Texas Advanced Opto electronic Solutions, USA). Afterwards, the aboveground part of the basil plants was sampled, weighed fresh and dried at 75 °C till constant weight.

Colour sensor description and calibration

According to the manufacturer, the TCS3200 light-to-frequency converter reads an 8×8 array of photodiodes. Sixteen photodiodes have blue filters, 16 photodiodes have green filters 16 photodiodes have red filters, and 16 photodiodes are clear with no filters. It operates by illuminating the object with four white LEDs (Figure 1, on the left), and the array of photodetectors (each with a red, green, blue and clear filter) interpret the reflected colour by means of a square wave output whose frequency is proportional to the reflected light (Seelye et al. 2011; Beyaz 2017). The programming of the colour sensor module for RGB acquisitions took place interfacing the TCS3200 with the Arduino UNO development board (<https://www.arduino.cc/>): this device, based on an open-source electronics platform, can operate on an external power supply from 6 to 20 volts.

When acquiring RGB values, an aluminium coated black plastic cap covered the entire sensing portion to prevent undesirable disturbance from external light (Figure 2, on the right) keeping 15 mm distance between the leaf surface at the sensor.



Figure 1: the TCS3200 sensor (on the left) and the Arduino UNO board it was connected to (in the centre) and detail of the colour sensor inside the aluminium-coated plastic shield (on the right).

To convert the frequency output of the low-cost sensor into RGB values, the sensor output was tested:

- 1) against the X-Rite Color Checker: a colour card consisting of 18 chromatic samples and 6 achromatic whose chromaticities are provided by the manufacturer (X-Rite, Michigan, USA);
- 2) against the output of a portable spectrophotometer (Mod. CM-2600d with a diffuse illumination system D65, 2° standard - Konica Minolta, Japan), using as sample objects the leaves of the basil seedlings before nitrogen supply.

Sensor calibration was therefore performed based on a Partial Least Square analysis (PLS) (Costa et al. 2009) using the reference colours of the X-Rite Color Checker that can be found in basil plants (Foliage, Green, Yellow Green, Black, Orange Yellow) together with the acquisitions of the portable spectrometer from basil seedling leaves. This operation was performed using three TCS3200 RGB sensors (labelled S1, S2 and S3): S1 and S2 were used to acquire the raw RGB values (Rraw, Graw and Braw) that afterwards underwent PLS analysis. The equations resulting from the PLS were then used to calibrate the acquisitions of the S3 sensor whose accuracy was evaluated basing on the Euclidean distance - ΔE (Eq. 1):

$$\Delta E = \sqrt{(R' - R_{ref})^2 + (G' - G_{ref})^2 + (B' - B_{ref})^2}$$

Where Rref, Gref and Bref are the red, green and blue values of the standard colour (from colour checker and standard colour analyser) and R', G' and B' are the calibrated red, green and blue values of the S3 low-cost sensor.

Data acquisition and processing

When basil plants entered the flowering phase, sampling foresaw the use of S3 sensor to acquire RGB values from the leaves of basil plants (three leaves per plant), for a whole of 900 samplings. Raw RGB values were afterwards transformed into calibrated RGBs (R', G', B') using the calibration equations obtained with the PLS processing (see 2.1). These data were used to calculate the Euclidean distance among the 5 groups of plants meant as average difference of the samples from the average R' G' B' values for the treatment 1 ((R') $\bar{1}$, (G') $\bar{1}$ and (B') $\bar{1}$):

$$\Delta E' = \sqrt{(R'_T - \bar{R}'_1)^2 + (G'_T - \bar{G}'_1)^2 + (B'_T - \bar{B}'_1)^2}$$

where “T” is the treatment and ranges from 1 to 5.

Moreover, yellow is the combination of red (R') and green (G') and it is an important colour in crop observations as the yellowish appearance of chlorotic leaves is one of the most obvious visual indications of plant stresses that reduce chlorophyll concentrations (Adams et al. 1999). Following what reported by Smith (1999) the intensity of R'G'B' yellow was calculated as:

$$R'G'B' \text{ yellow} = R' + G'$$

and a measure of the relative intensity of R' to G' was also calculated (Kondo et al. 2000) using the R'/G' ratio together with the visual perceived brightness (luminance) of the samples determined in accordance with Bockstein (1986):

$$\text{Luminance } (L') = 0.3R' + 0.59G' + 0.11B'$$

To evaluate the statistically significant differences among treatments, data underwent analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc multiple comparisons (Tuckey HSD test). Moreover, standardised data underwent also multivariate processing (Principal Components Analysis – PCA – and Linear Discriminant Analysis – LDA) using ‘‘Minitab’’ statistical software (Minitab, 2010) between the measured parameters (Chl Tot, Flav, NBI, Fresh Weight, R', G', B', Luminance, R'+G', R/G, ΔE').

Principal component analysis (PCA) is a linear, unsupervised pattern-recognition technique for analysing, classifying, and reducing the dimensionality of numerical datasets in multivariate problems (Todeschini et al. 1998). PCA analysis allows the extraction of useful information from the dataset, the exploration of its structure and global correlation of the variables.

Linear Discriminant Analysis – LDA – (Meloun et al. 1992; Todeschini et al. 1998) is one of the mostly used classification procedure which maximizes the variance between categories and minimizes the variance within categories. It was carried out with the double aim of:

- i) comparing the effectiveness of the variables acquired with the TCS3200 sensor with those acquired with the Dualex Scientific™ optical leaf-clip meter in discriminating among plant nutritional status;
- ii) investigating how variables contribute to group separation.

Results and discussion

Sensor calibration

Figure 2 reports the results of the comparison between the outputs of the low-cost sensors, the portable spectrometer, and the colour checker. The portable spectrometer (as expected) gave almost exact match of the readings. On the other hand, the raw outputs of the low-cost sensors showed a sort of inverse matching for all the three considered colours.

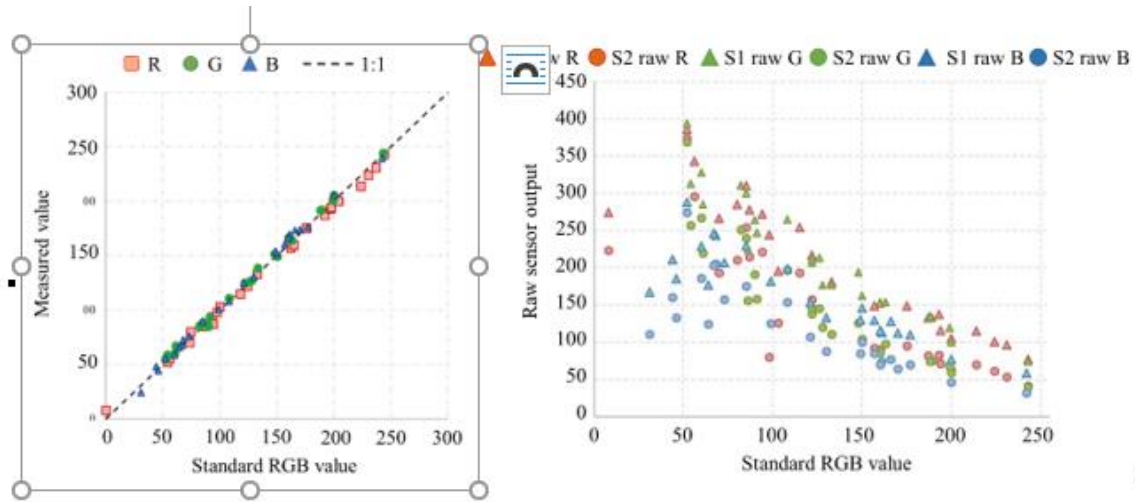


Figure-2: graphical representation of the output of the portable spectrometer (on the left) and of S1 and S2 low cost sensors (on the right) versus the standard RGB values of the Colour checker. ¶

The calibration process, which compares the sensors outputs with the reference values of the colour checker and with the readings of the portable spectrometer, resulted in the following equations:

$$R' = 109.7 - 1.21R_{\text{raw}} + 0.31G_{\text{raw}} + 0.98B_{\text{raw}} \quad (4)$$

$$G' = 129.8 - 0.037R_{\text{raw}} - 0.78G_{\text{raw}} + 0.82B_{\text{raw}} \quad (5)$$

$$B' = 64.9 + 0.232R_{\text{raw}} - 0.22G_{\text{raw}} - 0.037B_{\text{raw}} \quad (6)$$

Figure 3 reports the output of S3 calibration with the above described equations: the overall Pearson coefficient of correlation between the values is 0.89 ($p < 0.001$) meaning that the new output follows the reference values.

The average Euclidean distance of calibrated sensor readings was 27.2 when considering all the selected colours (13.9 when considering the basil seedling colours only): the calibration can be considered acceptable when this value is lower than 30 (Soolchalearn et al. 2017)

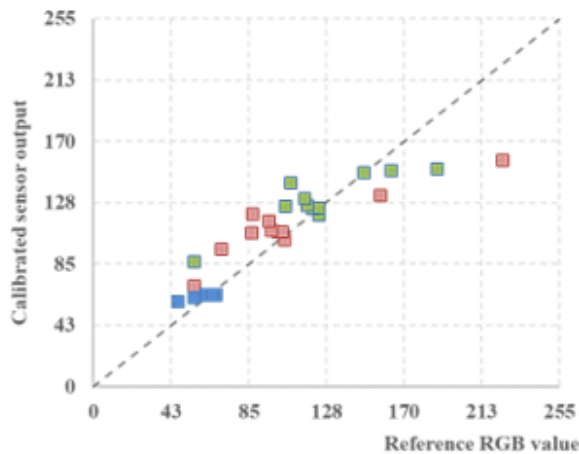


Figure 3: scatterplot of the S3 calibrated output vs. the reference RGB values from colour checker and portable spectrometer.

Plant characteristics

Figures 4 and 5 summarise the main characteristics that basil plants had at harvest together with the results of the post hoc comparisons ($p < 0.05$). The Fresh Weight of the aboveground biomass was higher in pots fertilized with 10 mM total N solutions irrespective of the NO_3/NH_4 ratios (Fig. 4.A). Total chlorophyll content had the same trend (Fig. 4.B) but, in this case, the different treatments showed significant differences each other (treatments 4 and 5 resulted in 22.7 ± 3.2 to $23.5 \pm 3.1 \mu\text{g cm}^{-2}$, treatments 2 and 3 ranged from 16.9 ± 1.6 to $18.8 \pm 1.7 \mu\text{g cm}^{-2}$, while the control treatment had the lowest value of $\text{CHL} - 14.8 \pm 1.6 \mu\text{g cm}^{-2}$).

Plants fertilized with 10 mM total N solution showed the lowest flavonoid content and the highest NBI index (Fig. 4.C and 4.D). When compared with the seedlings watered with the 0 mM nitrogen solution (T1), the NBI value almost doubled for plants irrigated with 2.5 mM solution and quadrupled for those who received the 10 mM one. Table 2 reports the correlation coefficients between the TCS3200 sensor and the Dualex readings.

