

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili
Tesi di Laurea Magistrale

Sicurezza alimentare. Analisi dei rischi nella supply chain delle nocciole



Relatori

Prof.ssa Micaela Demichela

Prof.ssa Bosco Francesca

Dott.ssa Chiara Mollea

Candidato

Valeria Bruno

Ottobre 2023

Indice

1. Introduzione	1
1.1 Condizione fitosanitaria delle nocciole	4
1.1.1 Malattie fungine	6
1.2 Scopo della tesi.....	7
1.3 Struttura della tesi.....	8
2. Micotossine	10
2.1 Metodi analitici per la valutazione delle micotossine	15
3. Materiali e metodi	18
3.1 Caratterizzazione morfologica	18
3.2 Allestimento microcosmi	20
3.3 Analisi Respirometrica	22
3.4 Analisi Aflatossine	23
4. Analisi dei risultati	26
4.1 Analisi morfologica, di pH e di umidità%	26
4.2 Risultati Analisi Respirometrica	34
4.3 Risultati delle analisi delle Aflatossine	47
5. Valutazione dei Rischi.....	50
5.1 Descrizione della metodologia	50
5.2 Risultati valutazione dei rischi	54
1. Conclusioni	56
Bibliografia.....	59

1. Introduzione

La coltivazione del nocciolo è un settore agricolo in forte crescita ed i Paesi maggiormente coinvolti sono: Turchia, Italia, Spagna e Stati Uniti [1]

La Turchia è tra i maggior Paesi esportatori di nocciole; infatti, circa il 12% della produzione di nocciole è destinata al consumo della popolazione turca, mentre il resto della produzione è esportata verso i paesi dell'UE (Germania 34% e Italia 13% del totale) [1].

Nell'Unione Europea i paesi maggiormente coinvolti nella produzione di nocciole sono quelli mediterranei: Spagna, Italia, Grecia, Portogallo e Francia e l'Italia è il produttore europeo di maggior rilievo, sia per quanto riguarda le nocciole (primo produttore U.E.), sia per quanto riguarda mandorle (al secondo posto dopo la Spagna) [1]. La seguente tabella 1.1 evidenzia la produzione di frutta a guscio in Unione Europea.

Tabella 1.1 Produzione percentuale % su totale di frutta a guscio in UE

Paese	Mandorle	Nocciole	Noci	Pistacchio	Carrube
Italia	23,3	78,5	19,5	22,3	20,8
Spagna	61,1	14,5	12,3		60,1
Francia		4,1	33,9		
Grecia	12,0	2,7	28,5	77,7	10,1
Portogallo	6,7		5,8		9,0

Nel nostro Paese, secondo dati ISTAT, vi sono 73.701 aziende che coltivano nocciole con una produzione media di 110.000 tonnellate ragion per cui l'Italia si attesta come secondo produttore di nocciole nel mondo, dopo la Turchia.

Nel progetto di tesi sono state analizzate le nocciole piemontesi fornite da un'azienda corilicola. In Piemonte i corolireti si concentrano soprattutto nelle province di Cuneo (74%) ed Asti (23%) e la cultivar principale, Tonda Gentile Trilobata (nel 1993 è stata riconosciuta l'IGP "Nocciola Piemonte") è molto utilizzata nell'industria dolciaria per le sue caratteristiche tecnologiche e organolettiche [1]. Secondo l'Articolo 7 del *Reg. CE n. 1107/96* La "Nocciola del Piemonte" o "Nocciola Piemonte" deve rispondere alle seguenti caratteristiche:

- Forma del frutto: trilobata;
- dimensioni non omogenei, con calibri tra 17mm e 21 mm;
- guscio di medio spessore, di color nocciola mediamente intenso;
- seme di varia forma (sub-sferoidale, tetraedrica e, talvolta, ovoidale);
- perisperma di medio spessore, ma di eccellente distaccabilità alla tostatura;
- resa alla sgusciatura comunque compresa tra il 40% ed il 50%.

La Nocciola Piemonte è considerata tra le migliori varietà per le sue caratteristiche carpologiche, tecnologiche, compositive e di resa, qualità indispensabili per ottenere prodotti trasformati di prestigio; in tabella 1.2 sono riportati i valori nutrizionali delle nocciole.

Tabella 1.2 Valori nutrizionali nocciole per 100 g di parte edibile. Fonte: INRAN Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione

Componente	Quantità
Acqua	4,5g
Proteine	13,8g
Lipidi	64,1g
Carboidrati	6,1g
Amido	1,8g
Zuccheri solubili	4,1g
Fibra totale	8,1
Energia	655 Kcal
Sodio	11mg
Potassio	466mg
Ferro	3,3mg
Calcio	150g
Fosforo	322mg
Tiamina	0,51mg
Riboflavina	0,1mg
Niacina	2,8mg
Vitamina A	30mcg
Vitamina C	4mg
Vitamina E	15mg

Tuttavia, negli ultimi anni il verificarsi di nuove avversità, come la cimice asiatica *Halymorpha Halys* [2], hanno determinato danni sui frutti e un abbassamento della qualità. Per tale motivo dal 2016 ad oggi il CREA DC insieme a SAGEA_Centro di Saggio ha organizzato una campagna di monitoraggio per problema della “nociola avariata”[3]. Questo progetto, condiviso anche dalla divisione Hazelnut Company del gruppo Ferrero, ha eseguito delle analisi sulle nocciole in tutte le fasi dalla raccolta al post-raccolta in aziende corilicole campione sia campane che piemontesi. In particolare, nel corso della stagione 2020, dalle analisi fatte sulle nocciole piemontesi sgusciate, sono state rilevate specie fungine; nello specifico in laboratorio sono stati isolati funghi appartenenti al genere *Penicillium*, *Aspergillus* e la specie *Trichothecium roseum* [3].

Queste tipologie di funghi, in condizioni ambientali caldo-umide, possono produrre micotossine, in particolare aflatossine, che di fatto sono valutate come sostanze altamente dannose per uomo e animali [4]; infatti sono molecole con attività mutagena, teratogena e immunosoppressiva, classificate dall’Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) come metaboliti cancerogeni per l’uomo. Nella tabella 1.2 sono evidenziati gli effetti tossici per le principali micotossine.

Tabella 1.3 Effetti tossicologici per le micotossine

Micotossina	Effetti tossici
Aflatossine	Epatiti, nefriti, carcinogenesi
Ocratossina A	nefriti
Patulina	Epatiti, carcinogenesi

Zearalenone	ipofertilità
Deossinivalenolo	vomito
Fumonisine	epatiti

I gravi effetti tossicologici delle aflatossine per la salute impongono azioni di controllo e monitoraggio sugli alimenti. In particolare, la Regione Piemonte, attraverso le Aziende Sanitarie Locali, ha realizzato nel 2013 un programma di controllo degli alimenti a rischio destinati al consumo; i test di controllo analitici sono stati eseguiti dal Polo Alimenti dell'Arpa Piemonte. Le matrici alimentari esaminate nei Controlli Ufficiali del 2013 sono quelle presenti nel *Regolamento della Commissione Europea No 165/2010* e i risultati riguardanti la percentuale di alimenti contaminati sono riportati in tabella 1.4 [4].

Tabella 1.4 Campioni positivi alle aflatossine nei Controlli Ufficiali 2013

Alimento	Numero campioni	Numero Campioni positivi	% positivi alle aflatossine	Numero di campioni con livelli di aflatossine non legali
Arachidi	9	1	11%	0
Castagne	9	8	89%	1
Nocciole	48	39	81%	0
Fichi	4	2	50%	0
Integratori	11	5	50%	0
Mandorle	6	1	17%	0
Peperoncino	3	3	100%	0
Paprica	2	2	100%	0
Curry	1	1	100%	0
Zenzero	2	1	50%	0
Piselli	1	1	100%	1
Curcuma	2	1	50%	0
Fagioli	6	1	17%	0

Totale	104	67	64%	2
---------------	------------	-----------	------------	----------

Dalla tabella si evince che le nocciole, pur non avendo livelli di aflatossine superiori ai limiti legali, sono molto sensibili alla contaminazione.

La contaminazione da aflatossine potenzialmente può accadere in ogni fase del processo corilicolo dalla coltivazione al consumo, tuttavia, un lavoro di ricerca realizzato su nocciole turche ha dimostrato che raccolta e post-raccolta, compresa la conservazione, sono gli stadi più delicati su cui è necessario attuare azioni di controllo [5].

Il rischio di contaminazione da aflatossine è un problema di *food-safety* e pertanto sono stati stabiliti nei vari Paesi del mondo i limiti di aflatossine nelle nocciole destinate al consumo. Negli Stati Uniti l'FDA (Food and Drug Administration) ha fissato i livelli massimi di aflatossine totali a 20 ng/g nelle nocciole destinate al consumo [6], mentre i limiti stabiliti dalla Commissione Europea per le nocciole sono 10 ng/g per le aflatossine totali e 5 ng/g per l'aflatoxina B1 [7].

