

G. ZEPPA^{1*} - C. TURON²

¹Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali ed Alimentari, Università degli Studi di Torino - Largo P. Braccini 2 - 10095 Grugliasco - TO - Italia

²Ecole des Mines d'Albi - Campus Jalard - 81013 - Albi Cedex 09 - France

*email: giuseppe.zeppa@unito.it

VALUTAZIONE MEDIANTE “CENTRAL COMPOSITE DESIGN” DELLA DEGRADAZIONE DELLA CLOROFILLA DURANTE LA PASTORIZZAZIONE DEL PESTO

Application of the Central Composite Design approach to define chlorophyll degradation during Pesto sauce pasteurization

Parole chiave: Pesto, Central Composite Design, pastorizzazione, CIELab, clorofilla
Keywords: Pesto, Central Composite Design, pasteurisation, CIELab, chlorophyll

INTRODUZIONE

Il Pesto è un tipico condimento di origine ligure i cui ingredienti sono il basilico, l'olio extra vergine di oliva, il formaggio (in genere di tipo Grana e/o Pecorino), i pinoli, le noci, l'aglio ed il sale. Benché sia nato come prodotto tradizionale e casalingo, negli ultimi anni ha però suscitato l'interesse del mercato nazionale ed internazionale e la sua produzione è passata al livello industriale.

La ricetta di produzione prevede che l'aglio ed il basilico vengano macinati con il sale al fine di ottenere una pasta a cui vengono aggiunti i pinoli, le noci ed i formaggi anch'essi trasformati in una pasta. Alla miscela viene infine aggiunto l'olio per dargli la caratteristica struttura semi-solida. Il prodotto così ottenuto è una salsa dall'intenso colore verde caratterizzata da un tipico odore/aroma di basilico, olio e formaggio e commercializzata fresca, congelata o pastorizzata/sterilizzata. Nel prodotto pastorizzato/sterilizzato

vengono in genere aggiunte anche piccole quantità di acido ascorbico o citrico al fine di ridurre le temperature di pastorizzazione abbassando il pH, contenere l'ossidazione, inattivare alcuni enzimi e contribuire all'aroma del prodotto (FAO, 1995; Wanasundara e Shahidi, 2005).

Il trattamento termico determina però nel prodotto un cambiamento cromatico ed il colore passa dal verde brillante del prodotto fresco, molto attrattivo per il consumatore, al verde-bruno poco apprezzato invece dai consumatori.

Questo cambiamento è dovuto alla degradazione dei pigmenti del basilico fresco quali le clorofille (CLO) particolarmente sensibili alle varie reazioni chimiche ed enzimatiche di degradazione che si hanno nel prodotto anche in relazione alla simultanea azione di enzimi, acidi liberi, ossigeno, luce e calore (Heaton e Marangoni, 1996; Mangos e Berger, 1997; Koca *et al.*, 2007).

È noto infatti che il colore dei vege-

SOMMARIO

Il Pesto è una tipica salsa italiana a base di basilico largamente conosciuta nel mondo e caratterizzata da un intenso colore verde. Il pesto può essere consumato fresco, ma al fine di aumentarne la shelf-life, viene in genere commercializzato dopo pastorizzazione. Questo trattamento determina però un cambiamento del colore con formazione di tonalità verde-bruno poco gradite dal consumatore. Poiché questo cambiamento di colore è dovuto alla degradazione della clorofilla e correlato al pH, alla temperatura ed al tempo di trattamento, in questo lavoro è stato utilizzato per la prima volta il modello sperimentale del Central Composite Design al fine di definire l'effetto delle suddette variabili sul colore del prodotto. Fra gli indici di colore utilizzati il $\Delta a^(D65)$ ha evidenziato la maggiore correlazione con il trattamento termico ed è stato utilizzato per definire delle funzioni matematiche che consentono di prevedere il cambiamento cromatico del prodotto durante il trattamento termico.*

SUMMARY

Pesto is a typical Italian sauce, widely known around the world, made from basil and characterised by an intense green colour. Pesto can be consumed fresh, but to reduce microbial spoilage and safety risk, it is generally pasteurized and this treatment, however, changes the colour to a not appreciated dark-brownish green. Since the colour change is due to the chlorophyll degradation and correlated with the pH, temperature and time, in this study, a Central Composite Design was applied for the first time to define the effect of these variables on the colour change of Pesto. Among the colour indices examined, $\Delta a^(D65)$ exhibited the highest correlation with thermal treatment and was used to define a regression equation and the response surfaces. The results highlighted, for the first time, the effects of pH, treatment temperature and time on the colour of pesto and yielded a regression equation that is useful in modelling the change in the product during thermal treatment.*



tali si trasforma durante un processo termico assumendo tonalità brune soprattutto in ambiente acido (Gold e Weckel, 1959; Gunawan e Barringer, 2000) e durante questa trasformazione gli idrogenioni causano la trasformazione delle clorofille in feofitine per sostituzione dello ione magnesio nell'anello porfirinico (Woolfe, 1979; Minguez-Mosquera *et al.*, 1989; van Boekel, 1999).