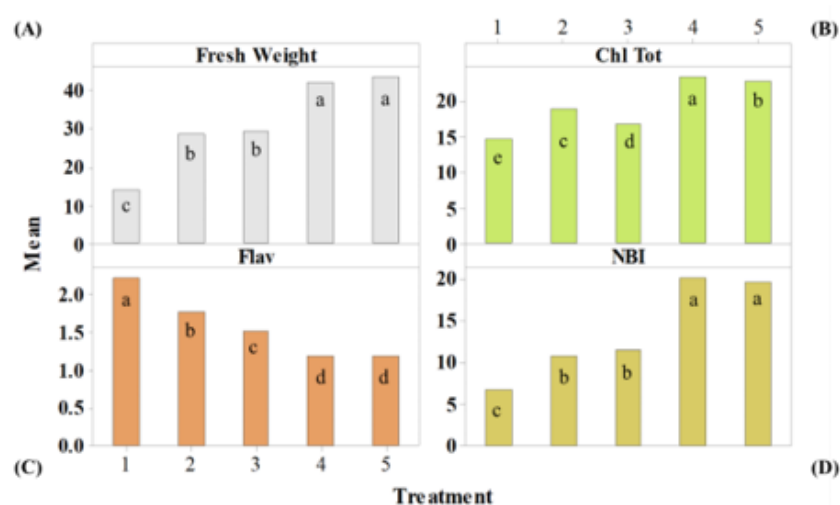


Figure 4: Average Fresh Weight of leaves (g plant⁻¹, 5.A), chlorophyll content (Chl Tot, Dualux units, 5.B), Flavonoid content (Flav, Dualux Units, 5.C) and Nitrogen Balance Index (NBI, 5.D) of basil plants at harvest. Means that do not share a letter are significantly different (Tukey method, p<0.05).

Table 2. Pearson correlation coefficient among the low-cost readings and the Dualux output (all values are significant for p < 0.05)

	Chlorophyll	Flavonols	Anthocians	NBI index	Fresh Weight
R'	0.213	-0.129	-0.182	0.248	0.149
G'	-0.337	0.387	0.397	-0.357	-0.282
B'	-0.465	0.422	0.481	-0.522	-0.368
L'	-0.133	0.213	0.193	-0.131	-0.128
R'+G'	0.002	0.085	0.050	0.018	-0.021
R'/G'	0.413	-0.356	-0.416	0.460	0.315

According to calibrated S3 output, colour characterization of basil plants (fig 6) pointed out that:

- T2 and T3 (2.5 mM total N) resulted significantly different from the control and treatments T4 and T5 with reference to R' value. (Fig 5.A)
- The Euclidean distance among the treatments ($\Delta E'$ – Eq. 2) resulted significant: more in detail, T2, T3, T4 and T5 distances (ranging from 4.01 ± 2.2 to 4.7 ± 2.5) resulted all significantly different from T1 (p<0.05) but no differences were found among them. However, considering only the total N concentration of the nutrient solutions, the distances between plants watered with the 0 N solution and 2.5 mM (4.03 ± 2.24) and 10 mM fed plants (4.63 ± 2.50) resulted significantly

different ($p < 0.05$) meaning that the overall amount of nitrogen plants received effectively affected the leaf colour more than the NO_3/NH_4 ratio.

- The green component (G'), Fig 5.B, was found to be significantly higher in T1 while T2, T3 and T4 resulted having intermediate values and T5 showed the lowest one. This behaviour is opposite to the trend of the chlorophyll content estimated with the optical leaf-clip meter.
- the blue component (B'), Fig 5.C, is basically the same for T1, T2 and T3 while it tends to decrease, slightly but significantly, in T4 and T5.
- The luminance (L'), Fig. 5.D, pointed out a significant difference of T1 against all the other treatments. However, when the total N concentrations are considered, it ranges from 118.4 ± 1.5 for 0 mM solution to 116.4 ± 1.4 for 2.5 mM solution and 117.0 ± 2.0 for plants irrigated with 10 mM total N solution.
- The $R'+G'$ value (calibrated yellow), Fig 5.E, basically shows that T1 and T4 significantly differ from all the other treatments. However, when considering the total N content of the nutrient solutions, the post hoc comparisons pointed out significant differences between the T1, whose $R'+G'$ value is the highest (246.7 ± 3.85) and the fertilized theses (241.9 ± 3.5 and 244.9 ± 5.0 for 5 mM and 10 mM). The R' component is higher for T4 and T5 and lower for T2 and T3.
- The R'/G' ratio, Fig. 5.F, gives reason of the relative intensity R' has on G' . When considering all the treatments, T4 and T5 are those showing the highest R'/G' ratio. However, even in this case, following the variations occurring in R' values, plants fed with 10 mM nitrogen solution have the highest R'/G' value (0.93 ± 0.02) while plants administered with 0 mM and 5 mM solutions have comparable albeit significant values (0.91 ± 0.02 and 0.90 ± 0.02).

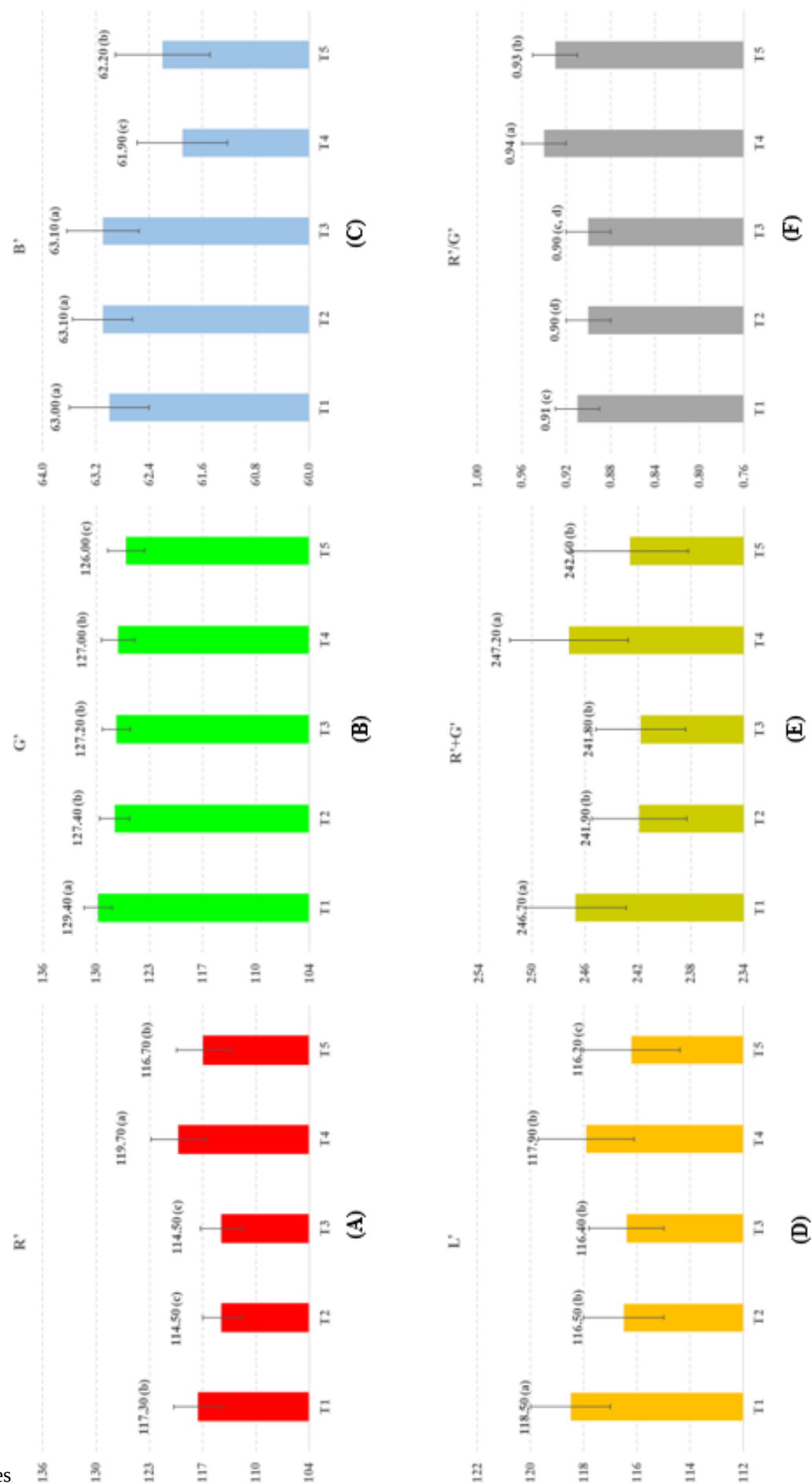


Figure 5 : average colour chromatic characteristics of basil plants at harvest. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation of 180 samples. Means that do not share a letter are significantly different (Tukey method, $p < 0.05$).

Multivariate analysis

Table 3 and Figure 6 point out the results of the multivariate analysis. The first three PCs together account for 84.9 % of the explained variance. The first principal component (40.1% of the total variance) accounts for B', R'/G', NBI, Chlorophyll content (Chl tot) and the epidermal Flavonoid content (Flav): overall these variables represent what can be called the “metabolic activity” of the plants.

Variables like R', G', R'+G' and Luminance act more on the 2nd principal component (33.5% of explained variance) that can be interpreted as an indication of the “colour” of the plants. The 3rd principal component (11.2 % of explained variance) represents the leaves fresh weight, the Euclidean distance - $\Delta E'$ - existing among the control and the two groups of plants fertilized with different nitrogen solutions. Given that other variables like R'/G', NBI and B' have effect on this, such component can be considered as an indicator of plant vigour.

Table 3: the loadings of the considered variables together with the latent variables they belong to.

<u>Variables</u>	PC1	PC2	PC3
¹ Chl Tot	0.355	0.128	0.297
¹ Flav	-0.347	-0.18	-0.334
¹ NBI	0.397	0.137	0.352
¹ R'/G'	0.403	-0.160	-0.365
¹ B'	-0.419	0.113	0.345
² R'	0.297	-0.396	-0.158
² G'	-0.176	-0.419	0.360
² Luminance	0.025	-0.503	0.175
² G'+R'	0.140	-0.494	0.051
³ Fresh Weight	0.298	0.125	0.315
³ $\Delta E'$	0.174	0.220	-0.371

¹ “Metabolic activity”; ² “Colour”; ³ “Plant vigour”

In the score plots showed in Figure 7 the groups representing the three nitrogen fed groups of plants (0, 2.5 and 10 mM) appear always clustered together. This means that the acquired data cannot represent completely (at this stage) the effect that different nitrogen levels has on basil plants, pointing out the requirement of further work.

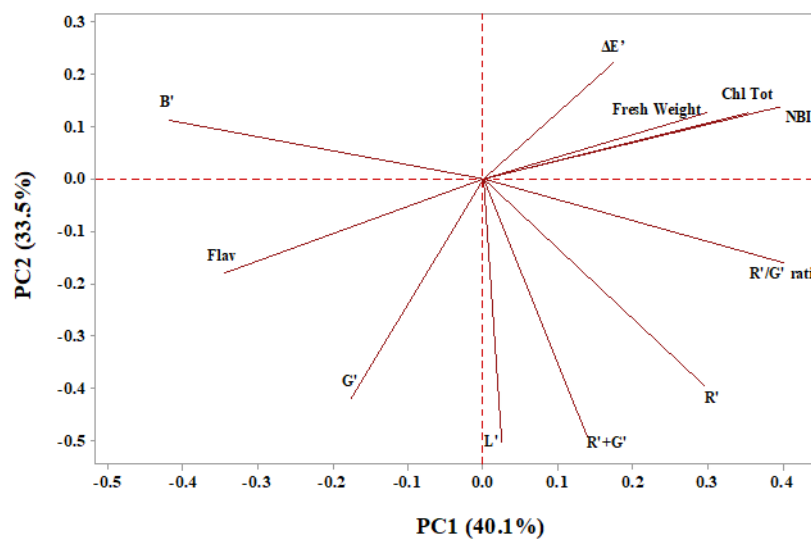
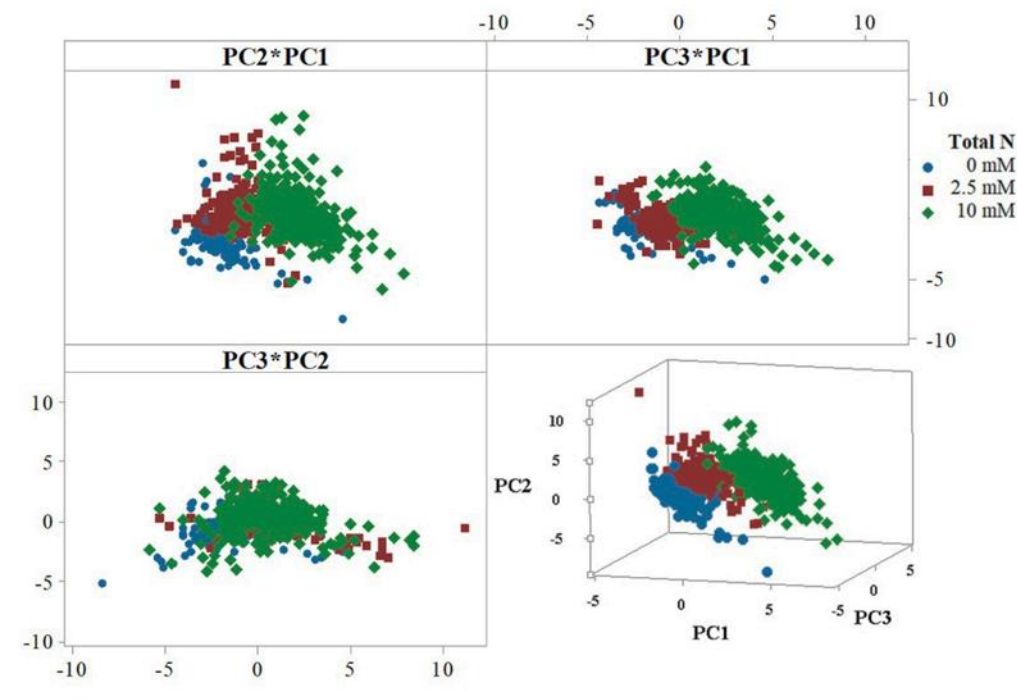