Ad oggi si hanno poche informazioni in termini quantitativi sulla diffusione globale delle micotossine e sulla relazione dose-risposta nell'uomo e negli animali. Quindi risulta fondamentale l'azione preventiva sulla crescita dei funghi aflatossigeni sia per ragioni economiche che di salute.

1.1 Condizione fitosanitaria delle nocciole

Il nocciolo, *Corylus avellana L.*, ha origini in Europa e nell'Asia minore e la sua corilicoltura professionale si sviluppa solo alla fine dell'800; come indicato nel paragrafo precedente la produzione si concentra nei Paesi del Mediterraneo e tra questi la Turchia è il primo produttore mondiale con 700 mila tonnellate e l'Italia il secondo produttore con 100-125 mila tonnellate. In Italia la superficie corilicola è di 68 mila ettari e le principali varietà si coltivano in Campania, Lazio, Piemonte e Sicilia; nella tabella 1.2 è evidenziata la produzione percentuale di nocciole in base alle zone di produzione e alle varietà di coltivazione.

Tabella 1.2 Regioni corilicole e cultivar principali in Italia

Regione	Cultivar
Campania 40%	Tonda di Giffoni, Tonda Bianca, Tonda rossa
Lazio 33%	Tonda Gentile Romana, Nocchione
Piemonte 13%	Tonda Gentile Trilobata
Sicilia 14%	Ghirara, Iannusa Racinante

Tipicamente la coltivazione del nocciolo predilige l'ambiente collinare e soffre sia le temperature inferiori a -12°C sia le temperature superiori ai 30° C; il terreno più idoneo è quello con pH neutro, in un range di 6.8-7.2, e privo di ristagni idrici. Pertanto, prima dell'installazione di un impianto corilicolo, è opportuno tener conto di accorgimenti idraulici,

del calcare attivo e del pH; l'abbondanza di calcare attivo limita l'assimilazione dei microelementi, in particolare il ferro, provocando l'ingiallimento delle foglie (clorosi ferrica) [8].

Negli ultimi anni, a livello nazionale, è cresciuto l'interesse del consumatore verso le nocciole tanto che dal 2018 al 2021 sono stati investiti 5 mila ettari in coltivazioni corilicole [8]; considerando tale exploit della coltura del nocciolo, ERSAs Servizio fitosanitario, chimico, ricerca e assistenza tecnica ha avviato nel 2021 un servizio di monitoraggio dei principali parassiti e malattie delle principali cultivar del nocciolo quali: Tonda Gentile delle Langhe, Tonda Gentile Romana, Tonda di Giffoni e Nocchione [9].

Un fenomeno diffuso è la Cascola delle nocciole che si manifesta nel periodo della fecondazione tra la fine di maggio e i primi giorni di giugno; questo genera un vuoto in quanto il guscio si sviluppa completamente mentre il seme risulta dimensionalmente poco sviluppato [9].

L'anomalia è frequente per la Tonda Gentile delle Langhe a causa di diversi fattori:

- assenza di fecondazione dei fiori femminili durante il periodo di fioritura (gennaio-marzo);
- fattori genetici dovuti alla tipologia di coltivazione
- mancanza di sostanze nutritive tra cui boro e zinco;
- fattori climatici (gelate invernali o primaverili);
- punture di insetti o contaminazione fungina;

La cascola 2021 è stata causata ad esempio da fattori ambientali; infatti, dall'analisi meteo si sono registrati abbassamenti notevoli di temperatura in primavera ($-4^{\circ}\text{C}/-5^{\circ}\text{C}$) [9].

Per quanto riguarda le malattie batteriche, due sono le batteriosi più preoccupanti [9]:

- Cancro batterico-Moria del nocciolo causata dal batterio *Pseudomonas syringae*; i fattori predisponenti al cancro batterico sono le frequenti piogge e le gelate primaverili
- Necrosi batterica causata dal batterio *Xanthomonas arboricola*; i fattori predisponenti alla necrosi sono stagioni umide e piovose con temperature comprese tra i 18°C e i 22°C e cattive tecniche di coltivazione (irrigazione nello specifico). La malattia si manifesta su germogli e frutti; sui germogli e sulle foglie sono presenti disseccamenti nella parte apicale con macchie bruno rossastre ellittiche lunghe 2mm-3 mm; sulle foglie compaiono macchie bruno rossastre; sui frutti compaiono maculature irregolari.

Un'altra avversità è quella virale, in particolare, l'unica virosi che può suscitare una qualche preoccupazione per la corilicoltura piemontese è il virus del mosaico del melo (ApMV), perché la normativa fitosanitaria lo identifica tra i patogeni che, compromettendo la qualità della produzione vivaistica, devono essere tenuti sotto osservazione all'interno dei vivai. Questo virus, che causa sulle piante varie macchie gialle, è presente occasionalmente. [10].

Il monitoraggio dei fitofagi avviene con il metodo del *frappage*; esso consiste in una serie di scuotimenti della chioma del nocciolo per poter rinvenire insetti, tra cui quelli più preoccupanti sono: Balanino e Cimici [9].

Il Balanino, *Curculio nucum*, rappresenta una delle specie più temibili per la coricoltura in Campania e in Lazio, mentre risulta dannoso solo occasionalmente in Sicilia e Piemonte; tipicamente in tarda primavera o inizio estate le femmine depositano un uovo per frutto, successivamente dall'uovo fuoriesce la larva che penetra e si nutra del seme causando una prematura caduta al suolo del frutto [9].

Le cimici nocciolaie (*Gonocerus acuteangulatus*, *Palomena prasina*, *Rhaphigaster nebulosa*, *Piezodorus lituratus*, *Nezara viridula* e *Halyomorpha halys*) sia nella forma adulta che giovanile pungono le nocciole in fase di crescita attraverso gli stiletto dell'apparato boccale raggiungendo il seme in crescita e causando l'aborto.

Le cimici sono in grado di pungere il frutto della nocciola anche quando il guscio è già formato, causando il cosiddetto "cimiciato"; tipicamente i *frappage* per il monitoraggio sono eseguiti nel periodo tra inizio maggio e la fine di luglio e i danni causati dalle cimici possono essere di due tipi [9]:

- con punture fatte nelle prime fase di sviluppo del seme: in questo caso il frutto non si forma più, il guscio della nocciola diventa vuoto e cade a terra (cascola della nocciola accentuata);
- con punture fatte sul guscio con all'interno il seme già sviluppato: in tal caso la nocciola cresce in modo disomogeneo dal punto di vista delle dimensioni, muta di colore e acquisisce un sapore amarognolo (danno da cimiciato).

I coreoidi *Gonocerus acuteangulatus* e *Palomena prasina* sono le specie più abbondanti in Piemonte e l'attività trofica delle due specie concorre a due fenomeni: della cascola e del "brownstain disorder"; le nocciole con quest'ultima fitopatia presentano semi con macchie disomogenee, di colore tra il biancastro e il bruno [10].

1.1.1 Malattie fungine

Le malattie fungine che colpiscono la cultivar delle nocciole sono causate da diverse specie [10]:

- *Cytospora corilicola* che causa il Mal dello stacco e tipicamente colpisce impianti corilicoli obsoleti o che presentano lesioni dovute alle macchine agricole; inizialmente compaiono macchie bruno-rossastre sul fusto e i tessuti legnosi sono necrotizzati fino a provocare il disseccamento del ramo; in genere in estate è possibile osservare delle spore fungine di colore rosso che infettano il legno, pertanto è necessario bruciare la parte colpita per evitare la diffusione di altri inoculi infettivi;
- *Piggotia corili* che causa la Gleosporiosi, particolarmente presente in Piemonte; tipicamente si presenta in due fasi: una prima fase in primavera quando il fungo contamina le gemme che imbruniscono e disseccano, la seconda in tarda estate quando il fungo colpisce le foglie sulle quali si sviluppano macchie cancrenose;
- *Armillaria mellea* che causa il Marciume radicale; il fungo colpisce le colture soggette a ristagni idrici e nelle sue prime fasi di crescita si osservano, sotto la corteccia, le formazioni di micelio bianco e solo con l'avanzamento della malattia si potranno osservare le fruttificazioni esterne; le piante infestate presentano disseccamento;

- *Phyllactinia guttata* che causa l'Oidio; la malattia si presenta sottoforma di efflorescenza biancastra nella pagina inferiore delle foglie e maculature gialle sulla pagina superiore; l'infezione non desta preoccupazione perché si palesa in tarda estate o in autunno con l'unica conseguenza di una caduta prematura delle foglie malate.

Nel 2000, in alcune coltivazioni corilicole della provincia di Viterbo (dove prevale la varietà corilicola della Tonda Gentile Romana), è comparsa una malattia fungina di rilevante interesse "la necrosi grigia della nocciola NGN". Questa malattia si palesa fin dalla crescita del frutto con la comparsa di macchie grigio-brunastre, che si estendono dalla base del frutto fino alla posizione apicale. Ricerche preliminari sull'eziologia della NGN hanno attribuito le cause di questa malattia a diversi generi fungini, tra i quali *Fusarium lateritium* e *Alternaria alternata* [11].