La conversione delle clorofille in feofitine segue una cinetica di primo ordine (Schwartz e von Elbe, 1983) quindi la trasformazione del colore dei vegetali segue anch'essa una cinetica di primo ordine (Gold e Weckel, 1959). Poiché il colore verde è una delle principali caratteristiche sensoriali che determina la qualità percepita dei prodotti vegetali verdi, è ovviamente molto importante prevenire o minimizzare nei prodotti trattati termicamente la degradazione della clorofilla durante il processo termico. Benché siano stati quindi condotti numerosi studi volti a definire il cambiamento di colore dei vegetali durante il processo termico (Buckle e Edwards, 1970; Chen e Chen, 1993; Lau *et al.*, 2000; Tijssens *et al.*, 2001) non esistono dati sugli effetti della pastorizzazione/sterilizzazione e dell'aggiunta di acidi sul cambiamento di colore del Pesto.

Lo scopo di questo lavoro è stato quindi quello di valutare gli effetti del trattamento termico e della acidificazione sulle caratteristiche cromatiche del Pesto.

A questo fine è stato utilizzato il metodo delle superfici di risposta (RSM) che costituisce uno strumento fondamentale nella ottimizzazione del processo quando le variabili in studio sono numerose ed indipendenti ed è

possibile una interazione fra di loro (in questo caso pH, tempo e temperatura del trattamento) (Mason *et al.*, 2003). La RSM utilizza un disegno sperimentale simile al Central Composite Design (CCD) per interpolare un modello mediante la tecnica dei minimi quadrati (Montgomery *et al.*, 2001; Vining, 2003) e l'adeguatezza del modello è valutata mediante l'analisi della varianza.

In questo lavoro è stata utilizzata una RSM con un disegno fattoriale 2^3 al fine di sviluppare le equazioni matematiche che interpretano il cambiamento del colore durante il trattamento termico di pastorizzazione/sterilizzazione.

Poiché l'estrazione e la quantificazione delle clorofille risulta critica per la presenza di elevate quantità di olio (Masino *et al.*, 2008), le variazioni di colore del Pesto sono state valutate mediante i parametri CIELab in modo simile a quanto è stato già fatto in altri lavori inerenti alla degradazione della clorofilla in vegetali verdi a causa di trattamenti termici (Steet e Tong, 1996; Weemaes *et al.*, 1999; Lau *et al.*, 2000).

MATERIALI E METODI

Materiali

Il Pesto è stato prodotto mescolando della pasta di basilico (Granda Tradizioni srl, Borgo San Dalmazzo, Cuneo, Italy) con olio di oliva e sale (15.3:81:3.7 in peso). Aglio, formaggio e pinoli non sono stati aggiunti in quanto il loro ruolo è esclusivamente quello di contribuire all'aroma tipico del prodotto nonché a ridurre l' a_w del prodotto. Il pH è stato misurato mediante un

pHmetro Crison GLP21 (Crison Instruments, Lainate, Milano, Italy) con elettrodo pH 50-15 (Crison Instruments, Lainate, Milano, Italy). Il cambiamento di pH nel Pesto è stato provocato mediante una soluzione satura di acido citrico (Sigma-Aldrich, Milano, Italy). Dopo il cambiamento del pH ogni campione è stato posto in un vasetto di vetro e pastorizzato seguendo le condizioni previste dal piano sperimentale.

Nello studio sono state esaminate due produzioni.

Metodi

Studio del colore

Il colore del Pesto è stato valutato mediante uno spettrocolorimetro Konica Minolta CM-5 (Minolta Corp, Osaka, Japan) nel sistema di colore CIELab con illuminante D65. I parametri valutati sono stati L (luminosità), a^* (rosso/verde) e b^* (giallo/blu). Ogni campione è stato misurato in una piastra Petri da 40 mL utilizzando 1 cm di spessore. Tutte le misure sono state effettuate in triplicato. Poiché i diversi test non sono stati effettuati nella stessa giornata ed è noto che la perdita di colore del prodotto è funzione del tempo, al fine di ottenere una migliore valutazione dei cambiamenti di colore indotti dal trattamento termico, sono stati utilizzati i valori di Δa^* (differenza dei valori di a^* fra i valori medi del Pesto fresco e del Pesto trattato), i valori di Δb^* (come per a^* , la differenza nei valori di b^* fra il prodotto fresco e quello trattato) e il valore $\Delta \left(-\frac{a}{b} \right)$ spesso utilizzato per valutare i cambiamenti di colore nei vegetali verdi (Shin e Bhowmik, 1995; Tijssens *et al.*, 2001; Koca *et al.*, 2007). Inoltre è



stato calcolato il valore $\Delta\theta = \Delta \tan^{-1} \left(\frac{b}{a}\right)$, già utilizzato per descrivere il cambiamento di colore indotto dal trattamento termico negli asparagi (Lau *et al.*, 2000), nei broccoli e nei fagiolini (Tijssens *et al.*, 2001) e nei pomodori (Thai *et al.*, 1990). La differenza di colore fra i prodotti freschi e quelli pastorizzati è stata calcolata mediante due indici ΔE . Il ΔE^*_{ab} è stato calcolato come $\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$, dove le varie Δ rappresentano la differenza fra le corrispondenti coordinate di due stimoli (Brainard, 2003). L'indice ΔE_{00} è stato invece calcolato come