Figura6 score plot (on the top) and loading plot (on the bottom) resulting from the Principal Component Analysis representing the cloud of data scattered on bi-dimensional and three-dimensional axes

Based on the variables acquired with the optical leaf-clip meter, the standardized coefficient of the linear discriminant functions (Table 4) pointed out that: Flav (epidermal flavonoids) is the variable affecting plants belonging to the reference group (T0) the most. However, also the chlorophyll content and the NBI show important coefficients; at the same time NBI is the variable characterizing the most plants that were administered the intermediate amount of nitrogen while

chlorophyll content (Chl tot) and Flavonoids (Flav) are the factors that influence the most the plants that received the solution containing the highest concentration of N. Carrying out the linear discriminant analysis with optical sensor data achieved an overall good classification rate (91.3%) (Table 5): the best classification performance regarded the samples from plants irrigated with the 2.5 mM solution.

Variable	Groups		
	0 mM	2.5 mM	10 mM
Constant	-7.796	-0.619	-3.183
Chl tot	-7.407	0.570	3.133
Flav	10.99	-1.939	-3.554
NBI	7.148	-3.930	0.356
Fresh Weight	-0.426	0.042	0.171

Table 4: The standardized coefficient of the linear discriminant function resulting for the variables acquired with the optical leaf-clip meter

Actual Group	Predicted Group		
	0 mM	2.5 mM	10 mM
0 mM	161 (89.4%)	19	0
2.5 mM	16	331 (91.9%)	13
10 mM	0	30	330 (91.7%)
Mahalanobis Distances			
0 mM	0		
2.5 mM	14.36	0	
10 mM	40.01	11.31	0

Tabella 5: classification matrix based on the variables acquired with the optical leaf-meter. According to it 822 out of 900 items classified correctly (91.3%). Group size is 180 for 0 mM and 360 for both 2.5 mM and 10 mM.

Table 6 shows the standardized coefficients of the discriminant analysis carried out on the output data of low-cost TCS3200 sensor. Here B' and R'/G' are the variables that most affect the control group (T0) Their importance decreases in the plants irrigated with the 2.5 mM solution and become higher (considering the absolute value) in those administered with the 10 mM solution. In this case the classification analysis has a lower discriminant capability compared to the previous one as 81.3% of the samples could be classified correctly.

Variable	Groups		
	0 mM	2.5 mM	10 mM
Constant	-1.062	-0.531	-1.231
G'	0.197	-0.897	0.799
B'	13.320	9.743	-16.403
R'/G'	12.120	8.185	-14.246

Table 6: the standardized coefficient of the linear discriminant function resulting for the variables acquired with the TCS 3200 sensor.

With the TCS3200 data, the highest classification rate was occurred with the samples belonging to the control group (153 out of 180 observations) meaning that the acquired information has from 5 % to 16 % less discrimination power compared to the optical leaf meter (Tab. 7).

Actual Group	Predicted Group		
	0 mM	2.5 mM	10 mM
0 mM	153 (85.0%)	22	5
2.5 mM	63	274 (76.1%)	23
10 mM	28	33	299 (83.1%)
Mahalanobis Distances			
0 mM	0		
2.5 mM	1.52	0	
10 mM	8.34	6.44	0

Table 1: classification matrix based on the variables acquired with the TCS 3200 sensor. According to it, 726 out of 900 items classified correctly (80.7%). Group size is 180 for 0 mM and 360 for both 2.5 mM and 10 mM.

Discussion

The use of plant leaf colour as an index for nutrient diagnosis is being an increasing procedure. For colour analysis, the used system relies on a high brightness light-emitting diode as light source, the TCS3200 colour recognition module, a data processing module and a display module (Qiaoyi et al. 2014). At first, it was, therefore, necessary to assess the dynamics of the response the low-cost sensor had to the reference colours and the colour of the basil seedlings. Even though previous studies proved the TCS32000 sensor to produce accurate RGB readings (Seelye et al. 2011; Kim et al. 2015), this step allowed to understand the feasibility of the sensor in terms of accuracy for a specific suite of colours as the aim of the work was to check its reliability for basil plant nutritional status assessment. Figure 2 shows the extent of the deviations of sensor readings from the chosen reference colours: such deviations of S1 and S2 acquisitions can be ascribed to unstandardized sensor and hardware circuit design (Jing et al. 2014; Qiaoyi et al. 2014) and were used to calibrate the S3 sensor to take account of this variability. The resulting average Euclidean colour distances between the S3 calibrated readings, and the reference materials are in line with the Euclidean colour distances Menesatti et al. (2012) obtained, always with PLS calibration, for commercial and professional high-resolution cameras. Even though a new colour distance model can outperform the Euclidean Distance and its related methods in case of changing illumination (Lv et al. 2018), in consideration of the aim of the study, taking the $\Delta E < 30$ as validation reference can be considered congruous.

Concerning plant nutritional status, Padilla et al. (2018) highlighted the potential optical sensors have in assisting the N management of vegetable crops and the practical issues associated with its use. Kawashima and Nakatani (1998), Liu et al. (2006), Mercado-Luna et al. (2010), Wang et al. 2015 and Yakkundimanth et al. (2018) documented the application of RGB image analysis in measuring plant chlorophyll content, nitrogen content, and disease status. It shall be considered that using the RGB colour space has the drawback of being dependent on the device and its' components are highly correlated (Tkalcic et al. 2003) and for this reason studies using low-cost sensors based on $L^*a^*b^*$ and HSV colour spaces, more close to the human eye with reference to colour perception (León et al. 2006), have been presented (Tushar et al. 2019). However, irrespective of the experimental conditions, selected plant material, and optimum indices, almost all the works using the RGB space, consider the RGB image by ratio values and focus on the changes occurring in leaf colour and its correlation with chlorophyll content (Cai et al. 2006) and this supports the idea of extending the application of RGB colour sensors to improve their usefulness for the quality assessment of the leafy vegetables by image processing using R' G' B' values in univariate and multivariate processing.

Concerning univariate processing, basil plant characterization pointed out how TCS3200 readings vary at varying of plant nutrition. Yuzhu et al. (2011) acquired RGB images of pepper leaves with a digital camera and obtained correlations between $G/(R+G+B)$ ratios and the total N concentration of plant. Following this, they established recommendation thresholds that, in case of flowering plants, are $G/(R+G+B) > 0.628$ in case of N deficiency, $0.613 < G/(R+G+B) < 0.625$ in case of the regular nitrogen content of the plant and $G/(R+G+B) < 0.613$ in case of nitrogen excess. Such thresholds increased on average of 4.7% when plants were in the fruiting phase. In our study, the analogous $G'/(R'+G'+B')$ ratios ranged from 0.400 to 0.435 and the average values for the different nitrogen levels plants were administered were 0.418 ± 0.003 (0 mM), 0.417 ± 0.003 (2.5 mM) and 0.413 ± 0.004 (10 mM) with the latter value is significantly different from the previous two ($p < 0.05$). The correlation coefficient of this ratio with the chlorophyll readings of the optical leaf meter is -0.456 ($p < 0.001$).

Figure 5 and Table 2 point out how low-cost sensor readings relate to the Dualex readings and plant fresh weight (Figure 5, Table 2). Treder et al. (2016) found good correlation ($r = 0.74$ and 0.62) of SPAD502 (Minolta, Japan) and CCM-200 (Opti-Sciences, Inc., USA) meters values with the nitrogen content of apple trees, and equally good correlation coefficients were found for the values of R ($r = -0.64$), G ($r = -0.63$) and B ($r = 0.61$) acquired with a photo scanner (Seiko Epson Corporation, Japan) on apple leaves. Given the substantial equivalence of the above mentioned with optical devices with the one used in this study (Kalaji et al. 2017), it's evident that the differences of the correlation coefficients of TCS3200 readings with the Dualex ones (Table 2) arise both from the kind of calibration we performed and from the anatomical characteristics of basil leaves that could have interfered in properties of light absorption and reflection being the TCS3200 acquisitions carried out in field. It follows that univariate processing of TCS3200 readings can't suffice in finding suitable indices relating the sensor output with the plant nutritional status assessed with optical sensors that, no matter the manufacturer, were proven to provide reasonably estimation of chlorophyll content under optimal nutrient conditions. (Kalaji et al. 2017).

However, when standardised data underwent multivariate processing, both TCS3200 and Dualex readings pointed out the proper fitting of plant nutritional status with nitrogen dynamics. Nitrogen is among the essential nutrients for plants: it influences both the yield and the quality of vegetable products because it constitutes proteins, nucleic acids, chlorophyll and other metabolites. Its deficiency, besides resulting in pale green leaves and overall growth restriction of the plants' organs (Hawkesford et al. 2012; Evans et al. 2001; Peoples and Dalling, 1988), induces also an increase in the content of leaf epidermal flavonoids (Mittelstraß et al. 2006; Stewart et al. 2001)

that protect chlorophyll molecules against UV light (Bilger et al. 1997). The chlorophyll to flavonoids ratio gives the NBI index (Tremblay et al. 2012) whose dynamics reflects that of the molecules described before. B' turned out to be inversely related to the nitrogen concentration of the fertilising solution plants received (Fig. 5), and this explains its relationship with the Flav measurement (Fig. 6). The same figure shows that the R'/G' index relates positively with Chl and NBI.

The subsequent LDA pointed out the power the low-cost sensor and the optical leaf meter have in discriminating among the different nutritional conditions of basil plants: as expected from literature (Bracke et al. 2019; Cerovic et al. 2015), the Dualex readings allowed to achieve higher classification rate (91.3%) compared to the TCS3200 that reached 80.7% of correct classifications only (Table 5 and Table 7). Going in deep on the classification rates, such values can be considered as the sensitivities of the testing comparison procedure of Youden (1950) and therefore, for each nitrogen concentration level of the irrigating solution, the Youden index (J), table 8, allows comparing the Dualex classification power with that of the TCS3200.