Nel corso del 2006 e del 2007 sono stati eseguiti numerosi sopralluoghi in corileti del Lazio, del Piemonte e della Campania. In particolare, sono state svolte indagini nel corso del 2006, in 187 diversi impianti del Piemonte, nella zona del Monferrato in provincia di Alessandria (Gabiano-Cantavenna) e delle Langhe in provincia di Cuneo (Cravanzana e Moglie). I sopralluoghi eseguiti nei corileti del viterbese hanno consentito di rilevare una diffusa presenza di NGN associata a intensi fenomeni di cascola. In particolare, nel corso del 2006 è stata rilevata una comparsa piuttosto tardiva della malattia (seconda decade di luglio) in coincidenza con fasi fenologiche di "completo sviluppo del frutto". I dati ottenuti evidenziano un'incidenza di *F. lateritium* pari al 100% in tutti i campioni analizzati, costantemente associata alla presenza di *Alternaria alternata*., sebbene con valori di incidenza decisamente più contenuti varianti dal 14 al 20% [11]. Le indagini hanno, inoltre, evidenziato la suscettibilità della Tonda Gentile delle Langhe nei confronti di NGN al pari delle altre cultivar già oggetto di indagine. I campionamenti eseguiti in Piemonte, nelle zone delle Langhe e del Monferrato, hanno evidenziato la presenza di sintomatologia riconducibile alla necrosi. Prove di accrescimento miceliare e di germinazione conidica confermano l'attività biologica di questo fungo a partire da temperature appena superiori a 0°C [11].

1.2 Scopo della tesi

L'obiettivo della tesi è correlare la formazione di micotossine, attraverso test sperimentali su scala da laboratorio, alla CO₂ prodotta da specie fungine cresciute sulle nocciole. Per tale scopo sono state analizzate nocciole piemontesi (sia avariate che sane) fornite da un'azienda corilicola. Le seguenti Figure 1.1 e 1.2 descrivono il tipo di avaria delle nocciole



Figura 1.1 Nocciole avariate chiare, avariate scure, cimiciate



Figura 1.2 Nocciole tostate avariate, nocciole tostate scarto manuale

Il lavoro preliminare svolto in laboratorio permette di capire se la formazione di CO₂ può essere considerata un *early warning* durante la conservazione delle nocciole e quindi se è necessario un monitoraggio di essa con sensori su scala industriale.

1.3 Struttura della tesi

La tesi è organizzata in 6 capitoli. Nel capitolo 1, Introduzione, è descritto l'obiettivo del lavoro di tesi.

Nel capitolo 2 Micotossine vengono descritte le principali micotossine che si trovano nella filiera alimentare e in particolare sono illustrate le aflatossine prodotte dai funghi aflatossigeni che crescono sul substrato delle nocciole. Si definiscono i metodi di analisi più utilizzati per la rilevazione delle aflatossine (2.1 Metodi di analisi).

Nel capitolo 3 Materiali e Metodi sono evidenziate le misure di calibrazione per una caratterizzazione morfologica delle varie nocciole (avariate scure, avariate chiare, cimiciate, tostate scarto manuale, tostate scarto avariato, nocciole sane sgusciate e nocciole sane con guscio), i test di pH e le prove di essiccazione per ricavare l'umidità dei vari campioni di nocciole. Si descrive poi l'allestimento dei Microcosmi (3.2): 4 Microcosmi con 35 gr di nocciole cimiciate, in particolare due sistemi con 35gr di cimiciate intere e rotte nebulizzate con acqua e due sistemi con 35 gr di cimiciate intere e rotte saturati al 40 % di umidità; due

Microcosmi con 35 gr di nocciole sane senza guscio e 35 gr di nocciole sane con guscio; sei Microcosmi di cui tre hanno un bilayer di strati di nocciole sane sgusciate e altri tre sono costituiti da un multilayer di nocciole sane sgusciate. Per ogni sistema si esegue l'analisi respirometrica, mediante titolazione, per ottenere il quantitativo di CO₂ prodotta dalla biomassa cresciuta sulle nocciole (3.3). Analisi ELISA (3.4) per rilevare le micotossine prodotte dai funghi cresciuti nei vari Microcosmi. Nel capitolo 4 si descrivono e confrontano i risultati ottenuti in ogni prova.

Nel capitolo 5 è descritta la tecnica di analisi per la sicurezza nella filiera alimentare, in particolare è adoperata l'analisi con l'albero degli eventi.

Nel capitolo 6 Conclusioni si evincono le considerazioni sulle analisi e sui risultati ottenuti.

2. MICOTOSSINE

Le micotossine sono metaboliti secondari di diverse specie fungine, esse possono avere effetti acuti tossici, cancerogeni, mutageni, teratogeni, immunotossici ed estrogenici sia nell'uomo che negli animali; ad oggi sono note oltre 100.000 specie di funghi, quelle responsabili della produzione di micotossine nella supply chain alimentare appartengono ai generi: *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Rhizopus* [12].

La prima forma di micotossicosi, ossia delle sindromi tossiche derivanti dall'esposizione alle micotossine, risale al 1800 e fu riconosciuta come ergotismo [13]; essa è una malattia che si manifesta con la necrosi degli arti ed è dall'assunzione di grano infettato dal *Claviceps purpurea*. Solo nel 1960 l'emergenza delle micotossine è stata riconosciuta ufficialmente a seguito di una crisi veterinaria a Londra; durante quel periodo 100.000 polli morirono a causa di una malattia misteriosa che venne successivamente attribuita al consumo di farina di arachidi contaminata da metaboliti secondari, le aflatossine [12].

Attualmente sono presenti più di 300 micotossine con strutture molecolari differenti, quelle maggiormente riscontrate nella filiera alimentare agricola sono [12]:

- Aflatossine sviluppate maggiormente dal genere *Aspergillus*
- Fumonisine, zearalenone e tricoteni sviluppate dal genere *Fusarium*
- Ocratossina e patulina sviluppate dal genere *Penicillium*

Lo sviluppo di funghi e la contaminazione da micotossine può verificarsi in diverse fasi della filiera alimentare, poiché si tratta di un processo cumulativo che ha inizio sul campo e può aumentare negli step successivi tra cui raccolta, essiccazione e stoccaggio [12]; I funghi micotossigeni possono crescere su vari tipi di substrati, soprattutto su quelli ricchi di carboidrati dove sono largamente presenti gli elementi fondamentali per la loro crescita, ovvero carbonio e azoto. Infatti, gli zuccheri sono composti da molecole di carbonio e i funghi filamentosi sono in grado di idrolizzare le fonti di carbonio per produrre energia necessari alla crescita. In tabella 2.1 sono evidenziati le micotossine, i funghi che le producono e i diversi substrati alimentari suscettibili alla contaminazione [12].

Tabella 2.1 alimenti contaminati da micotossine e relativi funghi

Micotossine	funghi	alimenti
Aflatossina B1, B2 G1, G2	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Grano,mais, nocciole, spezie, semi oleosi e di cotone
Aflatossina M1	<i>Aspergillus carbonarius</i> ,	Latte e latticini

	<i>Aspergillus niger</i> ,	
Ocratossina A	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>Penicillium nordicum</i> , <i>Penicillium cyclopium</i>	Grano,orzo, avena, fave di cacao, chicchi di caffè, frutta e succhi di frutta, frutta secca e vino
Patulina	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Byssochlamys nivea</i> , <i>Aspergillus clavatus</i>	Frutta e succhi di frutta, formaggio e grano
Tricoteceni	<i>Fusarium sporotrichiodes</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium cerealis</i>	Mais, frumento, orzo, avena, cereali e mangimi per animali
Zearaleone	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium cerealis</i> <i>Fusarium equiseti</i> <i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium incarnatum</i>	Mais, frumento, orzo, segale e mangimi per animali
Fumonisina	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Mais, riso, frumento, sorgo, orzo e avena

I fattori climatici come temperatura, attività dell'acqua a_w e umidità relativa condizionano fortemente lo sviluppo, la sopravvivenza, la distribuzione dei funghi micotossigeni e il loro conseguente accumulo di micotossine; in tabella 2.2 sono riportati i valori di temperatura T, attività dell'acqua a_w minima e ottimale per la crescita delle specie fungine maggiormente presenti nella filiera alimentare [14].

Tabella 2.2 valori di temperatura [°C], attività dell'acqua a_w (minima e ottimale) e crescita ottimale μ_{opt} (mm/giorno) [14]

Funghi	T_{opt} [°C]	a_{wopt}	T_{min} [°C]	a_{wmin}	μ_{opt} (mm/giorno)
<i>Alt.alternaria</i>	25	0,985	-5/6,5	0,85	4,8

<i>A.flavus</i>	31	0,970	8/12	0,83	5,7
<i>C. cladosporioides</i>	25	0,985	-5	0,86	3
<i>M. racemosus</i>	25	0,985	-4	0,92	11,2
<i>P. chrysogenum</i>	25	0,985	-4	0,81	3,1
<i>R. oryzae</i>	35	0,985	7	0,88	56,7
<i>T.harzianum</i>	25	0,990	5	0,91	19,6

Quando le condizioni climatiche sono favorevoli la colonizzazione fungina può verificarsi in punti diversi della supply chain, sia in campo che successivamente alla raccolta durante l'essiccazione e lo stoccaggio. In molti casi non si può evidenziare una netta definizione dello stadio in cui è iniziata la crescita fungina; sul campo, durante la pre-raccolta prevalgono funghi del genere *Fusarium*, in quanto sono specie igrofile che vivono con un'umidità relativa pari o superiore al 90%; mentre dopo la raccolta i funghi igrofilo scompaiono e prevalgono specie mesofile e xerofile come *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.* che germinano, crescono e producono micotossine a un'umidità relativa rispettivamente dall' 80% al 90% e minore dell'80%.