$$\left\{ \left[\frac{\Delta L'}{(k_L S_L)} \right]^2 + \left[\frac{\Delta C'}{(k_C S_C)} \right]^2 + \left[\frac{\Delta H'}{(k_H S_H)} \right]^2 + R_T \left[\frac{\Delta C'}{(k_C S_C)} \right] \left[\frac{\Delta H'}{(k_H S_H)} \right] \right\}^{1/2}$$

dove $\Delta L'$, $\Delta C'$ e $\Delta H'$, sono le differenze in luminosità, croma e tonalità fra due campioni (Luo, Cui e Rigg, 2001). S_L , S_C e S_H sono rispettivamente i pesi per i componenti luminosità, croma e tonalità. I coefficienti K_L , K_C and K_H sono dei fattori parametrici che vengono definiti in funzione dei differenti parametri di osservazione. In questo studio ai valori K_L , K_C e K_H è stato assegnato il valore 1.

Disegno sperimentale

Al fine di creare un modello della degradazione del colore del Pesto durante il trattamento termico è stato utilizzato un CCD a tre fattori (Cochran e Cox, 1992). Poiché le clorofille del basilico sono sensibili alle alte temperature ed ai bassi valori di pH, questi due parametri, unitamente al tempo di trattamento sono stati utilizzati come variabili indipendenti. Per simulare il processo di produzione e la susseguente pastorizzazione

del Pesto le temperature (X_1 , °C) sono state settate fra i 60°C ed i 90°C, il pH (X_2) fra 5.2 (valore iniziale della salsa) e 3, ed il tempo (X_3 , sec) è stato settato fra 1.200 e 2.400 secondi.

Applicando la seguente equazione i valori di ogni singola variabile sono stati codificati così che risultassero compresi fra +1.682 e -1.682 e che il valore 0 risultasse il punto centrale:

$$x_i = \frac{X_i - \bar{X}}{\Delta X_i}$$

dove x_i è il valore codificato della variabile, X_i è il valore reale della variabile, \bar{X} è il valore reale della variabile al punto centrale e ΔX_i è il valore incrementale. Quindi

$$x_1 = \frac{X_1 - 75}{8.92}$$

$$x_2 = \frac{X_2 - 4.10}{0.65}$$

$$x_3 = \frac{X_3 - 1800}{356.72}$$

La **Tab. 1** riporta la matrice fattoriale con i valori delle variabili sia in forma codificata che reale. Si hanno così un totale di 20 prove incluse sei repliche del punto centrale.

Gli effetti della temperatura, del pH e del tempo sul colore del Pesto sono stati valutati mediante un modello polinomiale di II ordine:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^3 (b_i x_i + b_{ii} x_i^2) + \sum_{i < j} b_{ij} x_i x_j$$

dove y è la risposta calcolata (y_1 , è Δa^* (D65), y_2 è Δb^* (D65), y_3 è $\Delta \left(-\frac{a}{b}\right)$ e y_4 è la variazione della tonalità $\Delta\theta = -1 \left(\frac{a}{b}\right)$; y_u è la risposta osservata per i valori x_{1u} , x_{2u} , x_{3u} delle tre variabili indipendenti; u è il numero di esperimenti; b_0 è il valore alla condizione centrale; b_1 , b_2 e b_3 costituiscono i coefficienti per ciascuna variabile; b_{11} , b_{22} e b_{33} sono gli effetti al quadrato e b_{12} , b_{13} e b_{23} sono gli effetti delle interazioni.

Tabella 1 - Matrice del CCD utilizzato nella sperimentazione. Per ciascuno dei test è riportato il valore codificato e quello reale utilizzato nella prova.

Test	Temperatura (codice x_1)	pH (codice x_2)	Tempo (codice x_3)	Temperatura (°C)	pH	Tempo (s)
1	-1	-1	66,1	3,45	1,443	
2	1	-1	-1	83,9	3,45	1,443
3	-1	1	-1	66,1	4,75	1,443
4	1	1	-1	83,9	4,75	1,443
5	-1	-1	1	66,1	3,45	2,157
6	1	-1	1	83,9	3,45	2,157
7	-1	1	1	66,1	4,75	2,157
8	1	1	1	83,9	4,75	2,157
9	-1.682	0	0	60,0	4,10	1,800
10	1.682	0	0	90,0	4,10	1,800
11	0	-1.682	0	75,0	3,00	1,800
12	0	1.682	0	75,0	5,20	1,800
13	0	0	-1.682	75,0	4,10	1,200
14	0	0	1.682	75,0	4,10	2,400
15-20	0	0	0	75,0	4,10	1,800



I coefficienti b_i sono stati selezionati al fine di minimizzare la deviazione della somma dei quadrati (2) e sono stati determinati mediante la funzione Regressione Multipla Lineare di Matlab, versione 7.12.0.635(R2011) (MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, USA).

$$\sum_{u=1}^{20} (y_u - b_0 - b_{1x} - \dots - b_{23}x_{2u}x_{3u})^2, \quad (2)$$

Utilizzando Matlab è stata creata anche la superficie di isorisposta e sono stati calcolati i principali coefficienti statistici (R^2 , significatività, valore di F).