Youden index	Groups			Overall
	0 mM	2.5 mM	10 mM	
J _{Dualex}	-0.106	-0.081	-0.083	-0.087
J _{TCS3200}	-0.150	-0.239	-0.169	-0.163
Difference	n.s.	**	**	**

Table 8: the Youden indexes (J) calculated for the Dualex and for the TCS3200 sensors. The significance of the difference bases on the t test for $p < 0.05$ (*) and $p < 0.05$ ().**

In the case of basil plants administered with the 0 mM N solution, the comparison of the Youden indexes of the two instruments pointed out that there is no significant difference among the tests. Currently, the basil plants of the T1 grew in a condition of nutritional stress, and therefore this outcome confirms what Kalaji et al. (2017) pointed out concerning the use of optical devices on stressed plants. However, for plants administered with 2.5 mM and 10 mM N solutions, the sensitivities of the Dualex were proven to be significantly higher than those of the low-cost sensor. The Mahalanobis distance (squared distance) is a multivariate distance metric that measures the distance between a point (vector) and a distribution, and it can be considered the multivariate equivalent of the Euclidean distance (De Maesschalck et al. 2000; Brereton et al. 2015).

Comparing the distances tables 5 and 7 report provides information on how different the three groups of plants are for the two sensors. Both indicate that the highest distance is between stressed plants (fed with the 0 mM solution) and those who received the highest amount of nitrogen (10 mM solution). However, the distance between these groups is higher for the Dualex than for the TCS3200. The same applies to the distance between the 2.5mM and 10 mM groups of plants. The closeness of the groups the multivariate classification points out gives the reason for the highest misclassification resulting when using the TCS3200 readings. The application goes beyond the knowledge other authors presented with similar colour recognition systems (Agudo et al. 2014) as the application of the system has been carried out in full field conditions. Plant nutritional status assessment with such a sensor is a practical, easy and low-cost operation for use both with single and large groups of plants.

The proposed application of this sensor is meant to provide farmers and advisors with a simplified, low-cost system to be used for daily routine or in on-line monitoring for early warning systems: all its components are open hardware, and the software is open source so that it is possible to use and/or adapt the instrument following the philosophy of open knowledge. The fact that the low-cost sensor provides adequate representation (in multivariate analysis) of plant characteristics and pattern recognition achievements that are comparable to those obtained with a modern optical device for non-destructive chlorophyll content assessment confirmed the potential of the proposed system, despite the limitations the sensor has. Of course, some aspects must be considered for future research to fully explore the feasibility of the use of a low-cost sensor for colour monitoring: the realisation of other RGB based colour indices, a unique calibration procedure that considers all the most important horticultural plants and improved quality of the acquisitions in full field conditions.

Conclusions

Basil plants were fertilised with three different solutions, containing 0, 2.5 and 10 mM nitrogen concentration and two different NO₃/NH₄ ratios. At harvest, these plants underwent characterisation employing a portable optical leaf-meter (chlorophyll content, flavonoids and NBI index assessment) and a low-cost RGB sensor (TCS3200) to point out and differences in their quality parameters arisen. However, the effect of the NO₃/NH₄ ratio hardly ever could be distinguished.

Univariate data processing pointed out that the TCS3200 readings, albeit following the different development plant had at varying administered nitrogen, can't suffice in finding suitable indices relating the sensor output with the plant nutritional status.

Principal component analysis showed that the variables involved in the metabolic efficiency of the plant (B' , R'/G' , NBI, Chlorophyll content) were those more related to the three nitrogen treatments, even though variables related to the colour of leaves (being related to the 2nd principal component) show quite an important role as well. The LDA carried out comparing optical leaf meter, and TCS3200 readings pointed out that both the system could achieve similar discriminating power even though, in case of plants fed with 2.5 and 10 mM nitrogen solutions, the differences among the groups were higher for the optical leaf meter than for the TCS3200. Both the systems encountered difficulties when classifying the observations from plants under nutritional stress (0 mM group, T1).

The results of this work give valuable information on what may be achieved using this approach, not only on a pilot-scale but also on full-scale greenhouse systems, with different soil and/or soilless management. A more significant number of cases are however necessary to create a more robust model for future implementation of the application of such kind of sensor.

Acknowledgments

This work was supported by the Italian Ministry of Agriculture (MiPAAF) under the AGROENER project (D.D. n. 26329, 1st April 2016) - <http://agroener.crea.gov.it/>

The authors are very grateful to Mr. Gianluigi Rozzoni, Mr. Ivan Carminati, Mr. Stefano Basile, Mr. Alex Filisetti, Mr. Elia Premoli and Mr. Walter Antonioli for their valuable help in the setting up of the experimental greenhouse and the caring of basil plants.

References

- Adams, M.L., Philpot, W.D., Norvell W.A. (1999). Yellowness index: An application of spectral second derivatives to estimate chlorosis of leaves in stressed vegetation. *International Journal of Remote Sensing*, <https://doi.org/10.1080/014311699211264>
- Agudo J. E., Pardo J. P., Sànchez H., Pérez A. L., Suero M. I. (2014). A Low-Cost Real Color Picker Based on Arduino. *Sensors*, <https://doi.org/10.3390/s140711943>
- Atzberger, C. (2013). Advances in Remote Sensing of Agriculture: Context Description, Existing Operational Monitoring Systems and Major Information Needs. *Remote Sensing*, <https://doi.org/10.3390/rs5020949>
- Ballestreros, R., Ortega, J.F., Hernandez, D., Moreno, M.A. (2018). Onion biomass monitoring using UAV-based RGB imaging. *Precision Agriculture*, <https://doi.org/10.1007/s11119-018-9560-y>
- Bauer, M.E. 1985. Spectral inputs to crop identification and condition assessment. *Proceedings of the IEEE*, <https://doi.org/10.1109/PROC.1985.13238>
- Bendig, J., Bolten, A., Bennertz, S., Brosheit, J., Eichfuss, S., Bareth, G. (2014). Estimating Biomass of Barley Using Crop Surface Models (CSMs) Derived from UAV-Based RGB Imaging. *Remote Sensing*, <https://doi.org/10.3390/rs61110395>
- Beyaz, A. (2017). Comparison of Arduino based inexpensive colorimeters effectiveness at some agricultural products. *Fresenius Environmental bulletin*, 26(11): 6457-6469.
- Bilger, W., M. Veit, L. Schreiber, and U. Schreiber. (1997). Measurement of leaf epidermal transmittance of UV radiation by chlorophyll fluorescence. *Physiologia Plantarum*, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01060.x>
- Bockstein, I. M. (1986). Color equalization method and its application to color image processing. *Journal of the Optical Society of America A*, <https://doi.org/10.1364/josaa.3.000735>
- Bracke J., Elsen A., Adriaenssends S., Vandendriessche H., Van Labeke M-C. (2019). Utility of proximal plant sensors to support nitrogen fertilization in Chrysanthemum. *Scientia Horticulturae*, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108544>
- Brereton R-G., Lloyd G. R. (2015). Re-evaluating the role of the Mahalanobis distance measure. *Journal of Chemometrics*, <https://doi.org/10.1002/cem.2779>
- Cai, H., H. Cui, W. Song, and L. Gao. (2006). Preliminary study on photosynthetic pigment content and color feature of cucumber initial blooms. *Transactions of the CSAE* 22: 34–38.
- Carocho, M., Barros, L., Calhelha, R.C. Ćirić, A., Soković, M., Santos-Buelga, C., Morales, P., Ferreira I.C.F.R. (2015). Potential of Basil (*Ocimum basilicum* L.) as bioactive ingredient and

- natural preserver. Proceedings of the 5th MoniQA International Conference 2015. Porto. ISBN 978-3-9504109-0-7. <http://hdl.handle.net/10198/12254>
- Cerovic Z.G., Masdoumier G., Ben Ghazlen N., Latouche G. (2012). A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. *Physiologia Plantarum*, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01639.x>
- Cerovic Z.G., Ben Ghazlen N., Milhade C., Obert M., Debuisson S., Le Moigne M. (2015). Nondestructive Diagnostic Test for Nitrogen Nutrition of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Based on Dualex Leaf-Clip Measurements in the Field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00304>
- Chandra, S., Khan, S., Avula, B. (2014). Assessment of Total Phenolic and Flavonoid Content, Antioxidant Properties, and Yield of Aeroponically and Conventionally Grown Leafy Vegetables and Fruit Crops: A Comparative Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, <https://doi.org/10.1155/2014/253875>.
- Chang, Y-C., Reid, J.F. (1996a). Characterization of a color vision system. *Transactions of the ASAE*, <https://doi.org/10.13031/2013.27506>
- Chang Y-C., Reid J.F. (1996b). RGB calibration for color image analysis in machine vision. *IEEE Transactions on Image Processing*, <https://doi.org/10.1109/83.536890>
- Costa, C., Pallottino, F., Angelini, C., Proietti, P., Capoccioni, F., Aguzzi, J., Antonucci, F., Menesatti, P. (2009). Colour calibration for quantitative biological analysis: A novel automated multivariate approach. *Instrumentation Viewpoint*, 8, 70–71.
- De Maesschalck, R., Jouan-Rimbaud, D., Massart, D.L. (2000). The Mahalanobis distance. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(99\)00047-7](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(99)00047-7)
- Doi, R., (2012). Quantification of leaf greenness and leaf spectral profile in plant diagnosis using an optical scanner. *Ciência e Agrotecnologia*, <https://doi.org/10.1590/S1413-70542012000300006>.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2011. Global Strategy to Improve Agricultural and Rural Statistics; Report No. 56719-GB; FAO: Rome, Italy.
- Gejima, Y., Nagata, M., Kenji, H. (2004). Judging of Tomato Maturity by Utilizing a Low-resolution RGB Color System. *2004 ASAE/CSAE Annual International Meeting Sponsored by ASAE/CSAE Fairmont Chateau Laurier, The Westin, Government Centre Ottawa, Ontario, Canada 1 - 4 August 2004. Paper Number: 046122*

- Hawkesford, M., Horst, W., Kichey, T., Lambers, H., Schjoerring, J., Møller, I.S., White, P. (2012). Functions of macronutrients. In: *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. Elsevier, pp. 135–189. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00006-6>.
- Isaac, M., Cerda, R., Rapidel, B., Martin, A.R., Dickinson, A.K., Sibelet N. (2018). Farmer perception and utilization of leaf functional traits in managing agroecosystems. *Journal of Applied Ecology*, <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13027>
- Jing, L., Nie, Y., Zhao, L. (2014). Colour recognition system based on TCS3200D. *Computer Modelling & New technologies*, 18(11): 364-368.
- Kalaji, H. M., Dąbrowski P., Cetner, M.D., Samborska, I. A., Łukasik, I., Brestic, M., Zivcak M., Tomasz, H., Mojski, J., Kociel H., Panchal, B. M. (2017). A comparison between different chlorophyll content meters under nutrient deficiency conditions. *Journal of Plant Nutrition*, <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1263323>
- Kawashima, S., Nakatani, M. (1998). An Algorithm for Estimating Chlorophyll Content in Leaves Using a Video Camera. *Annals of Botany*, <https://doi.org/10.1006/anbo.1997.0544>
- Kim, J-S., Kim, A-H., Oh H-B., Goh, B-J. Lee, E-S., Kim, J-S., Jung, G-I., Baek, J-Y., Jun, J-H. (2015). Simple LED spectrophotometer for analysis of color information. *Bio-Medical Materials and Engineering*, <https://doi.org/10.3233/BME-151478>
- Kondo, N., Ahmad, U., Monta, M., Murase, H., (2000). Machine vision based quality evaluation of Iyokan orange fruit using neural networks. *Computers and Electronics in Agriculture*, [https://doi.org/10.1016/S0168-1699\(00\)00141-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1699(00)00141-1)
- Kume, A. (2017). Importance of the green color, absorption gradient, and spectral absorption of chloroplasts for the radiative energy balance of leaves. *Journal of Plant Research*, <https://doi.org/10.1007/s10265-017-0910-z>.
- León, K., Domingo, M., Pedreschi, F., León, J. (2006). Color measurement in L* a* b* units from RGB digital images. *Food research international*, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.03.006>
- Liu, Y-J., Tong, Y-P., Zhu, Y-G., Ding, H., Smith, A. (2006). Leaf Chlorophyll Readings as an Indicator for Spinach Yield and Nutritional Quality with Different Nitrogen Fertilizer Applications. *Journal of Plant Nutrition*, <https://doi.org/10.1080/01904160600767401>
- Lv, J., Fang, J. (2018). A Color Distance Model Based on Visual Recognition. *Mathematical Problems in Engineering*, <https://doi.org/10.1155/2018/4652526>
- Makri, O., S. Kintzios. (2008). Ocimum sp. (basil): Botany, cultivation, pharmaceutical properties, and biotechnology. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, https://doi.org/10.1300/J044v13n03_10