Uno studio condotto su campioni di frutta a guscio, nello specifico arachidi, ha isolato i funghi che maggiormente compaiono da inizio stoccaggio (subito dopo la raccolta) a fine stoccaggio per un periodo di 8 mesi tra maggio 2008 e gennaio 2009; dall'analisi emerge che all'aumentare dell'umidità relativa RU è preponderante la presenza del *Fusarium*, mentre al diminuire dell'umidità è più presente il genere *Aspergillus*; in tabella 2.3 sono riassunti i risultati dello studio evidenziando anche la temperatura[°C], l'attività dell'acqua a_w tra inizio e fine stoccaggio e umidità relativa RU [%] [15].

Tabella 2.3 frequenza% di specie fungine isolate in campioni di arachidi per un periodo di 8 mesi [15]

Funghi	Inizio stoccaggio (05/10/2008) T= 24,2 °C RU=73% a_w =0,989	II periodo 05/13/08-07/14/08 T= 21°C RU=66% a_w =0,485	III periodo 07/14/08-09/12/08 T= 22,5°C RU=58% a_w =0,430	IV periodo 09/12/08-11/11/08 T= 27,5°C RU=66% a_w =0,611	V periodo 11/11/08-01/12/09 T= 30°C RU=61% a_w =0,504
<i>Aspergillus spp.</i>	-	-	-	16,05	50
<i>Cladosporium spp.</i>	-	-	15,4	-	-
<i>Fusarium spp.</i>	70	54	48	55,4	18

<i>Macrophomina spp.</i>	33,4	16	26,1	71,4	45,3
<i>Trichoderma spp.</i>	11	35,53	31,4	20	8,3

Un altro fattore chimico importante per lo sviluppo di funghi e per la produzione micotossine è il pH; i funghi sono in grado di regolare il pH dell'ambiente circostante attraverso la produzione di acidi o alcali, ad esempio il *Penicillium spp* e *Aspergillus* possono produrre acidi gluconico e citrico [12]. Tipicamente le condizioni acide favoriscono la produzione di micotossine; valori di pH<6 favoriscono le aflatoxine B1 e B2, valori di pH >6 favoriscono le aflatoxine G1 e G2 [13]; l'ocratossina OTA è favorita da un range di pH compreso tra 4 e 5 [13].

Per quanto riguarda la microflora presente sulle nocciole, oggetto di studio del lavoro di tesi, è composta in prevalenza da funghi aflatoxigeni: (*A.flavus*, *A.parasiticus*, *A.niger*), *Penicillium spp.* nella fase post-raccolta e in fase raccolta *Fusarium spp* e *Alternaria Alternata* [16]; in tabella 2.4 sono presenti i valori di temperatura e attività dell'acqua minimi e ottimali per la crescita dei funghi e delle micotossine [17].

Tabella 2.4 Temperatura minima T_m e ottimale T_{opt} e attività dell'acqua minima a_{wmin} e ottimale a_{wopt} per la crescita di funghi e micotossine [17]

Funghi	T_m crescita Funghi/micotossine	T_{opt} crescita Funghi/micotossin e	a_{wmin} crescita funghi/aflatoxine	a_{wopt} crescita funghi/micotossine
<i>Alternaria alternata</i>	-5-6,5/-	21/25	0,88/0,88-0,89	0,982/>0,97
<i>Aspergillus niger</i>	12/-	35/-	0,85/-	0,99/-
<i>Aspergillus flavus</i>	-/8	35/28	0,78-0,84/0,84	0,95/0,99
<i>Aspergillus Parasiticus</i>	-	35/33	0,81-0,82/-	0,95/0,99
<i>Penicillium verrucosum</i>	0/-	-/25	0,80-0,81/0,83-0,85	0,95/0,90-0,95
<i>Fusarium spp.</i>	5-10/11	20-25/29-30	0,90-0,91/0,90	0,98-0,99/0,99

In tabella 2.5 sono riportati i valori di aflatoxine [$\mu\text{g}/\text{Kg}$] secondo Il *Regolamento Europeo No 165/2010* [7].

Tabella 2.5 Valori di aflatoxine [$\mu\text{g}/\text{Kg}$] nelle nocciole secondo il *Regolamento Europeo No 165/2010* [7].

Alimento	Aflatoxina B1 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Aflatoxine totali B1+B2+G1+G2 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
Nocciole destinate a cernita o trattamento chimico-fisico	8	15
Nocciole destinate al consumo umano	5	10

In tabella 2.6 sono invece evidenziati i valori di aflatoxine su nocciole crude e nocciole tostate ricavati da uno studio sulla microflora delle nocciole [16].

Tabella 2.6 Valori di aflatoxine $\mu\text{g}/\text{Kg}$ su nocciole crude e nocciole tostate

Campione	Numero di campioni	Aflatoxine $\mu\text{g}/\text{Kg}$	Campioni contaminati	Campioni eccedenti limite legale	% campioni contaminati
Nocciole crude	30	2,11-10,03	9	1	30
Nocciole tostate	50	0,1-4,04	7	-	14

Un altro studio di monitoraggio delle aflatoxine, condotto dall'Università di Torino, ha rilevato i valori medi di aflatoxine su nocciole di diversa provenienza (metodo di analisi cromatografia liquida a strato sottile TLC): Italia, Turchia, Stati Uniti e Cina [17]. In tabella 2.7 sono riportati i valori medi [$\mu\text{g}/\text{Kg}$] di aflatoxine.

Tabella 2.7 Livelli medi di aflatoxine [$\mu\text{g}/\text{Kg}$] in campioni di nocciole

Paese	N.campioni	N.campioni positivi	positivi %	aflatoxine $\mu\text{g}/\text{Kg}$
Italia	78	28	35,9	0,14
Turchia	9	6	66,7	0,33
Altri paesi (Stati Uniti e Cina)	6	1	16,7	0,19

Al fine di prevenire la crescita fungina e il possibile rischio di contaminazione da micotossine Il *Regolamento Europeo N.1284 del 2002*, stabilisce che il tenore di umidità delle nocciole non deve superare il 12% per il frutto intero e il 6% per il frutto sgusciato.

2.1 Metodi analitici per la valutazione delle micotossine

I limiti di legge sulle micotossine fissate dalla Comunità Europea impongono un monitoraggio lungo la filiera alimentare attraverso metodi analitici; i metodi di analisi devono essere veloci, economici, replicabili e affidabili.

I metodi di analisi maggiormente affidabili sono quelli approvati dall'AOAC International e dal CEN (Comitato Europeo Normativo); i metodi ufficiali per la determinazione delle micotossine sono basati principalmente su analisi cromatografiche, in particolare la cromatografia su strato sottile è ampiamente utilizzata nell'analisi normativa. Le tecniche analitiche impiegate con maggior frequenza sono:

- Cromatografia su strato sottile
- Cromatografia liquida
- Gas cromatografia
- ELISA
- Fluorometria.

Generalmente i metodi analitici sono costituiti da una fase preanalitica in cui le matrici dei campioni sono omogeneizzate e le micotossine sono solubilizzate; segue poi la fase di estrazione e rilevamento di singole micotossine o miscele di esse e quella di post-analisi dei dati.

L'associazione dei chimici analitici ufficiali (AOAC) nel 1990 ha ufficializzato l'uso della cromatografia su strato sottile TLC e ad oggi è una delle tecniche di separazione più impiegate nell'analisi delle aflatossine; il metodo di analisi prevede due fasi; fase stazionaria di silice, allumina o cellulosa immobilizzata su una matrice inerte come vetro o plastica; fase mobile costituita da una miscela di metanolo, acetonitrile e acqua. Il principio chimico-fisico si basa sulla differenza di solubilità degli analiti nelle due fasi; gli analiti contenenti aflatossine hanno struttura molecolare diversa e ciò determina l'interazione maggiore con la fase stazionaria piuttosto che con quella mobile [18]. Questo metodo è in grado di rilevare valori di aflatossine in un range compreso tra 1ppb e 20 ppb e di rilevare diversi tipi di aflatossine in un singolo prodotto alimentare. Tuttavia, pur avendo una buona sensibilità gli svantaggi principali sono dovuti al costo delle apparecchiature e alla necessità di pretrattare il campione [18].