RISULTATI E DISCUSSIONE

La **Tab. 2** riporta i valori medi di L , a^* (D65), b^* (D65), Δa^* (D65), Δb^* (D65), $\Delta(-\frac{a}{b})$, $\Delta\theta$, ΔE_{ab} e ΔE_{00} ottenuti dalla valutazione del colore per ogni serie di combinazioni delle variabili indipendenti.

I valori di a^* (D65) e b^* (D65) evidenziano una elevata variabilità con valori medi compresi fra -2,38 e 10,78 per a^* (D65) e fra 19,38 e 24,55 per b^* (D65). I valori più elevati per il verde a^* (D65), sono stati misurati per il test 12 ed il test 20 dove il pH era circa 4,1 e risultano essere circa 3 volte più elevati di quelli ottenuti a pH 3,45. Il valore più basso (-2,38) per a^* (D65) è stato misurato per il test 11 dove il pH era di 3,00 ed il trattamento termico risultava essere di 75°C per 1.800 s. Per il parametro b^* (D65), i valori più elevati sono stati ottenuti per i test 12 e 20.

La differenza di colore ΔE che è una combinazione dei valori di L , a^* (D65) e b^* (D65) ed è un parametro cromatico ampiamente utilizzato per definire il cambiamento di colore che

avviene nel corso di un processo produttivo risulta compreso per il ΔE_{ab} fra 1,1 e 6,9, mentre per il ΔE_{00} risulta compreso fra 0,7 e 5,1.

I valori più bassi sono stati misurati per il test 9 dove vi era un pH di 4,10 e le condizioni di pastorizzazione erano di 60°C per 1.800 s mentre il valore più elevato è stato osservato per il test 6 con un pH di 3,45, 83,9°C e 2.157 s. Poiché è stato indicato che un valore di 3 per il ΔE_{ab} risulta percepibile dall'occhio umano (Martinez *et al.*, 2001) solo in alcuni test (1, 3, 4, 5, 7 e 9), la differenza di colore del pesto prima e dopo il trattamento termico non è percepibile. Per tutti questi test il pH risulta elevato (3,45 o 4,10) e la temperatura di trattamento molto bassa (60 o 66,1°C).

Per il ΔE_{00} , solo i test 2, 6, 10 e 11 hanno un valore superiore a 3. Per questi test il pH è in genere basso e la temperatura di pastorizzazione elevata.

I valori di significatività calcolati per le equazioni di regressione per Δa^* (D65), $\Delta(-\frac{a}{b})$, e $\Delta\theta$ sono altamente significativi ($P < 0,0001$) e quindi i modelli appaiono adeguati a descrivere la evoluzione di questi parametri nel corso del processo di pastorizzazione (**Tab. 3**). Al contrario il valore di significatività per Δb^* (D65) è di 0,006. Poiché il coefficiente di correlazione è di solo 0,836 questo modello risulta non essere in grado di interpretare i valori ottenuti dalla prova e quindi il parametro non è stato più considerato nel prosieguo dello studio.

Anche per i broccoli surgelati (Gunawan e Barringer, 2000), i piselli (Steet e Tong, 1996) ed i pomodori (Thai *et al.*, 1990) b^* non è stato utilizzato e Steet e Tong (1996) suggerirono di utilizzare solo il valore di $-a$ poiché risulta correlato sia al colore verde che alla accettabilità da parte dei consumatori.

Tabella 2 - Valori di L , a^* (D65), b^* (D65), Δa^* (D65), Δb^* (D65), $\Delta(-\frac{a}{b})$, ΔE_{ab} e ΔE_{00} misurati sul Pesto per ciascuna delle condizioni sperimentali esaminate. Per i parametri CieLab sono riportate media \pm deviazione standard.