- Meloun, M., Militky, J., Forina, M. (1992). *Chemometrics for analytical chemistry*. New York, USA: Ellis Horwood.
- Mercado-Luna, A., Rico-Garcia, E., Lara-Herrera, A., Soto Zarazúa, G., Ocampo-Velázquez, R., Guevara-González, R., Herrera-Ruiz G., Torres-Pacheco, I. (2010). Nitrogen determination on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings by color image analysis (RGB). *African Journal of Biotechnology*, 9: 5326–5332.
- Milne, B. F., Toke, Y., Rubio, A., Brøndsted Nielsen S. (2015). Unraveling the Intrinsic Color of Chlorophyll. *Angewandte Chemie*, <https://doi.org/10.1002/ange.201410899>
- Minitab 17 Statistical Software. Minitab, Inc.: State College, PA, USA, 2010. Available online: www.minitab.com (accessed on October 2018).
- Mittelstraß, K., Treutter, D., Pleßl, M., Heller, W., Elstner, E. F., Heiser, I. (2006). Modification of primary and secondary metabolism of potato plants by nitrogen application differentially affects resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Plant Biology*, <https://doi.org/10.1055/s-2006-924085>
- Muráriková, A.; Ťažký, A.; Neugebauerová, J.; Planková, A.; Jampilek, J.; Mučaji, P.; Mikuš, P. (2017). Characterization of Essential Oil Composition in Different Basil Species and Pot Cultures by a GC-MS Method. *Molecules*, <https://doi.org/10.3390/molecules22071221>
- Tremblay N., Wang N., Cerovic Z.G. 2012. Sensing crop nitrogen status with fluorescence indicators. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0041-1>
- Nurzyńska-Wierdak, R., Borowski, B., Dzida, K., Zawislak, G., Kowalski R. (2013). Essential oil composition of sweet basil cultivars as affected by nitrogen and potassium fertilization. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, <https://doi.org/10.3906/tar-1203-43>.
- Olszewska, M., Grzegorzczak, S., Alberski, J., Baluch-Malecka, A., Kozikowski, A. (2008). Effect of copper deficiency on gas exchange parameters, leaf greenness (SPAD) and yield of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and orchard grass (*Dactylis glomerata* L.). *Journal of Elementology*, 13: 597–604.
- Padilla, F.M., Gallardo, M., Peña-Fleitas, M. T., De Souza, R., Thompson, R. B. (2018). Proximal Optical Sensors for Nitrogen Management of Vegetable Crops: A Review. *Sensors*, <https://doi.org/10.3390/s18072083>
- Pagani A., Echeverria H. E., Andrade F. H., Sainz Rozas H. R. 2000. Characterization of Corn Nitrogen Status with a Greenness Index under Different Availability of Sulfur. *Agronomy Journal*, <https://doi.org/10.2134/agronj2008.0136>

- Palaniappan, A., Lee, W. S., Burks, T. F. (2004). Color Vision System for Estimating Citrus Yield in Real-time. Annual International Meeting Sponsored by ASAE/CSAE Fairmont Chateau Laurier, The Westin, Government Centre Ottawa, Ontario, Canada 1 - 4 August 2004. Paper Number: 043054
- Peoples, M.B., Dalling, M.J., (1988). The interplay between proteolysis and amino acid metabolism during senescence and nitrogen reallocation. In: Nooden, L.D., Leopold, A.C. (Eds.), *Senescence and Aging in Plants*. Academia Press, San Diego (CA), pp. 181–217.
- Qiaoyi, L., Yanling, X., Wenlong, Y., Junsheng, Y., Huan L. (2014). Study on Color Analyzer based on the Multiplexing of TCS3200 Color Sensor and Microcontroller. *International Journal of Hybrid Information Technology*, <https://doi.org/10.14257/ijhit.2014.7.5.15>
- Rice-Evans, C.A., Miller, J.N., Paganga, G. (1996). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
- Seelye, M., Gupta, G.S., Bailey, D.G., Seelye, J. (2011). Low Cost Colour Sensors for Monitoring Plant Growth in a Laboratory. *Proceedings of the 2011 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference*. <https://doi.org/10.1109/IMTC.2011.5944221>
- Sgherri, C., Cecconami, S., Pinzino, C., Navari-Izzo, F., Izzo, R. (2010). Levels of antioxidants and nutraceuticals in basil grown in hydroponics and soil. *Food Chemistry*, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.058>
- Shuvalov, V.A. (2007). Electron and nuclear dynamics in many electron atoms, molecules and chlorophyll-protein complexes: A review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2007.02.002>
- Sicher, R.C. (1999). Photosystem-II activity is decreased by yellowing of barley primary leaves during growth in elevated carbon dioxide. *International Journal of Plant Science*, 160: 849–854.
- Soolchalearn, T., Abdullakasim, W. (2017). A low-cost Sensor for measuring and mapping Chlorophyll content in Cassava Leaves. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*, <https://doi.org/10.12982/CMUJNS.2017.0015>
- Stewart, A. J., W. Chapman, G. I. Jenkins, I. Graham, T. Martin, and A. Crozier. (2001). The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant, Cell and Environment*, <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00768.x>
- Süsstrunk S., Buckley R., Swen S. (1999). “Standard RGB color spaces,” in Proc. IS&T/SID 7th Color Imaging Conference, 1999, pp. 127–134.

- Tenore, G.C., Campiglia, P., Ciampaglia, R., Izzo, L., Novellino, E. (2016). Antioxidant and antimicrobial properties of traditional green and purple “Napoletano” basil cultivars (*Ocimum basilicum* L.) from Campania region (Italy). *Natural Product Research*, <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1269103>
- Tkalcic, M.; Tasic, J.F. (2006). Colour spaces: perceptual, historical and applicational background. Proceedings of the *IEEE Region 8 EUROCON 2003. Computer as a Tool*. Ljubljana (Slovenia), 22-24 Sept. 2003. <https://doi.org/10.1109/EURCON.2003.1248032>
- Todeschini R. (1998). Introduzione alla Chemiometria. Naples, Italy: EdiSES.
- Trémeau, A., Tominaga, S., Plataniotis, K. N. (2008). Color in Image and Video Processing: Most Recent Trends and Future Research Directions. *EURASIP Journal on Image and Video Processing*, <https://doi.org/10.1155/2008/581371>
- Tripodi, P., Massa, D., Venezia, A., Cardi, T. (2018). Sensing Technologies for Precision Phenotyping in Vegetable Crops: Current Status and Future Challenges. *Agronomy*, <https://doi.org/10.3390/agronomy8040057>
- Tsai, P.O., Tsai, T.H., Yu, C.H., Ho, S.C. (2007). Evaluation of NO-suppressing activity of several Mediterranean culinary species. *Food and Chemical Toxicology*, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.09.006>
- Tushar, S.N.B., Pal, T., Das, S.S., Imam, M.M., Reja, M.I. (2019) A Low-cost Image Processing Based Technique to Estimate Chlorophyll in Winter Wheat. *2nd International Conference on Electrical, Computer and Communication Engineering, ECCE 2019*; Cox's Bazar; Bangladesh; 7-9 February, 2019. <https://doi.org/10.1109/ECACE.2019.8679462>
- Van Niel, T.G.; McVicar T.R. (2004). Current and potential uses of optical remote sensing in rice-based irrigation systems: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*, <https://doi.org/10.1109/ECACE.2019.867946210.1071/AR03149>.
- Wang, Y., Chang, R.K., Wang, Y.H., Liu, H., Tang, G.C. (2015). Design of Portable Diagnostic System of Cucumber Leaf Mildew. In: *Sixth International Conference on Electronics and Information Engineering*, edited by Qiang Zhang, Proc. of SPIE Vol. 9794, <https://doi.org/10.1109/ECACE.2019.867946210.1117/12.2202471>
- Youden, W.G. (1950). Index for rating diagnostic tests. *Cancer*, [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(1950\)3:1<32::aid-cnrcr2820030106>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(1950)3:1<32::aid-cnrcr2820030106>3.0.co;2-3)
- Yuzhu, H., Xiaomei, W., Shuyao, S. (2011). Nitrogen determination in pepper (*Capsicum frutescens* L.) plants by color image analysis (RGB). *African Journal of Biotechnology*, <https://doi.org/10.5897/AJB11.197>

10.2 Preliminary investigation on systems for the preventive diagnosis of agricultural operating machines

Massimo Cecchini*¹, Francesca Piccioni¹, Serena Ferri¹, Vera Marcantonio¹, Gianluca Coltrinari¹, Guido Alfaro Degan², Danilo Monarca¹, Andrea Colantoni¹

¹ Department of Agriculture and Forest Sciences, University of Tuscia Via S. Camillo De Lellis, 01100, Viterbo (Italy)

² Department of Engineering, University of Roma TRE Via della Vasca Navale 79, 00100, Roma (Italy)

Abstract

The aim of the research consists in investigating on failures induced by vibrations on machines, with the focus on the agricultural ones. The research on literature has highlighted a considerable amount of data on the driving machines and not much on the operating machines, the ones we were focused on. For this reason, we decided to carry out a survey directly involving the people who deal with agricultural machinery on a daily basis: operators, subcontractors and manufacturers. They were asked about the most frequent breakage, with particular attention to the rotary harrow, the subject of study of this work. The questionnaire results show the types of failure the harrow is most vulnerable to, an indication about the times of failure and reparation, and the need to install a potentially useful preventive maintenance supporting system on these machines. Therefore, a part of the work focused on the proposal of a method of investigation for bearing failures in the rotary harrow, considering that these have been re-reported in both literature and in the above survey as the components mostly at risk. The proposed method in this work serves as a starting point to be developed in the future on board sensor-based maintenance system for continuous bearing monitoring.

Keywords: damage detection, failure, vibration, ultrasonic, fatigue, crack

Introduction

In industrial application, rolling bearings are considered as critical components (Mishra et al., 2016; Wang et al., 2010), in fact a defect in a bearing, unless detected in time, can cause considerable industrial damage (Sakai, 2009) as well as risks to human health. Approximately more than half of all machine failures are due to bearing faults (Wang et al., 2010; Thorsen and Dalva, 1999). Bearing defects, which occur during machine use, are called distributed defects (surface roughness, waviness, and off-size rolling elements) (Sunnarsjö, 1985; Meyer, 1980) whereas those occurring during the manufacturing process are called local defects (cracks, pits and spalls) (Marcantonio et al., 2019). The presence of defects leads to an increase in normal emission levels of noise and vibration in bearings (Sakai, 2009; Washo, 1996). Taking advantage of this feature, re-searchers afforded the evaluation of rolling bearings defect in different ways. Some of them ran bearings until their failure in order to monitor the change in vibration response (Reif and Lai, 1989; Nishio and Hoshiya, 1979), others intentionally introduced defects in the bearing under test to evaluate the noise and vibration response varying the size of the defect (Tandon, 1994). Monitoring bearing emissions, as an indication of wear, allows to manage a preventive maintenance of the machine components. This action avoids the unplanned maintenance, which takes place only at breakdowns and which causes much higher repair costs than simply repairing the faulty component if it detected earlier (Heng et al., 2009). Different methods are used for detection and diagnosis of bearing defects; they may be broadly classified as vibration and acoustic measurements, temperature measurements and wear debris analysis (Yang et al., 2013; Cantwell and Morton, 1992). A lot of studies have been carried out in literature about failure of driving machines, also in the agricultural fields (Sunnarsjö, 1985; Basseville et al., 1993; Farrar et al., 2001). But very few works have been conducted on agricultural operating machines. For this reason, this study takes into account the possible damages that can occur in the rolling bearings of agricultural operating machines, with particular focus on the rotary harrow. Firstly, a questionnaire has been proposed to workers who every day operate agricultural machinery in order to keep some information about the failures that usually affect harrows. Then, in order to evaluate the optimum level of operating conditions for the bearing in agricultural machine, we have monitored the emitted vibrations through a triaxial accelerometer fixed on the harrow structure. Over this optimum level a preventive maintenance is required. This paper shows the first raw values.