La cromatografia liquida ad alte prestazioni HPLC è impiegata per l'analisi di circa l'80% dei composti organici nel mondo: è costituita da una fase stazionaria, ovvero una colonna cromatografica (tubo di plastica o di vetro) e da una fase mobile solventi acquosi o organici; durante l'analisi il campione assieme alla fase mobile è alimentato alla colonna con una pompa e i suoi componenti molecolari si distribuiscono tra tra la fase mobile e quella stazionaria a seconda delle loro affinità chimico-fisiche. La fase liquida fuoriesce dalla colonna con le frazioni separate dei singoli componenti del campione; queste sono rilevate in fase finale da un rilevatore programmabile a fluorescenza FLD. Il metodo HPLC ha una sensibilità accurata e rileva aflatossine a partire da valori superiori o uguali a 0,1 ppb, lo svantaggio maggiore è la richiesta di una precisa pulizia dei campioni [19].

I saggi immunoenzimatico ELISA sono diventati nel tempo molto utilizzati dai laboratori, e istituti di ricerca, in quanto non richiedono strumentazione complessa; permettono di ottenere risultati rapidamente in un tempo pari a 45 minuti; hanno un 'alta sensibilità (≤ 2 ppb) e un tasso di recupero del 80%-110%; tipicamente l'estrazione dei campioni da analizzare è effettuata con una soluzione di metanolo 70% v/v in un rapporto g(nocciole)/ml (metanolo) pari a 1/5 [19].

Il saggio si basa sulla reazione antigene-anticorpo e viene eseguito in una micropiastra da 96 pozzetti rivestiti con anticorpi di cattura; per eseguire il saggio, gli standard di aflatossine (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2) e gli estratti dei campioni vengono inseriti nei pozzetti; successivamente negli standard e negli estratti sono aggiunti il coniugato aflatossina-enzima e gli anticorpi anti-aflatossina.

Nella fase di prima incubazione (30 minuti) si ha una competizione fra le molecole di aflatossine (negli standard e negli estratti dei campioni) e il coniugato aflatossina-enzima per gli stessi siti di legame dell'anticorpo specifico anti-aflatossina; questo si lega poi agli anticorpi che ricoprono i pozzetti. Le molecole di aflatossine e di coniugato aflatossina-enzima che non si sono legate sono eliminate nello step di lavaggio [19].

Il legame tra coniugato enzimatico e anticorpo viene identificato con l'aggiunta di una soluzione di substrato cromogeno incolore; l'enzima converte il substrato cromogeno in un prodotto di reazione (blu) (seconda incubazione); successivamente viene fatta terminare la reazione enzimatica con l'aggiunta di una soluzione di stop e il prodotto di reazione vira dal blu al giallo; l'intensità di colore è inversamente proporzionale alla concentrazione di aflatossina presente nel campione/standard [19]. A questo punto si procede con la misura dell'assorbanza mediante spettrofotometria a 450 nm. In figura 2.1.2 è rappresentata la sequenza di step del saggio immunoenzimatico [19].

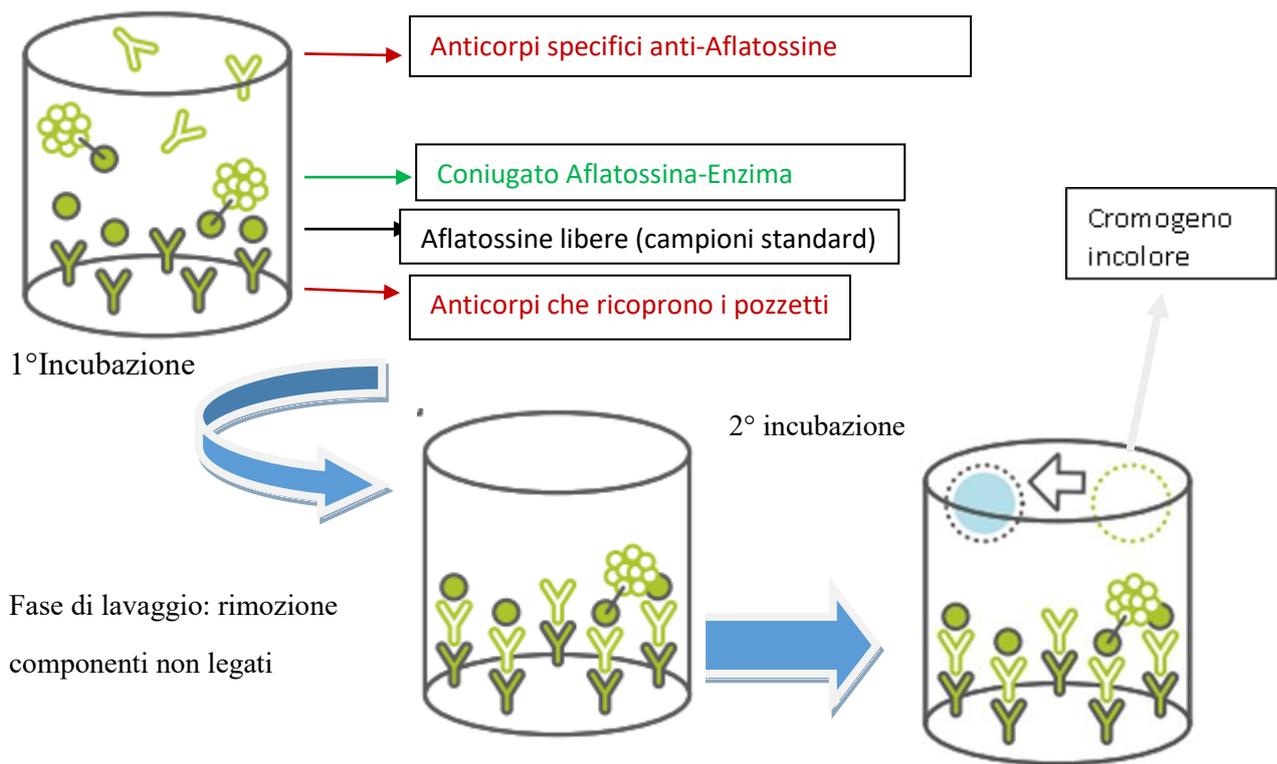


Figura 2.1.2 Principali step del saggio immunoenzimatico ELISA

3. Materiali e metodi

Questo capitolo descrive le analisi morfologiche e chimico-fisiche eseguite sulle nocciole; una prima fase di analisi è caratterizzata dalle misure dimensionali tramite calibro, dalle misure di pH e di umidità. Nella seconda fase sono descritti gli allestimenti di 12 Microcosmi sui quali sono state effettuate le prove respirometriche. Nella terza fase è descritta l'analisi per la rilevazione di aflatossine con il metodo ELISA.

3.1 Caratterizzazione morfologica

Le nocciole, come già sottolineato nell'introduzione, sono un alimento caratteristico della dieta mediterranea e negli ultimi anni è aumentato non solo il consumo diretto da parte dei consumatori ma anche quello industriale; in particolare il frutto è adoperato per il 60%-70% nell'industria del cioccolato e anche per la produzione di gelati, dolciumi, torroni, praline, bevande e creme spalmabili. Le caratteristiche del prodotto (dimensioni della nocciola con guscio e sgusciate, omogeneità, indice di rotondità, peso, colore) fornite stanno acquisendo sempre maggior importanza in quanto indicatori di qualità; questi indicatori di qualità sono utilizzati nel processo di cernita delle nocciole, in modo da eliminare le nocciole non conformi.

Nel lavoro di tesi la caratterizzazione morfologica ha permesso di confrontare i valori ottenuti per le nocciole analizzate con quelli standard della TGL; inoltre è stata un'analisi preliminare all'analisi respirometrica (paragrafo 3.3 Analisi Respirometrica) per capire se all'interno di una stessa tipologia di nocciole si evidenziavano attività respirometriche differenti (Capitolo 4 Analisi dei risultati).

Tipicamente la nocciola Tonda Gentile delle Langhe TGL presenta le seguenti caratteristiche sensoriali e carpologiche [20], [21]:

- Dolcezza media e poca astringenza
- È piuttosto consistente e granulosa
- Ha un flavour molto intenso ed oleoso nel quale si riconoscono sentori di legno
- L'intensità dell'odore non risulta molto elevata
- Indice di rotondità IR= 0,97
- Peso nocciola con guscio=2,25 g
- Peso nocciola senza guscio=1,07g

- Calibro diametro medio della nocciola senza guscio $D = 1,4$ cm
- Calibro diametro medio della nocciola con guscio $D = 1,76$ cm
- Percentuale di sfericità $\Psi = 95,64\%$

Le nocciole TGL analizzate si dividono nelle seguenti tipologie:

- Avariate scure
- Avariate chiare
- Cimiciate
- Tostate scarto manuale
- Tostate scarto avariato
- Nocciole sane
- Nocciole sane con guscio

Per ogni tipologia sono state prelevati campioni da 25 nocciole in modo da misurare, tramite bilancia di precisione il peso [g]; tramite un calibro (sensibilità 0,05mm) sono state determinate lunghezza A, larghezza B e profondità C come indicato in figura 3.1.1.