Test	L	a^* (D65)	b^* (D65)	Δa^* (D65)	Δb^* (D65)	$\Delta(-\frac{a}{b})$	$\Delta\theta$	ΔE_{ab}	ΔE_{00}
1	19,83 \pm 0,35	-6,11 \pm 0,32	21,58 \pm 0,33	-1,954	-0,716	0,103	0,093	2,5	1,9
2	20,29 \pm 0,08	-4,45 \pm 0,13	21,02 \pm 0,33	-3,305	-2,165	0,200	0,182	5,1	3,8
3	18,49 \pm 0,43	-9,47 \pm 0,13	21,06 \pm 0,61	1,411	-0,195	-0,063	-0,054	1,4	1,0
4	19,34 \pm 0,23	-8,82 \pm 0,17	20,21 \pm 0,44	1,063	-1,354	-0,025	-0,021	2,9	1,8
5	19,59 \pm 0,22	-5,61 \pm 0,28	21,47 \pm 0,27	-2,457	-0,607	0,125	0,113	2,8	2,1
6	21,08 \pm 0,20	-3,01 \pm 0,20	21,67 \pm 0,20	-4,742	-2,812	0,272	0,252	6,9	5,1
7	19,20 \pm 0,56	-9,56 \pm 0,12	21,45 \pm 0,62	1,496	-0,588	-0,059	-0,050	1,8	1,2
8	19,83 \pm 0,17	-8,01 \pm 0,26	20,84 \pm 0,28	0,251	-1,978	0,027	0,023	3,5	2,2
9	17,53 \pm 0,28	-8,20 \pm 0,11	19,38 \pm 0,45	0,667	-0,609	-0,022	-0,019	1,1	0,7
10	20,21 \pm 0,54	-6,46 \pm 0,41	21,09 \pm 0,87	-0,986	-3,116	0,108	0,095	4,9	3,2
11	22,53 \pm 0,11	-2,38 \pm 0,05	24,03 \pm 0,13	-5,174	-1,693	0,239	0,227	5,8	4,5
12	22,71 \pm 0,69	-10,78 \pm 0,29	24,29 \pm 0,46	3,227	-1,957	-0,106	-0,092	4,3	2,7
13	22,43 \pm 0,28	-10,18 \pm 0,13	24,05 \pm 0,47	2,627	-1,718	-0,085	-0,074	3,6	2,2
14	22,58 \pm 0,42	-9,36 \pm 0,17	24,55 \pm 0,49	1,801	-2,221	-0,043	-0,038	3,5	2,0
15	22,22 \pm 0,07	-9,77 \pm 0,15	24,31 \pm 0,22	2,213	-1,973	-0,064	-0,056	3,4	2,0
16	22,21 \pm 0,16	-10,30 \pm 0,18	24,08 \pm 0,11	2,743	-1,750	-0,089	-0,078	3,6	2,2
17	22,30 \pm 0,17	-9,76 \pm 0,07	23,79 \pm 0,03	2,203	-1,457	-0,072	-0,063	3,1	2,0
18	22,37 \pm 0,25	-9,83 \pm 0,25	24,22 \pm 0,17	2,276	-1,890	-0,068	-0,059	3,5	2,1
19	22,63 \pm 0,23	-9,71 \pm 0,13	24,48 \pm 0,22	2,159	-2,150	-0,058	-0,052	3,7	2,2
20	22,35 \pm 0,22	-9,87 \pm 0,26	24,18 \pm 0,28	2,319	-1,844	-0,070	-0,062	3,4	2,1



Le equazioni di regressione calcolate per Δa^* (D65), $\Delta\left(-\frac{a}{b}\right)$, e $\Delta\theta$, e sono le seguenti (x_1 , x_2 e x_3 sono rispettivamente la temperatura, il pH ed il tempo):

$$\Delta a^* (D65) = 1,726 - 0,586x_1 + 2,256x_2 - 0,297x_3 - 0,844x_1^2 - 1,342x_2^2 - 0,215x_3^2 + 0,255x_1 \cdot x_2 - 0,229x_1 \cdot x_3 + 0,151x_2 \cdot x_3$$

$$\Delta\left(-\frac{a}{b}\right) = -0,0428 + 0,0434x_1 - 0,1026x_2 + 0,0163x_3 + 0,0375x_1^2 + 0,0553x_2^2 + 0,0091x_3^2 - 0,0148x_1 \cdot x_2 + 0,0123x_1 \cdot x_3 - 0,0048x_2 \cdot x_3$$

$$\Delta\theta = -0,0372 + 0,0389x_1 - 0,0936x_2 + 0,0147x_3 + 0,0329x_1^2 + 0,0518x_2^2 + 0,0079x_3^2 - 0,0151x_1 \cdot x_2 + 0,0114x_1 \cdot x_3 - 0,0053x_2 \cdot x_3$$

Per quanto concerne il modello calcolato per il Δa^* (D65) l'analisi statistica evidenzia un elevato coefficiente di correlazione ($R^2 = 0,954$) simile a quello ottenuto per il modello calcolato per $\Delta\left(-\frac{a}{b}\right)$ ed il $\Delta\theta$ (0,966 e 0,968 rispettivamente).

Poiché questi indici sono rappresentativi della perdita di colore del Pesto durante il riscaldamento, i modelli sono quindi utilizzabili per definire le condizioni ottimali di pastorizzazione.

Utilizzando i valori non codificati per le variabili con T espressa in °C e t espresso in secondi, le tre equazioni di regressione sono le seguenti:

$$\Delta a^* (D65) = -111,3 + 1,476T + 24,724pH + 0,00799t - 0,0106T^2 - 3,137374pH^2 - 1,69 \times 10^{-6}t^2 + 0,0438T \cdot pH - 7,19 \times 10^{-5}T \cdot t + 6,49 \times 10^{-4}pH \cdot t$$

$$\Delta\left(-\frac{a}{b}\right) = -4,7564 - 0,0624T - 0,9895pH - 4,177 \times 10^{-4}t + 4,715 \times 10^{-4}T^2 + 0,1293pH^2 + 7,1445 \times 10^{-8}t^2 - 2,539 \times 10^{-3}T \cdot pH + 3,8666 \times 10^{-6}T \cdot t - 2,0469 \times 10^{-5}pH \cdot t$$

Tabella 3 - Tavola dell'ANOVA per i modelli di interpolazione calcolati per ciascuna delle variabili cromatiche considerate nello studio.