Materials and Methods

The research started with formulating a questionnaire aimed at agricultural operators and manufacturers of agricultural machinery. The purpose of the questionnaire was to determine the points of greatest risk of breakage in the rotary harrow and whether, in fact, a system of preventive maintenance can be actually useful ("activity one"). In parallel with the main subject of this study, an experiment was started at the experimental farm "N. Lupori" of the University of Tuscia, where it was possible to plan the data acquisition activities on rigid-tooth rotary harrow ("activity two").

Investigation of faults in agricultural machinery: the rotary harrow

Operators, subcontractors and manufacturers were asked to complete a questionnaire based on Google forms on the following:

1. Can you indicate below the role that best represents you at the present time?
2. What is the average frequency of failures in the power harrow?
3. What is the most common type of fault?
4. In the case of bearing failures, which are the most frequent ones?
5. In the event of a failure, how much do you think the average downtime (time from failure to repair) is?
6. In the most common cases of failure on a rotary harrow, how much do you think the repair costs will be? (indicate an approximate cost or range of costs, from a minimum of... to a maximum of...).
7. On a scale of 1 (not at all useful) to 5 (fully useful), how important would it be for you to have an on-board system that warns the driver in advance of a possible breakdown of the machine (detecting the first signs of deterioration of particular elements well in advance before actual breakdowns occur)?

2.2 Description of investigation method for bearing failures in the rotary harrow

The experimental activity for the characterization of the mechanical structure of the harrow was conducted within several days of measurements, due to the long time needed for analysis and data processing following each measurement cycle. The measurement of vibratory levels on the harrow's bearings was defined with the aim of identifying a method that can be repeated as much as possible. The harrow under investigation was characterized by the presence of 6 bearings, distributed in a symmetrical way with respect to the power take-off (PTO) with 3 bearings per side.

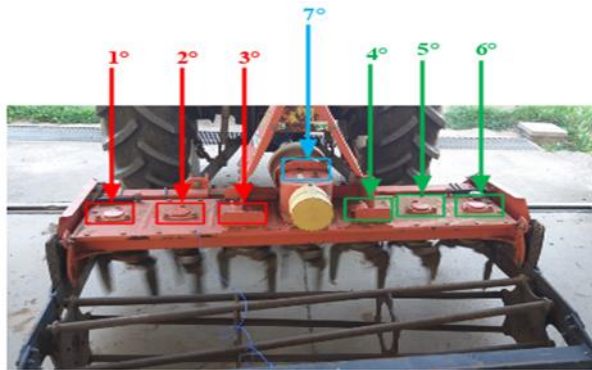


Fig. 1 Rotary harrow under investigation

The numbering was defined, observing the machine from behind, identifying with the nr. 1 the first bearing on the left and in progression up to the nr. 6, last on the right, as shown in Figure 1. The seventh bearing was assigned to the element mounted above the PTO. The positioning of the instrument is shown in Figure 2.



Fig. 2 Positioning the instrument near the machine

Measurements were made for each bearing from number 1 to number 6, then the last acquisition was performed on the seventh bearing while keeping the number of PTO laps constant with the following values: 600 rpm, 1000 rpm, 1500 rpm, 2000 rpm, 2500 rpm. The measurement was carried out in the following way:

- start-up of the instrument to measure the signal for the bearing being evaluated;
- interruption of the measurement via the “pause” command;
- shift of the accelerometer to the next bearing;
- measurement restart.

Seven-time intervals were then extracted from the total measurement, each of them corresponding to each harrow bearing. This measurement technique has made it possible to obtain, from a single acquisition, both an overall assessment of the phenomenon of all mechanical elements of the harrow and a specific characterization of each bearing. For each speed the measurements were repeated three times in sequence, with a break of about 15 minutes between tests. Each measurement was made with a triaxial 393 PCB accelerometer connected to a Soundbook® MK2 system and processed with the Noise Vibration Work® software. For each signal, a graph of the Time History (trend of the signal to the variation of the time) and frequency spectrum (1/3-octave bands), for both the overall measurement and for each of the single bearing were obtained. In addition, the values were also reported in terms of the equivalent level L_{eq} , both in time and in energy content at various frequencies. Finally, the analysis was performed both as an overall evaluation of the measurement and for each individual bearing in order to evaluate the stability of the source signal. To provide an example, some graphs are shown below. The work was organized according to the following criteria:

- analysis of the signal trend over time (Time History) to assess the presence of any anomalous components due to various factors, e.g. the instability of the hydraulic system that supports the harrow, which generated sudden impulsive components;
- analysis of the signal trend over time (Time History) to evaluate the presence of any anomalous components due to various factors, e.g. the instability of the hydraulic system that supports the harrow, which generated sudden impulsive components.

Results and Discussion

Questionnaire preliminary investigation

94% of the interviewees responded to the questionnaire. The results showed that the failures on the rotary harrow occur at least one time per year. The favorable setting for the failure is represented by the rolling bearings or the tooth, close to the knives near the gearbox. When a failure occurs, the average time needed for the repairing is around 2-3 days and the cost is about 900 euros. Fig. 3 shows the level of agreement of the interviewees for the implementation of an on-board system for preventive maintenance on rotary harrow: the x-axis shows the utility level from 1 (low interest) to 5 (high interest).

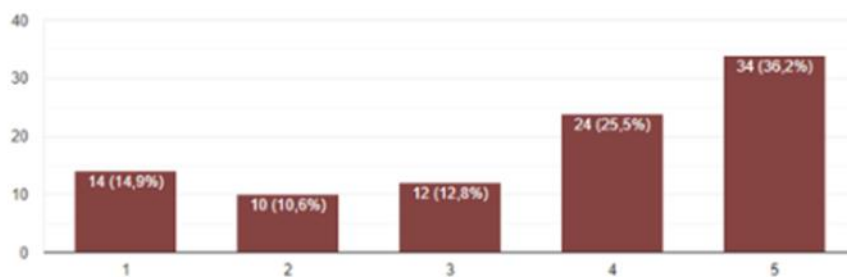


Fig. 3 Level of interest for the implementation of an on-board system for preventive maintenance on rotary har-row

Experimental investigation

The experimental activity, conducted on the rotary harrow under investigation, had the aim of identifying the stress of each rolling bearing, considering the amplitude values and frequency spectrum of the vibratory signal. Each measurement has been repeated three times for each rolling bearing and has been carried out at different rpm of the tractor engine in order to obtain a standardized measurement method. Fig. 4 and 5 show the acquisition data from the experimental measurement for the rolling bearings number 3 (see Figure 1).

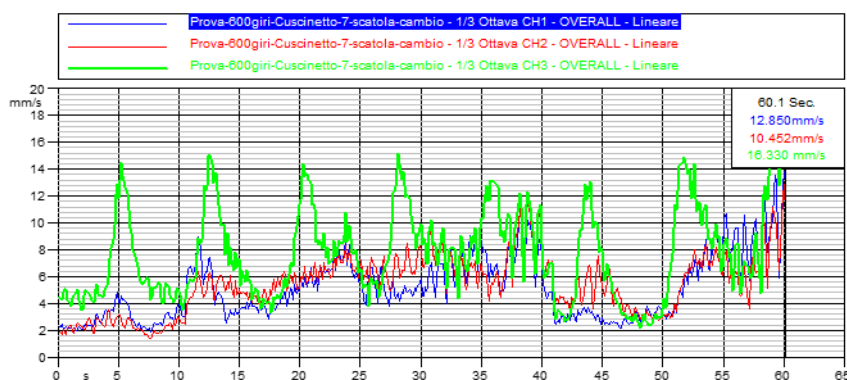


Fig. 4 Time history for bearing nr. 3 along three axes X, Y e Z

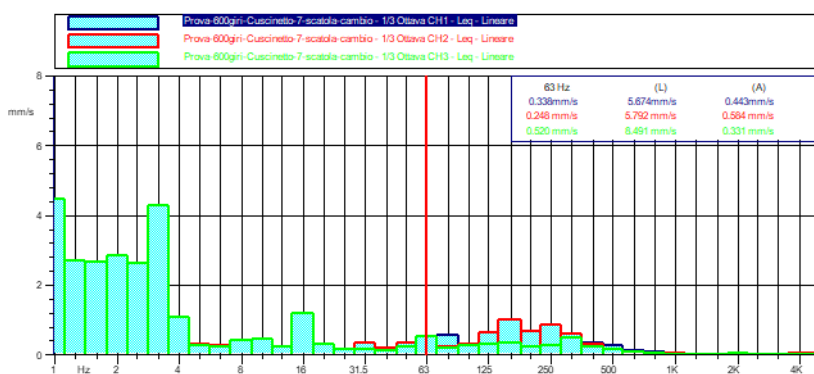


Fig. 5 Signal frequency spectrum of bearing nr. 3 along three axes X, Y e Z

Results shown in Figure 3 and Figure 4 have demonstrated a decrease of acceleration values along with the increase of rpm, especially for the rolling bearings set on the right side of the rotary harrow under investigation.

Conclusions

With the aim of demonstrating the useful applications of a preventive maintenance system used on to agricultural operating machines, a questionnaire was conducted, considering the rotary harrow as machine reference. This questionnaire, directed to agricultural workers and machine manufacturers, on the one hand, highlighted the most frequent types of breakage and, on the other hand, the need to have a fault detection system on board. Moreover, the investigation showed that the greatest number of failures concern the rolling bearings inside the machine's kinematic chain. The proposing measurement method to evaluate the level of damage through emitted vibration of rolling bearings seems to be useful. It was made through tri-axial accelerometers along the three axes of each rolling bearing of the rotary harrow. The measurement was repeated for each configuration with fixed laps. At the end of the data acquisition, the frequency spectrum and vibration levels of each bearing were compared to evaluate the effect of arising of any anomalous components due to the wear. The results show different wear degree of the bearing due to the characteristics of mechanical transmission from the PTO to each wheel cogged. Although many factors influenced the signal stability, the measurements showed an acceptable degree of accuracy. For the future, more measurements will be conducted on the same kind of rotary harrow at different wear levels (e.g. changing the rolling bearings using several kind of wears) in order to generalize the behaviour of damage occurring in rotary components.

Acknowledgements

The financial support was provided by PRIN 2015KTY5NW “Optimization of operating machinery through the mission profile analysis for a more efficient agriculture” and MIUR Law 232/2016, Italian Univ. Departments of excellence.