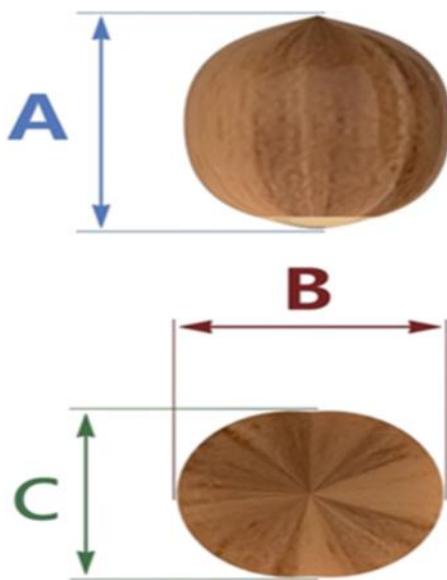


Figura 3.1.1 Dimensioni misurate della nocciola

Dopo la calibrazione delle tre dimensioni sono stati calcolati tre parametri: diametro medio D_p , indice di rotondità IR e percentuale di sfericità Ψ tramite le formule (3.1), (3.2) e (3.3):

$$D_p = (A \times B \times C)^{\frac{1}{3}} \quad (3.1)$$

$$IR = \frac{B+C}{2 \times A} \quad (3.2)$$

$$\Psi = 100 \times \frac{Dp}{A} \quad (3.3)$$

3.1.1 Determinazione di pH e di umidità %

Per i sette campioni di nocciole (avariate scure, avariate chiare, cimiciate, tostate scarto manuale, tostate scarto avariato, nocciole sane e nocciole con guscio) è stato determinato il pH con il metodo potenziometrico utilizzando un pHmetro.

Per eseguire le misure sono state prese per ogni tipologia 5 g di nocciole, poste in un becher e bagnate con 12,5 ml di acqua distillata in quanto il rapporto campione/solvente è di 20g(nocciole)/50 ml (solvente).

I campioni sono stati mantenuti in agitazione continua per due ore e al termine dell'operazione ciascun campione è stato lasciato decantare per 10 minuti; il pH della fase liquida è stato misurato inserendo la sonda del pHmetro direttamente all'interno del becher; per ogni campione la misura del pH è stata rilevata tre volte e poi è stata calcolata la media dei valori ottenuti.

L'umidità % delle nocciole è stata determinata prelevando per ogni tipologia di nocciole tre campioni di diverso peso (2g-15g) ed essiccando in forno a una temperatura di 60°C; ogni 24 h si rilevava il peso finché questo non raggiungeva un valore costante. L'umidità% di ogni campione è stata calcolata mediante la formula 3.4 e poi è stata ricavato il valore medio sui tre campioni di ogni tipologia.

$$Umidità\% = 100 * \frac{Peso\ iniziale\ nocciole(g) - Peso\ finale(g)}{Peso\ iniziale\ nocciole\ (g)} \quad (3.4)$$

3.2 Allestimento microcosmi

Per monitorare la crescita di biomassa sulle nocciole e quindi valutare il quantitativo di CO₂ prodotta dalla biomassa stessa sono stati allestiti i microcosmi: sistemi chiusi verso l'ambiente esterno all'interno dei quali sono state inserite le nocciole. I microcosmi sono stati allestiti per le nocciole cimiciate, le nocciole sane e le nocciole con guscio; in ogni prova sono stati allestiti microcosmi di controllo con nocciole sterili e microcosmi abiotici.

La preparazione dei microcosmi è stata effettuata in vasi di vetro dalla capacità di 1064 ml chiusi ermeticamente con l'utilizzo di una guarnizione; in ogni microcosmo è stata inserita acqua distillata per avere l'umidità delle nocciole al 40% rispetto a quella calcolata con la formula (3.4); in particolare due microcosmi di nocciole cimiciate non sono stati saturati al 40% per poter analizzare la loro attività respirometrica rispetto alle nocciole cimiciate saturate al 40%; le nocciole sono state posizionate su una retina appoggiata su un supporto, entrambi

in materiale plastico, in modo da non farle cadere sul fondo del vaso; nello spazio di testa del vaso è stata sospesa tramite un filo una provetta di plastica con 10ml di NaOH 1,5 N.

Prima dell'allestimento, ogni componente del microcosmo è stato sterilizzato in autoclave a una temperatura T pari a 121°C ; su tutti i microcosmi le prove sono state eseguite a temperatura ambiente. In figura 3.2.1 è rappresentato un esempio di microcosmo.



Figura 3.2.1 Esempio di microcosmo

I diversi microcosmi allestiti sono i seguenti:

- Microcosmi con 35 g di nocciole cimiciate intere con acqua distillata sul fondo del vaso pari a 20 ml
- Microcosmi con 35 g di nocciole cimiciate rotte con acqua distillata sul fondo del vaso pari a 20 ml
- Microcosmi con 35 g di nocciole cimiciate intere nebulizzate; in questo caso non è stata inserita acqua sul fondo del vaso, ma le nocciole sono state nebulizzate spruzzando 1 ml di acqua distillata
- Microcosmi con 35 g di nocciole cimiciate rotte nebulizzate; in questo caso non è stata inserita acqua sul fondo del vaso, ma le nocciole sono state nebulizzate spruzzando 1 ml di acqua distillata
- Microcosmi con 35 g di nocciole cimiciate con acqua distillata sul fondo del vaso pari a 20 ml
- Microcosmi con 35 g di nocciole con guscio con acqua distillata sul fondo del vaso pari a 23 ml
- Microcosmi con 35 g di nocciole sane con acqua distillata sul fondo del vaso pari a 20 ml

Da notare che le nocciole sane e cimiciate hanno lo stesso quantitativo di acqua sul fondo del vaso in quanto presentano quasi lo stesso valore di umidità % calcolata con la formula (3.4)

- Microcosmo con doppio layer di nocciole con un'altezza degli strati di nocciole pari a 2,7 cm e un peso di nocciole pari a 90 g; acqua distillata sul fondo del vaso pari a 50 ml e uno spazio di testa all'interno del vaso pari al 45%
- Microcosmo multilayer con un'altezza degli strati di nocciole pari a 6,5 cm e un peso di nocciole pari a 153 g.; acqua distillata sul fondo del vaso pari a 80 ml e uno spazio di testa all'interno del vaso pari al 25% In entrambi i microcosmi è stata introdotto un quantitativo di acqua pari a 50 ml.

Ogni campione doppiolayer e multilayer è stato replicato tre volte., per un totale di sei microcosmi:

- Microcosmo doppiolayer (campione 1)
- Microcosmo doppiolayer (campione 3)
- Microcosmo doppiolayer (campione 5)
- Microcosmo multilayer (campione 4)
- Microcosmo multilayer (campione 2)
- Microcosmo multilayer (campione 6)

In figura 3.3 sono raffigurati il microcosmo doppiolayer e multilayer.



Figura 3.2.2 A sinistra Microcosmo doppiolayer, a destra Microcosmo multilayer

3.3 *Analisi respirometriche*

La valutazione dell'attività respirometrica della biomassa cresciuta sulle nocciole all'interno dei microcosmi, è stata effettuata sfruttando la capacità della base NaOH, inserita all'interno dei microcosmi, di catturare la CO₂ prodotta.

Sperimentalmente la quantificazione di CO₂ è stata ottenuta correlando i volumi di acido cloridrico HCl 1,5 M necessari a titolare la soluzione di NaOH all'interno dei microcosmi.

Le titolazioni acido-base sono state eseguite periodicamente. Ad ogni titolazione veniva estratto il contenitore di NaOH da ciascun microcosmo e la soluzione basica versata in un becher con aggiunta di gocce di BaCl₂ 1M (agente precipitante) e di fenolftaleina (0,1 % v/v di una soluzione di di 80% v/v di etanolo) come indicatore di colore; la soluzione così ottenuta veniva titolata su un agitatore magnetico con aggiunta di HCL 1,5 M usando una buretta da 50 ml. La titolazione terminava quando si osservava l'istantaneo viraggio di colore da rosa intenso a bianco, ovvero quando la soluzione di NaOH+CO₂ era completamente titolata dall'acido; poi si visualizzava sulla buretta il volume di HCL utilizzato. Tutte le operazioni sono svolte velocemente in modo da evitare la dispersione nell'ambiente dell'anidride carbonica. Terminata la titolazione il contenitore di plastica all'interno del microcosmo veniva riempita nuovamente con 10 ml di NaOH.

Il principio chimico-fisico dell'analisi si basa sul fatto che le molecole di NaOH che hanno reagito con le molecole di CO₂ non sono più in grado di legarsi con il titolante HCl; quindi, è possibile relazionare il volume di HCl, necessario per titolare la soluzione fino al viraggio, con la quantità di CO₂. La titolazione è applicata non solo ai microcosmi biotici ma anche al microcosmo abiotico (sistema di controllo), in modo da avere una stima del volume di HCl necessaria a titolare la base NaOH in assenza di CO₂ legata all'attività respiratoria della biomassa.