	Valore di F	p	R ²	R ² _{adj}
$\Delta a^*(D65)$	23,12	<0,0001	0,954	0,913
$\Delta b^*(D65)$	5,68	0,006	0,836	0,689
$\Delta\left(-\frac{a}{b}\right)$	31,85	<0,0001	0,966	0,936
$\Delta\theta$	33,86	<0,0001	0,968	0,940

$$\Delta\theta = 4,1886 - 0,0536T - 0,9005pH - 3,579 \times 10^{-4}t + 4,146 \times 10^{-4}T^2 + 0,1211pH^2 + 6,2464 \times 10^{-8}t^2 - 2,588 \times 10^{-3}T \cdot pH + 3,5734 \times 10^{-6}T \cdot t - 2,2888 \times 10^{-5}pH \cdot t$$

Queste equazioni evidenziano l'importanza del pH e della temperatura durante la pastorizzazione nella definizione del cambiamento cromatico del Pesto e sono in accordo con quanto riportato da precedenti studi inerenti la perdita di colore dei vegetali durante i processi termici (Shin e Bhowmik, 1995; Steet e Tong 1996; Lau *et al.*, 2000; Tijskens *et al.*, 2001; Koca *et al.*, 2007).

In particolare, Ryan-Stoneham e Tong (2000) hanno dimostrato che l'intensità di degradazione della clorofilla è una funzione lineare del pH e che con pH da 5,5 a 7,5 il valore k decresce da 0,039 a 0,0031 a 90°C. Inoltre Steet e Tong (1996) hanno evidenziato l'effetto del pH sul valore a^* con un cambiamento dell'energia di attivazione da 14,0 a pH 5,5 a 4,8 con pH 7,5.

Questa correlazione è molto importante dal punto di vista tecnologico poiché il valore del pH decresce durante la conservazione come dimostrato per le foglie di bietola (Martinez *et al.*, 2013) e quindi si può avere un cambiamento di colore del Pesto pastorizzato anche durante la conservazione che è generalmente superiore ad un anno.

Il cambiamento nel valore di a^* è anche correlato alla composizione della clorofilla in quanto generalmente la clorofilla a degrada più rapidamente (approssimativamente 2,5 volte) che la clorofilla b , indipendentemente dal pH e dalla temperatura (Koca *et al.*, 2007), e probabilmente il basilico è più ricco in clorofilla a piuttosto che in clorofilla b (Masino *et al.*, 2008).

Per ottimizzare il mantenimento del colore del Pesto durante il trattamento termico è necessario quindi definire la corretta combinazione di tempo, temperatura e pH in accordo ai risultati ottenuti dalle equazioni polinomiali. Poiché la perdita di colore è rappresentata da un aumento di $\Delta\left(-\frac{a}{b}\right)$ e $\Delta\theta$ e da una diminuzione di Δa^* (D65), i migliori risultati si hanno minimizzando i valori di $\Delta\left(-\frac{a}{b}\right)$ e $\Delta\theta$ e massimizzando il Δa^* (D65).

La **Fig. 1** rappresenta la superficie di iso-risposta per i tre parametri di colore in funzione di ogni coppia di variabili mentre la terza variabile è fissata al valore centrale del test.

Tutti i grafici evidenziano che i minori cambiamenti di colore nel Pesto si hanno con pH più alti di 4,4 e temperature di circa 75°C. Il tempo di trattamento non sembra avere effetti sul colore del prodotto a pH di 4,1 e temperatura di 75°C.

Un cambiamento molto intenso di colore si ha con un aumento della temperatura, un lungo tempo di trattamento ed un pH basso mentre non si sono osservate correlazioni fra il pH ed il tempo di trattamento. Poiché non è possibile riportare contemporaneamente nelle superfici di iso-risposta gli effetti delle tre variabili (pH, tempo e temperatura) sui cambiamenti di colore del Pesto, i valori ottimali per $\Delta\left(-\frac{a}{b}\right)$, e $\Delta\theta$ e Δa^* (D65)