References

- Basseville, M., Benveniste, A., Gach-Devauchelle, B., Goursat, M., Bonnetcase, D., Dorey, P., Prevosto, M., and Olagnon, M. (1993). In Situ Damage Monitoring in Vibration Mechanics: Diagnostics and Predictive Maintenance. *Mech. Syst. Signal Process.*, 7(5), 401–423.
- Cantwell, W. J., and Morton, J. (1992). The Significance of Damage and Defects and Their Detection in Composite Materials: A Review. *J. Strain Anal. Eng. Des.*, 27(1), 29–42.
- Farrar, C. R., Doebling, S. W., and Nix, D. A. (2001). Vibration-based Structural Damage Identification. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. A Math. Phys. Eng. Sci.*, 359(1778), 131–149.
- Heng, A., Zhang, S., Tan, A. C. C., and Mathew, J. (2009). Rotating Machinery Prognostics: State of the Art, Challenges and Opportunities. *Mech. Syst. Signal Process.*, 23(3), 724–739.
- Marcantonio, V., Monarca, D., Colantoni, A., and Cecchini, M. (2019). Ultrasonic Waves for Materials Evaluation in Fatigue, Thermal and Corrosion Damage: A Review. *Mech. Syst. Signal Process.*, 120.
- Meyer, L. D., Ahlgren, F. F., and Weichbrodt, B. (1980). An Analytic Model for Ball Bearing Vibrations to Predict Vibration Response to Distributed Defects. *J. Mech. Des.*, 102(2), 205.
- Mishra, C., Samantaray, A. K., and Chakraborty, G., (2016). Rolling Element Bearing Defect Diagnosis under Variable Speed Operation through Angle Synchronous Averaging of Wavelet De-Noised Estimate. *Mech. Syst. Signal Process.*, 72–73, 206–222.
- Nishio, K., Hoshiya, S. M. T. (1979). An Investigation of the Early Detection of Defects in Ball Bearings by the Vibration Monitoring. *ASME Pap. 79-DET-45. New York ASME*, 1979.
- Reif, Z. and Lai, M. (1989). Detection of Developing Bearing Failures by Means of Vibration. *ASME Des. Eng Div*, 18(1), 231–6.
- Sakai, T. (2009). Review and Prospects for Current Studies on Very High Cycle Fatigue of Metallic Materials for Machine Structural Use. *J. Solid Mech. Mater. Eng.*, 3(3), 425–439.
- Sunnersjö, C. S. (1985). Rolling Bearing Vibrations—The Effects of Geometrical Imperfections and Wear. *J. Sound Vib.*, 98(4), 455–474.
- Tandon, N. (1994). A Comparison of Some Vibration Parameters for the Condition Monitoring of Rolling Element Bearings. *Measurement*, 12(3), 285–289.
- Tandon, N., and Choudhury, A. (1999). A Review of Vibration and Acoustic Measurement Methods for the Detection of Defects in Rolling Element Bearings. *Tribol. Int.*, 32(8), 469–480.

- Thorsen, O. V., and Dalva, M. (1999). Failure Identification and Analysis for High-Voltage Induction Motors in the Petrochemical Industry. *IEEE Trans. Ind. Appl.*, 35(4), 810–818.
- Wang, C., Gao, R. X., Yan, R., and Malhi, A. (2009). Rolling Bearing Defect Severity Assessment under Varying Operating Conditions. *Int. J. Manuf. Res.*, 4(1), 37–56.
- Washo, M. W. (1996). A Quick Method of Determining Root Causes and Corrective Actions of Failed Ball Bearings. *Lubric Eng*, 52(3), 206–13.
- Yang, Y., Wang, H., Cheng, J., and Zhang, K. (2013). A Fault Diagnosis Approach for Roller Bearing Based on VPMCD under Variable Speed Condition. *Measurement*, 46(8), 2306–2312.

11.0 Bibliografia

- Hiranvarachat B., Suvarnakuta P., Devahastin S., 2008. Isomerisation kinetics and antioxidant activities of β - carotene in carrots undergoing different drying techniques and conditions. *Food Chemistry*. 107: 1538- 1546.
- Raponi F., Moschetti R., Monarca D., Colantoni A., Massantini R., 2017. Monitoring and optimization of drying fruits and vegetables process using computer vision: a review. *Organic eprints*. 9: 1- 27.
- Marfil, P. H. M.; Santos, E. M.; Telis, V. R. N., Ascorbic acid degradation kinetics in tomatoes at different drying conditions. *Lwt-Food Science and Technology* 2008, 41, (9), 1642-1647.
- Sanjinez-Argandona, E. J.; Cunha, R. L.; Menegalli, F. C.; Hubinger, M. D., Evaluation of total carotenoids and ascorbic acid in osmotic pretreated guavas during convective drying. *Italian Journal of Food Science* 2005, 17, (3), 305-314.
- Keey, R.B. (1972). *Drying: Principles and Practice*, Pergamon Press.
- Fennema, O.R. (1985). *Food Chemistry*, 2nd ed. Revised and expanded, New York Marcel Dekker.
- Hawladar, M. N. A., Perera, C.O., Tian, M., & Yeo, K.L. (2006). *Drying of guava e papaya: Impact of different drying methods*, *Drying Technology – An International Journal*, 24(1).
- Günes, B., Bayindirh, A. (1993). *Peroxidase and lipoxxygenase inactivation during blanching of green beans, green peas and carrots*, *Lebensm–Wiss u-Technol*, 26(5).
- Fakhoury, F.M., Martelli, S.M., Bertan, L.C., Yamashita, F., Innocentini-Mei, L.H., & Collares-Queiroz, F.P. (2012). *Edible films made from blends of manioc starch and gelatin – influence of different types of plasticizer and different levels of macromolecules on their properties*, *LWT – Food Science and Technology*, 49.
- Garcia, C.C., Caetano, C.L., Silva, K.S., & Mauro, M.A. (2014). *Influence of edible coating on the drying and quality of papaya (Carica papaya)*, *Food and Bioprocess Technology*.
- Lago-Vanzela, E.S., Nascimento, P., Fontes, E.A.F., Mauro, M.A., & Kimura, M. (2013). *Edible coatings from native and modified starches retain carotenoids in pumpkin during drying*, *LWT: Food Science and Technology*, 50.
- Iyengar, R., McEvil, A.J. (1992). *Anti-browning agent's alternatives to the use of sulfites in foods*, *Trends in Food Sciece&Technology*,3.
- Limbo, S., Piergiovanni, L. (2006). *Shelf life of minimally processed potatoes. Part 1. Effects of high oxygen partial pressures in combination with ascorbic and citric acids on enzymatic browning*, *Postharvest Biology and Technology*, 39.

Attività 1

The effects of microwave blanching conditions on carrot slices optimization and comparison.

(D. Bas, K. Sezer, A. Demirdoven).

Faculty of Engineering and Natural Sciences, Department of Food Engineering. (Gaziosmanpas).

Polyphenoloxidase Activity and Color of Blanched and High Hydrostatic Pressure Treated Banana Puree.

(E. Palou, A. López-Malo, G. V. Barbosa-Cánovas, J. Welte-Chanes, B. G. Swanson).

Choosing an appropriate drying model for intermittent and continuous drying of bananas.

(R. Baini, T.A.G. Langrish, Abbott J.A.)

“Quality measurement of fruits and vegetables”, Postharvest Biology and Technology.

Nicolai B. M., Beullens K., Bobelyn E., Peirs A., Saeys W., Theron K. I., Lammertyna (15, 207-225, 1999).

“Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy”, Postharvest Biology and Technology. Johnsen E., 1997.

How to use on-line NIR in the feed and food industries. Process Control and Quality.

Conservazione degli Ortofrutticoli, tecnologie e aspetti fisiologici-qualitativi.

G. Anelli, F. Mencarelli, 1990

Mechanism of Surface White Discoloration of Peeled (Minimally Processed) Carrots During Storage

L. Cisneros-Zevallos, M. E. Saltveit, J. M. Krochta; 1995

Anatomical and physiological evidence of white blush on baby carrot surfaces.

Ventrella, Marília C., Moretti, Celso L., Carnelossi, Marcelo A.G., Puschmann, Rolf; 2010.

Attività 2

- Akoy, E.O. (2014). Experimental characterization and modeling of thin-layer drying of mango slices, *International Food Research Journal*, 21(5),1911-1917.
- Akpınar, E.K. (2006). Determination of suitable thin-layer drying curve model for some vegetables and fruits, *Journal of Food Engineering*, 73, 75-84.
- Banga, O. (1963) Origin and distribution of the western cultivated carrot, «*Genetica Agraria*», 17, 357-370.
- Bennion, M. (1980). *The Science of Food*, John Wiley & Sons, USA.
- Britton, G. (1995). UV/visible spectroscopy. In Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (eds), *Carotenoids: Spectroscopy*, vol 1B. Birkhäuser Verlag, Basel, 13-63.
- Calabrese, M. et al. (2009). Content of high bio available carotenoids in tomato-based products, *Journal of Commodity Science, Technology and Quality*, 48, 5-18.
- Carrin, M.E. & Crapiste, G.H. (2008). Convective drying of foods. In: Ratti C, editor. *Advances in food dehydration*. Boca Raton, FL: CRC Press. 123-152.
- Cihan, A., Ece, M.C. (2001). Liquid diffusion model for intermittent drying of rough rice. *Journal of Food Engineering*, 49, 327-331.
- Clevidence, B., Inke, P., & Cecil Smith, J. (2000). Bioavailability of carotenoids from vegetables, *HortScience*, 35(4), 585-588.
- Da Silva, W.P., Rodrigues, A.F., Silva, C.M.D.P.S., De Castro, D.S., Gomes, J.P. (2015). Comparison between continuous and intermittent drying of whole bananas using empirical and diffusion models to describe the process, *Journal of Food Engineering*, 166, 230-236.
- Davies, BH. (1976). Carotenoids. In Goodwin TW, *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. 2nd edition, vol 2. Academic Press, 38-165.
- Duc, L.A., Woong Han, J., Hyuk Keum, D. (2011). Thin layer drying characteristics of rapeseed, *Journal of Stored Products Research* (47), 32-38.
- El-Beltagy, A., Gamea, G.R., Essa, A.H.A. (2007). Solar drying characteristics of strawberry, *Journal of Food Engineering* (78),456-64.
- Erbay, Z., Icier, F. (2010). A review of thin layer drying of foods: Theory, modelling and experimental results, *Critical reviews in Food Science and Nutrition* (50), 441-464.
- Fakhoury, F.M., Martelli, S.M., Bertan, L.C., Yamashita, F., Innocentini-Mei, L.H.,&Collares-Queiroz, F.P. (2012). Edible films made from blends of manioc starch and gelatin – influence of different types of plasticizer and different levels of macromolecules on their properties, *LWT – Food Science and Technology*, 49.

- Fennema, O.R. (1985). *Food Chemistry*, 2nd ed. Revised and expanded, New York Marcel Dekker.
- Garcia, C.C., Caetano, C.L., Silva, K.S., & Mauro, M.A. (2014). Influence of edible coating on the drying and quality of papaya (*Carica papaya*), *Food and Bioprocess Technology*.
- Giovannelli, G. & Pagliarini, E. (2009). Antioxidant Composition of tomato products typically consumed in Italy, *Italian Journal of Food Science*, 21, 305-316.
- Günes, B., Bayindirli, A. (1993). Peroxidase and lipoxygenase inactivation during blanching of green beans, green peas and carrots, *Lebensm-Wiss u-Technol*, 26(5).
- Hashim, N., Onwude, D., Rahaman, E. (2014). A preliminary study: kinetic model of drying process of pumpkins (*Cucurbita moschata*) in a convective hot air dryer, *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2(2), 345-352
- Hawladar, M. N. A., Perera, C.O., Tian, M., & Yeo, K.L. (2006). Drying of guava e papaya: Impact of different drying methods, *Drying Technology – An International Journal*, 24(1).
- Hsu, C.L., Chen, W., Weng, Y.M., & Tseng, C.Y. (2003). Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods, *Food Chemistry*, 83(1), 85-92.
- Iyengar, R., McEvil, A.J. (1992). Anti-browning agents alternatives to the use of sulfites in foods, *Trends in Food Sciece&Technology*,3.
- Kaur, K., Singh, A.K. (2014). Drying kinetics and quality characteristics of beetroot slices under hot air followed by microwave finish drying, *African Journal of Agricultural Research*, 9(12), 1036-1044.
- Keey, R.B. (1972). *Drying: Principles and Practice*, Pergamon Press.
- Kerkhofs, N., Lister, C., Savage, G. (2005). Change in colour and antioxidant content of tomato cultivars following forced-air drying, *Plant Foods for Human Nutrition*, 60, 117-121.
- Lago-Vanzela, E.S., Nascimento, P., Fontes, E.A.F., Mauro, M.A., & Kimura, M. (2013). Edible coatings from native and modified starches retain carotenoids in pumpkin during drying, *LWT: Food Science and Technology*, 50.
- Lercker, G., Lerici, C.R. (1983). *Principi di tecnologie alimentari*, Cooperativa Libreria Universitaria Editrice Bologna, 240-262.
- Limbo, S., Piergiovanni, L. (2006). Shelf life of minimally processed potatoes. Part 1. Effects of high oxygen partial pressures in combination with ascorbic and citric acids on enzymatic browning, *Postharvest Biology and Technology*, 39.
- Maskan, M. (2000). Drying, shrinkage and rehydration characteristics of kiwifruits during hot air and microwave drying, *Journal of Food Engineering*, 48, 177-182.