I volumi titolanti di HCl per i sistemi biotici e per il sistema abiotico necessari alla stima del quantitativo di CO₂ [mg] prodotta sono correlati usando la seguente formula (3.5) [22]:

$$CO_2(mg) = (V_0 - V) * M * f \quad (3.5)$$

V₀= ml di HCL necessari per titolare NaOH de sistema di controllo abiotico

V= ml di HCl necessari per titolare NaOH dei sistemi biotici

M= molarità del titolante HCL

f= 22 (Peso Equivalente espresso in termini di CO₂)

3.4 *Analisi Aflatossine*

L'analisi delle Aflatossine totali (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂) è stata eseguita con il Kit ELISA RIDASCREEN Aflatoxins Total, il cui principio di funzionamento è stato descritto nella sezione 2.1.

Al termine delle analisi respirometriche sono stati eseguiti i saggi immunoenzimatici sui seguenti campioni:

- Nocciole cimiciate rotte con acqua
- Nocciole cimiciate intere con acqua
- Nocciole sane monolayer
- Nocciole sane doppiolayer (campioni 1 e 3)
- Nocciole sane multilayer (campioni 4 e 2)

I materiali utilizzati per eseguire le prove sono:

- Micropiastra da 96 pozzetti
- Gli standard delle aflatoxine con le seguenti quantità:
 - Standard 1: 0 µg/l
 - Standard 2: 0.05 µg/l
 - Standard 3: 0,15 0 µg/l
 - Standard 4: 0,45 0 µg/l
 - Standard 5:1,35 0 µg/l
 - Standard 6: 4.05 0 µg/l
- Coniugato Aflatossina-Enzima
- Anticorpo specifico anti-Aflatossina
- Substrato cromogeno
- Soluzione di stop
- Soluzione di lavaggio PBS Tween
- Mulino da laboratorio
- Cilindro graduato 100 ml
- Pipette graduate
- Imbuto e contenitore da 50 ml
- Carta filtro Whatman
- Micropipette da 20 µl -200µl
- Micropipette da 200 µl -1000 µl
- Lettore colorimetrico per micropiastre (450 nm)
- Centrifuga

Nella fase di preparazione sono state prelevate, per ogni tipologia di campione, circa 30 g di nocciole e poste nelle provette Falcon; infine, le provette con le nocciole sono state riempite con un volume di acqua distillata pari a 30 ml. Successivamente i campioni di nocciole cimiciate (sia rotte che intere) e sane sono stati pretrattati con un lavaggio sia mediante centrifuga (per circa 15 minuti a una velocità di 3000 rpm) sia mediante autoclave; i campioni di nocciole bilayer e multilayer sono stati pretrattati con un lavaggio solo mediante centrifuga (per circa 15 minuti a una velocità di 3000 rpm). Al termine di ogni pretrattamento i campioni sono stati asciugati in stufa per due giorni a una temperatura di 60°C.

Successivamente le nocciole di ogni campione sono state tritate con un mulino da laboratorio per circa 4 minuti fino ad ottenere una granulometria piuttosto omogenea; in seguito, da ogni campione è stata prelevata una quantità di nocciole macinate pari a 5g; per ognuna di esse è stata aggiunta una quantità di metanolo (70% v/v) pari a 25 ml in modo da avere un rapporto nocciole(g)/metanolo(ml) pari a 1/5; la soluzione nocciole-metanolo così ottenuta per ogni campione è stata posta in agitazione su un agitatore magnetico per 10 minuti e poi filtrata con foglio di carta da filtro Whatman grado 1; l'estratto di ogni tipologia di nocciola è stato poi utilizzato per la prova.

Per l'esecuzione della prova con il kit Elisa, sono stati inseriti (con micropipette da 200 µl) nei pozzetti della micropiastra 50 µl di standard e 50 µl di estratto dei campioni; successivamente sono stati aggiunti 50 µl di coniugato enzima-aflatossina in ogni pozzetto e 50 µl di soluzione di anticorpo specifico anti-aflatossina; i pozzetti così riempiti sono stati agitati mediante oscillatore all'interno di una camera termostatica (T=25°C) buia per 30

minuti (1° incubazione). Al termine della prima fase di incubazione la micropiastra è stata capovolta su carta assorbente per tre volte consecutive; dopo, i pozzetti sono stati riempiti con 250 µl di soluzione di lavaggio e svuotati per rimuovere le soluzioni precedentemente aggiunte (l'operazione di lavaggio è stata ripetuta per due volte). Dopo la fase di lavaggio sono stati aggiunti 100 µl di soluzione substrato-cromogeno in ogni pozzetto; è stata eseguita una miscelazione mediante oscillatore all'interno di una camera termostatica (T=25°C) buia per 15 minuti (2° incubazione). Dopo la seconda incubazione sono stati aggiunti in ogni pozzetto 100 µl di soluzione di stop e poi è stata letta l'assorbanza in un lettore per micropiastre a 450 nm. La lettura è stata effettuata nei 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop come indicato sulle istruzioni del Kit ELISA RIDASCREEN.

Il profilo della curva standard è stato ottenuto mediante la formula 3.6.

$$A\% = \frac{\text{Assorbanza dello standard o del campione}}{\text{Assorbanza dello standard 0}} * 100 \quad (3.6)$$

A%= Assorbanza percentuale

I valori di assorbanza calcolati per gli standard e le concentrazioni di aflatossine degli standard espresse in µg (Aflatossine)/Kg(nocciole) devono essere inseriti in un grafico semilogaritmico per ricavare le concentrazioni di aflatossine dei campioni.

4. Analisi dei risultati

In questo capitolo saranno illustrati i risultati ottenuti dalla caratterizzazione morfologica, dalle misure di pH e di umidità%; dall'analisi respirometrica eseguita sui microcosmi allestiti e dall'analisi sulle aflatossine con il metodo ELISA.

4.1 Analisi morfologica, di pH e di umidità%

Per ogni tipologia di campione avariato (avariate scure, avariate chiare, cimiciate, tostate scarto manuale e tostate scarto avariato), costituito da 25 nocciole, è stata calcolata la media sulle rispettive grandezze misurate (lunghezza A [cm], larghezza B[cm] e profondità C[cm] con relativa deviazione standard σ ; è stata calcolata la media anche sui tre parametri D_p [cm], IR e Ψ [%] con relativa deviazione standard σ . I risultati delle medie sono riportati nelle figure 4.1.1, 4.1.2,4.1.3, 4.1.4 e 4.1.5.