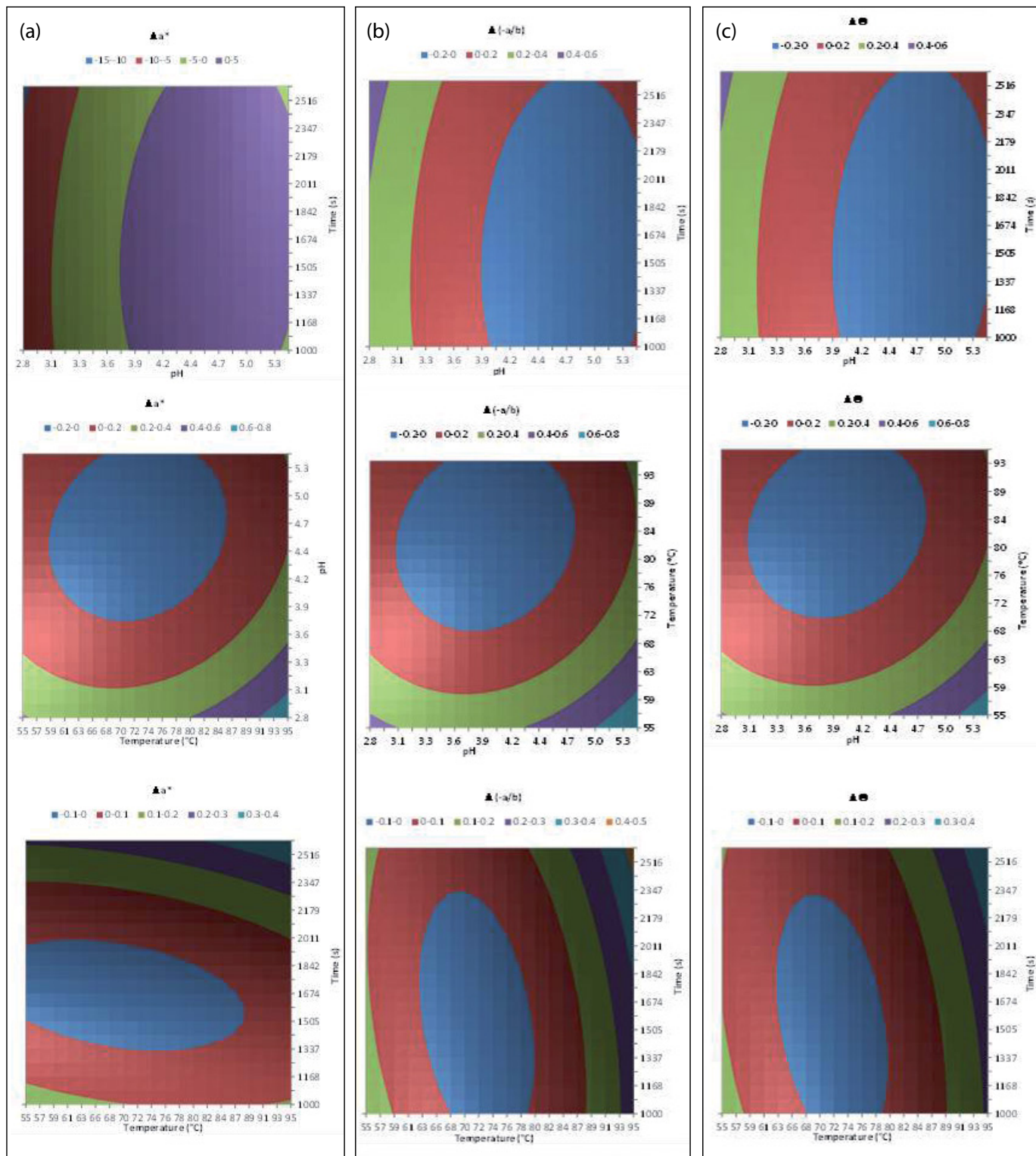


Fig. 1 - Contour plot relativo agli effetti del pH, del tempo di trattamento (s) e della temperatura ($^{\circ}\text{C}$) su Δa^* (D65) (Fig. 1a), $\Delta(-\frac{a}{b})$ (Fig. 1b) e $\Delta\theta$ (Fig. 1c).



sono stati calcolati mediante Matlab. Per quanto concerne il Δa^* (D65), il valore ottimale (7.064) è stato ottenuto con $T=73,4^\circ\text{C}$, $\text{pH}=4,63$ e $t=1.690$ s. Il $\Delta\left(-\frac{a}{b}\right)$ appare più sensibile al trattamento termico ed il valore ottimale (-0,1417) è stato ottenuto a $T=72^\circ\text{C}$, $\text{pH}=4,66$ e $t=1.642$ s. Infine il valore ottimale per $\Delta\theta$ (-0,1322) è stato ottenuto con $T=72,1^\circ\text{C}$, $\text{pH}=4,65$ e $t=1.655$ s.

CONCLUSIONI

In questo studio sono stati definiti per la prima volta gli effetti di pH, temperatura di pastorizzazione e tempo di pastorizzazione sul colore del Pesto. In particolare è stata confermata la relazione fra la degradazione della clorofilla e la riduzione del pH e quindi l'aggiunta di acido ascorbico e/o acido citrico al Pesto può determinare una significativa riduzione del colore verde. Sono state inoltre calcolate le condizioni di processo che consentono la minore riduzione di a^* ($T=73,4^\circ\text{C}$, $\text{pH}=4,63$ e tempo=1.690 s) e che potranno essere utilizzate industrialmente per la produzione di Pesto trattato termicamente. Saranno necessarie ulteriori ricerche per valutare la stabilità microbiologica del prodotto ottenuto con questi parametri e valutare la composizione delle clorofille del basilico al fine di individuare *cultivar* con un elevato contenuto in clorofilla *b* che risulta più resistente alla degradazione termica. Poiché il parametro a^* (D65) rappresenta la tonalità verde del Pesto ed il colore verde è una delle principali caratteristiche utilizzate nel determinare la qualità finale di un vegetale trattato termicamente è possibile utilizzare questo semplice parame-

tro per valutare la qualità del Pesto anziché la misura della clorofilla mediante HPLC che risulta più precisa, ma altresì più complessa.