Moscetti, R., Haff P.R., Ferri, S., Raponi, F., Monarca, D., Liang, P., & Massantini, R. (2017). Real-Time Monitoring of Organic Carrot (var. Romance) During Hot-Air Drying Using Near-Infrared Spectroscopy, *Food and Bioprocess Technology*.

Omolola, A.O., Jideani, A.I.O., Kapila, P.F. (2014). Modeling microwave-drying kinetics and moisture diffusivity of Mabonde banana variety, *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 7(6), 107-113.

Onwude, D.I., Hashim, N., Janius, R.B., Nawi, N.M., & Abdan, K. (2016). Modeling the Thin-Layer Drying of Fruits and Vegetables: A Review. *Food Science and Food Safety* (15), 599-618.

Panchariya, P.C., Popovic, D., Sharma, A.L. (2002). Thin layer modelling of black tea drying process, *Journal of Food Engineering* (52), 349-357.

Pardeshi, I.L., Arora, S., Borker, P.A. (2009). Thin-layer drying of green peas and selection of a suitable thin-layer drying model, *Drying Technology*, 27(2), 288-295.

Perry, S., Kleme, J.Í., Bulatov, I. (2016). Integrating waste and renewable energy to reduce the carbon footprint of locally integrated energy sectors, *Energy*, 33.

Ranalli, P., Sansavini, S. (2012). Manuale di ortofrutticoltura. Innovazioni tecnologiche e prospettive di mercato, *Edagricole*, 426-434.

Rhim, J., Wu, Y., Weller, C., & Schnepf, M. (1999). Physical characteristics of a composite film of soy protein isolate and propyleneglycol alginate, *Journal of Food Science*, 64(1), 149-152.

Sacilik, K. (2007). Effect of drying methods on thin-layer drying characteristics of hull-less seed pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). *Journal of Food Engineering*, 79(1), 23-30.

Shi J., Maguer, M., Kakuda, Y., Liptay, A., & Niekamp, F. (1999). Lycopene degradation and isomerization in tomato dehydration, *Food Research International*, 32, 15-21.

Su, Y., Zhang, M., & Mujumdar, A.S. (2015). Recent developments in smart drying technology. *Drying Technology*, 33(3), 260-276.

Thane, C., and Reddy, S. (1997). Processing of Fruits and Vegetables: Effect on Carotenoids. *Nutrition & Food Science*, 2, 58-65.

Vega, A., Fito, P., Andrés, A., Lemus, R. (2007). Mathematical modeling of hot-air drying kinetics of red bell pepper (var. Lamuyo), *Journal of Food Engineering*, 79, 1460-1466.

Zhao, Y., & Xie, J. (2004). Pratical applications of vacuum impregnation in fruit and vegetable processing. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 434-451.

Attività 3

Edagricole scolastico, F. Bonciarelli- U. Bonciarelli 2001. Coltivazioni erbacee

Dennis R. Heldman, Daryl B. Lund, Handbook of Food Engineering, Second Edition, 2007, CRC PRESS.

Bendary E., Francis R.R., Ali H. M. G., Sarwat M. I., El Hady S., 2013. Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Sciences*. 58: 173- 181.

Mercier J.J., Arul J., Julien C., 1994. Effect of food preparation on the isocoumarin 6-methoxymellein content of UV- treated carrots. *Food Res*. 27: 401- 404.

Nagai T., Reiji I., Hachiro I., Nobutaka S., 2003. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chem*. 80: 29- 33.

Xiao HW, Bai JW, Sun DW, Gao ZJ. The application of superheated steam impingement blanching (SSIB) in agricultural products processing – a review. *J Food Process Eng*. 2014;132:39–47. 10.1016/j.jfoodeng.2014.01.032

Ada Brambillaa, Dario Maffib , Anna Rizzoloa. Study of the influence of berry-blanching on syneresis in blueberry purées. 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11) - *Procedia Food Science* 1 (2011) 1502 – 1508

R. Paul Singh e Dennis R. Heldman. *Principi di tecnologia alimentare*; 2015, Casa editrice ambrosiana

Hiranvarachat B., Suvarnakuta P., Devahastin S., 2008. Isomerisation kinetics and antioxidant activities of β - carotene in carrots undergoing different drying techniques and conditions. *Food Chemistry*. 107: 1538- 1546.

Raponi F., Moscetti R., Monarca D., Colantoni A., Massantini R., 2017. Monitoring and optimization of drying fruits and vegetables process using computer vision: a review. *Organic eprints*. 9: 1- 27.

Prochaska L. J., Nguyen X. T., Donat N., Piekutowski W. V., 2000. Effects of food processing on the thermodynamic and nutritive value of foods: literature and database survey. *Medical Hypotheses*. 54(2): 254- 262.

Greve L. C., McArdle R. N., Gohlke J. R., Labavitch J. M., 1994. Impact of heating on carrot firmness: Change in cell wall components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42: 2900–2906.

Hincha, D. K., & Crowe, J. H. (Timasheff S.N., 1993. The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu Rev Bioph Biom*. 22:67–97.

Timasheff S.N., 1993. The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu Rev Bioph Biom*. 22:67–97.

Branca, C., Magazu, S., Maisano, G., Migliardo, P., & Tettamanti, E. (1999). On the bioprotective effectiveness of trehalose: ultrasonic technique, Raman scattering and NMR investigations. *Journal of molecular structure*, 480, 133-140.

Roser, B. (1991). Trehalose, a new approach to premium dried foods. *Trends in Food Science & Technology*, 2, 166-169.

Gomyo T., & Horikoshi M., 1976. On the interaction of melanoidins with metal ions. *Journal of Agricultural and Biological Chemistry*. 40: 33–40.

Kirigaya N., Kato H., Fujimaki M., 1968. Studies on antioxidant activity of nonenzymatic browning reaction products. Part I. Reaction of colour intensity and reductions with antioxidant activity of browning reaction products. *Journal of Agricultural and Biological Chemistry*. 32: 287–290.

Pither, R. J., 2003. Quality changes during canning. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 1111: 845–851.

Leadley C., Tucker G., Fryer P., 2008. A comparative study of high pressure sterilisation and conventional thermal sterilisation: Quality effects in green beans. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9(1): 70–79.

Patras A., Tiwari B.K., Brunton N.P., Butler F., 2009. Modelling the effect of different sterilisation treatments on antioxidant activity and colour of carrot slices during storage. *Food Chemistry*. 114: 484- 491.

Zhao, Y., & Xie, J. (2004). Practical applications of vacuum impregnation in fruit and vegetable processing. *Trends in food science & technology*, 15(9), 434-451.

- Escriche, A. Chiralt, J. Moreno, J.A. Serra Influence of blanching-osmotic dehydration treatments on volatile fraction of strawberry. *Journal of Food Science*, 65 (2000), pp. 1107-1111
- Wang, K., Zhonghua Liu, F.L., Huang, J., Xu, Z., Li, Y., Chen, J., Gong, Y., Yang, X., 2011. Comparison of catechins and volatile compounds among different types of tea using high performance liquid chromatograph and gas chromatograph mass spectrometer, *Int. J. Food Sci Technol*, 46, page 1406–1412.
- Santana-Rios, G., Orner, G.A., Amantana, A., Provost, C., Wu, S.-Y. & Dashwood, R.H., 2001. Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the Salmonella assay. *Mutation Research*, 495, 61–74.
- Zhen, Y.S., Chen, Z.M., Cheng, S.J. & Chen, M.L., 2002. *Tea Bioactivity and Therapeutic Potential*. London: Taylor & Francis, CRC Press Inc.
- Hosoda, K., Wang, M.-F., Liao, M.-L. et al., 2003. Antihyperglycemic effect of Oolong tea in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 26, 1715–1718.
- Sato, S., Sasaki, Y., Adachi, A., Dai, W., Liu, X.-L. & Namimatsu, S. 2003. Use of oolong tea extract (OTE) for elastin staining and enhancement in ultrathin sections. *Medical Electron Microscopy*, 36, 179–182.
- Halder, B., Pramanick, S., Mukhopadhyay, S. & Giri, A.K., 2006. Anticlastogenic effects of black tea polyphenols theaflavins and thearubigins in human lymphocytes in vitro. *Toxicology in Vitro*, 20, 608–613.
- Lu, C.-H. & Hwang, L.S., 2008. Polyphenol contents of pu-erh teas and their abilities to inhibit cholesterol biosynthesis in Hep G2 cell line. *Food Chemistry*, 111, 67–71.
- Wang, B.-S., Yu, M.H., Chang, L.-W., Yen, W.-J. & Duh, P.-D., 2008. Protective effects of pu-erh tea on LDL oxidation and nitric oxide generation in macrophage cells. *LWT Food Science and Technology*, 41, 1122–1132.
- Camouse, M.M., Domingo, D.S., Swain, F.R. et al., 2009. Topical application of green and white tea extracts provides protection from solar-simulated ultraviolet light in human skin. *Experimental Dermatology*, 18, 522–526.
- J.D. Ponting Osmotic dehydration of fruits Recent modifications and applications *Process Biochemistry*, 8 (1973), pp. 18-20.

J.D. Ponting, G.G. Watters, R.R. Forrey, R.Jackson, W.L. Stanley Osmotic dehydration of fruits
Food Technology, 29 (1966), p. 125

P. Talens, I. Escriche, N. Martinez-Navarrete, A.Chiralt Study of the influence of osmotic
dehydration and freezing on the volatile profile of strawberries. Journal of Food Science, 67
(2002), pp. 1648

P. Fito, A. Chiralt, N. Betoret, M. Gras, M.Chafer, J. Martinez Monzo, A. Andres, D. Vidal.,
2001. Vacuum impregnation and osmotic dehydration in matrix engineering application in
functional fresh food development Journal of Food Engineering, 49 , pp. 175-183.

Koca, Burdurlu e Karadeniz., 2007, Kinetic of colour changes in dehydrated carrots. Journal of
Food Engineering 78(2):449-455 · January 2007 with 85 Reads

D. Zhang e Y. Hamazu, 2004. Phenolic compounds and their antioxidant properties in different
tissues of carrots (*Daucus carota* L.). Sciences of Functional Foods, Graduate School of
Agriculture, Shinshu University, 8304 Minami-minowa, Kami-ina, Nagano 399-4598 Japan.

Ahmed, J., Shivhare, U.S., Raghavan, G.S.V., **2000**. Rheological characteristics and kinetics
of colour degradation of green chilli puree. *Journal of Food Engineering*. 44: 239–244.

Troller, John A., 1980. Influence of water activity on microorganisms in foods. From the
journal. Food Technology (USA).

Anthony J. Fontana, Jr 2008. Minimum Water Activity Limits for Growth of Microorganisms.