BIBLIOGRAFIA

- Brainard D.H. (2003). Color appearance and color difference specification. In "The science of color. Second Edition" S.K. Shevell (Ed.), p. 340-345. The Boulevard, Oxford, GB.
- Buckle K.A., Edwards R.A. (1970). Chlorophyll colour and pH changes in HTST processed green pea puree. *J. Food Technol.* 5(3): 173-178.
- Chen B.H., Chen Y.Y. (1993). Stability of chlorophylls and carotenoids in sweet potato leaves during microwave cooking. *J. Agric. Food Chem.* 41(8): 1315-1320.
- Cochran W.G., Cox G.M. (1992). *Experimental Designs*. 2nd Edition. New York: John Wiley and Sons Inc.
- FAO. (1995). Food and Agriculture Organization. Rome, Italy: FAO Fruit and vegetable processing. FAO Agricultural Services Bulletin N. 119.
- Gold H.J., Weckel K.G. (1959). Degradation of chlorophyll to pheophytin during sterilization of canned green peas by heat. *Food Technol.* 13(2): 281-286.
- Gunawan M.I., Barringer S.A. (2000). Green colour degradation of blanched broccoli (*Brassica oleracea*) due to acid and microbial growth. *J. Food Process. Pres.* 24(3): 253-263.
- Heaton J.W., Marangoni A.G. (1996). Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. *Trends Food Sci. Tech.* 7(1): 8-15.
- Koca N., Karadeniz F., Burdurlu H.S. (2007). Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas. *Food Chem.* 100(2): 609-615.
- Lau M.H., Tang J., Swanson B.G. (2000). Kinetics of textural and color changes in green asparagus during thermal treatments. *J. Food Eng.* 45(4): 231-236.
- Luo M.R., Cui G., Rigg B. (2001). The development of the CIE 2000 color-difference formula: CIEDE2000. *Color Res. Applic.* 26(5): 340-350.
- Mangos T.J., Berger R.G. (1997). Determination of major chlorophyll degradation products. *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung A* 204(5): 345-350.
- Martinez J.A., Melgosa M., Pérez M.M., Hita E., Negueruela A.I. (2001). Visual and instrumental colour evaluation in red wines. *Food Sci. Technol. Int.* 7(5): 439-444.
- Martínez S., Pérez N., Carballo J., Franco I. (2013). Effect of blanching methods and frozen storage in some quality parameters of turnip greens ("grelós"). *LWT-Food Sci. Technol.* 51(1): 383-392.
- Masino F., Ulrici A., Antonelli A. (2008). Extraction and quantification of main pigments in pesto sauce. *Eur. Food Res. Technol.* 226(3): 569-575.
- Mason R.L., Gunst R.F., Hess J.J. (2003). *Statistical Design and Analysis of Experiments with Applications to Engineering and Science*. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Minguez-Mosquera M.I., Garrido-Fernandez J., Gandul-Rojas B. (1989). Pigment changes in olives during fermentation and brine storage. *J. Agric. Food Chem.* 37(1): 8-11.
- Montgomery D.C., Runger G.C., Hubele N.F. (2001). *Engineering Statistics*. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Ryan-Stoneham T., Tong C.H. (2000). Degradation kinetics of chlorophyll in peas as a function of pH. *J. Food Sci.* 65(8): 1296-1302.
- Schwartz S.J., von Elbe J.H. (1983). Kinetics of chlorophyll degradation to pyropheophytin in vegetables. *J. Food Sci.* 48(4): 1303-1306.
- Shin S., Bhowmik S.R. (1995). Thermal kinetics of color changes in pea puree. *J. Food Eng.* 24(1): 77-86.
- Steet J.A., Tong C.H. (1996). Degradation kinetics of green color and chlorophylls in peas by colorimetry and HPLC. *J. Food Sci.* 61(5): 924-928.
- Thai C.N., Shewfelt R.L., Garner J.C. (1990). Tomato colour changes under constant and variable storage temperature. *Empirical models. Transactions American Soc. Agric. Eng.* 33(3): 607-614.
- Tijskens L.M.M., Barringer S.A., Biekman E.S.A. (2001). Modelling the effect of pH on the color degradation of blanched broccoli. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2(4): 315-322.
- Tijskens L.M.M., Schijvens E.P.H.M., Biekman E.S.A. (2001). Modelling the change in colour of broccoli and green beans during blanching. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2(4): 303-313.
- van Boekel M.A.J.S. (1999). Testing the kinetic models: usefulness of the multiresponse approach as applied to chlorophyll degradation in foods. *Food Res. Int.* 32(4): 261-269.
- Vining G.G. (2003). *Statistical Methods for Engineers*. London: Duxburg Press.
- Wanasundara P.K.P.D., Shahidi F. (2005). Antioxidants: science, technology and applications. In Shahidi F. (ed.) *Bailey's industrial oil and fat products: chemistry, properties and health effects*. New Jersey: John Wiley & Sons. Inc. pp. 431-489.
- Weemaes C.A., Ooms V., Van Loey A.M., Hendrickx M.E. (1999). Kinetics of chlorophyll degradation and color loss in heated broccoli juice. *J. Agric. Food Chem.* 47(6): 2404-2409.
- Woolfe M.L. (1979). Pigments. In Priestley R.J. (ed.) *Effects of heating on foodstuffs*. London: Applied Science Publishers pp. 77-119.