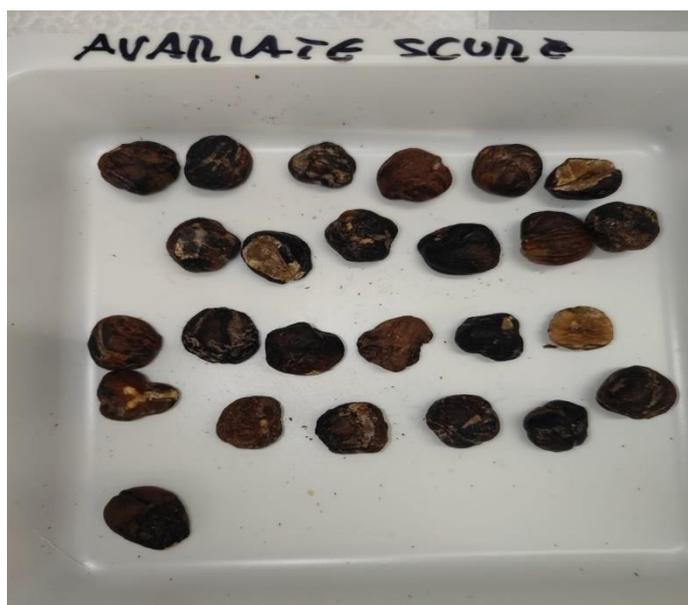


Figura 4.1.1 Nocciole avariate scure con relativa media delle misure

Lunghezza A (cm): 1,15 $\sigma=0,15$

Larghezza B (cm): 1,07 $\sigma=0,16$

Profondità C (cm): 0,84 $\sigma=0,17$

Peso (g): 0,75 $\sigma=0,16$

IR: 0,83 $\sigma=0,11$

Ψ (%) = 86,45 $\sigma=8,72$

D_p (cm)= 0,98 σ =0,13



Figura 4.1.2 Nocciole chiare avariate con relativa media delle misure

Lunghezza A (cm):1,17 σ =0,1

Larghezza B (cm):1,18 σ =0,16

Profondità C (cm):0,82 σ =0,16

Peso(g):0,81 σ =0,18

IR:0,86 σ =0,15

D_p (cm): 1 σ =0,1

Ψ (%): 86,5 σ =11,5

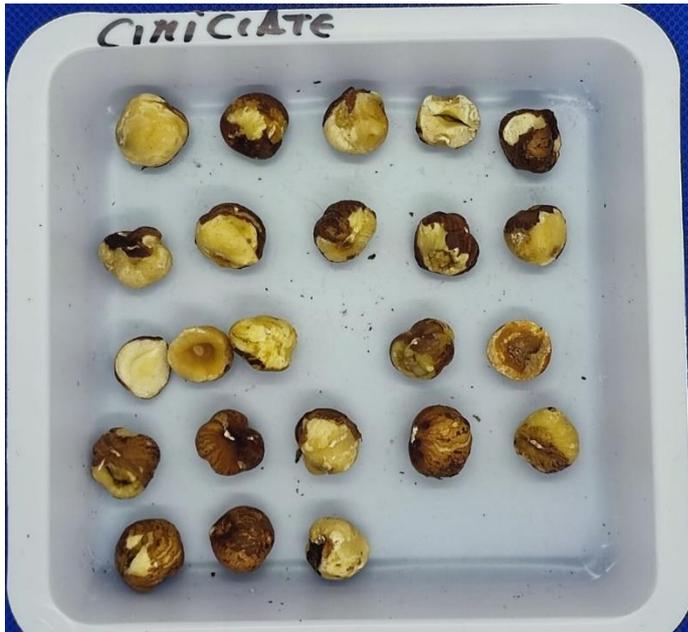


Figura 4.1.3 Nocciole cimiciate con relativa media delle misure

Lunghezza A (cm): 1,28 $\sigma = 0,1$

Larghezza B (cm): 1,16 $\sigma = 0,25$

Profondità C (cm): 0,92 $\sigma = 0,21$

Peso (g): 1 $\sigma = 0,25$

IR: 0,8 $\sigma = 0,14$

D_p (cm): 1,1 $\sigma = 0,2$

Ψ (%): 83% $\sigma = 12,5$



Figura 4.1.4 Nocciole tostate scarto avariato con relative medie delle misure

Larghezza A (cm): 1,22 $\sigma=0,1$

Larghezza B (cm): 1,24 $\sigma=0,1$

Profondità C (cm): 0,76 $\sigma=0,23$

Peso (g): 0,75 $\sigma=0,24$

IR: 0,82 $\sigma=0,12$

D_p (cm): 1,02 $\sigma=0,12$

Ψ (%): 83 $\sigma=10,2$



Figura 4.1.5 Nocciole tostate scarto manuale con relative medie delle misure

Lunghezza A (cm): 1,24 σ =0,1
 Larghezza B (cm): 1,24 σ =0,1
 Profondità C (cm): 0,96 σ =0,21
 Peso (g) :1,02 σ =0,26
 IR:0,89 σ =0,14
 D_p (cm): 1,1 σ =0,1
 Ψ (%): 89,2 σ =9,7

Dalle foto si evince che il colore delle nocciole non è nocciola chiaro, ovvero il colore di riferimento della tipica nocciola TGL, fatta eccezione per le tostate scarto manuale.

Dalle immagini si evince che i campioni, per ogni tipologia, sono costituiti da nocciole intere e da nocciole rotte e nelle seguenti tabelle 4.1.1 e 4.1.2 sono riportati distintamente i valori dimensionali (valori medi e rispettive deviazioni standard σ) per le nocciole intere e rotte di ogni tipologia.

Tabella 4.1.1 Lunghezza media A (cm), larghezza media B (cm), profondità media C (cm), IR medio, D_p medio (cm), Ψ medio (%) con relative deviazioni standard σ delle nocciole intere.

Nocciole	A (cm)± σ	B(cm)± σ	C(cm)± σ	IR± σ	Peso(g) ± σ	D _p (cm)± σ	Ψ (%) ± σ
Avariate scure	1,15±0,15	1,08±0,12	0,89±0,13	0,86±0,1	0,78±0,2	1,01±0,12	88±7
Avariate chiare	1,16±0,1	1,18±0,2	0,87±0,13	0,88±0,14	0,86±0,2	1,03±0,1	86,2±6,1
Cimiciate	1,3±0,1	1,2±0,1	1±0,1	0,85±0,1	1,1±0,1	1,14±0,1	87±5,2
Tostate scarto manuale	1,24±0,1	1,24±0,1	1±0,13	0,92±0,12	1,1±0,12	1,13±0,1	90±5,3
Tostate scarto avariate	1,21±0,05	1,21±0,1	0,95±0,15	0,91±0,1	0,95±0,1 4	1,11±0,1	89,2±4,2

Tabella 4.1.2 Lunghezza media A (cm), larghezza media B (cm), profondità media C (cm), IR medio, D_p medio (cm), Ψ medio (%) con relative deviazioni standard σ delle nocciole rotte

Nocciole	A (cm)± σ	B(cm)± σ	C(cm)± σ	IR± σ	Peso(g) ± σ	D _p (cm)± σ	Ψ (%) ± σ
Avariate scure	1,12±0,3	1±0,3	0,57±0,1	0,7±0,04	0,6±0,1	0,86±0,12	76±0,72
Avariate chiare	1,18±0,14	1,13±0,04	0,57±0,04	0,73±0,11	0,52±0,1	0,87±0,1	75±12
Cimiciate	1,2±0,01	1,13±0,1	0,53±0,5	0,68±0,01	0,54±0,1	0,9±0,01	74±1,14
Tostate scarto manuale	1,25±0,05	1,2±0,3	0,6±0,04	0,71±0,13	0,51±0,0 3	0,88±0,1	71±9,3
Tostate scarto avariate	1,22±0,1	1,24±0,1	0,6±0,1	0,74±0,1	0,53±0,1	0,92±0,1	76±7,7

Risultati dimensionali delle nocciole sane e delle nocciole con guscio, figura 4.1.6 e figura 4.1.7

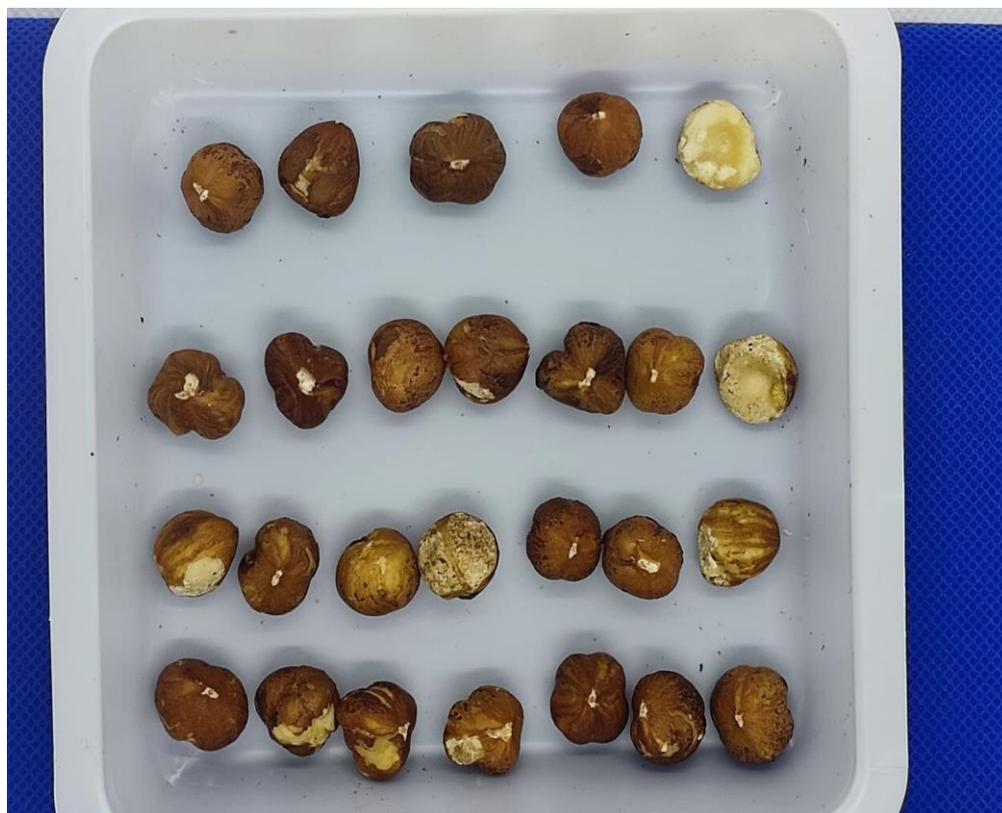


Figura 4.1.6 Nocciole sane, previo trattamento termico di essiccazione



Figura 4.1.7 Nocciole con guscio

Nella tabella 4.1.3 sono riportate (per le nocciole sane e nocciole con guscio) le medie sulle rispettive grandezze misurate (lunghezza A [cm], larghezza B[cm] e profondità C[cm]) con relativa deviazione standard σ ; è stata calcolata la media anche sui tre parametri D_p [cm], IR e Ψ [%] con relativa deviazione standard σ .

Tabella 4.1.3 Lunghezza media A (cm), larghezza media B (cm), profondità media C (cm), Peso (g) IR medio, D_p medio (cm), Ψ medio (%) con relative deviazioni standard σ delle nocciole rotte

Nocciole	A (cm) $\pm \sigma$	B(cm) $\pm \sigma$	C(cm) $\pm \sigma$	IR $\pm \sigma$	Peso(g) $\pm \sigma$	D_p (cm) $\pm \sigma$	Ψ (%) $\pm \sigma$
Nocciole sane	1,2 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	1 \pm 0,14	0,92 \pm 0,1	1,1 \pm 0,2	1,16 \pm 0,1	93 \pm 3,43
Nocciole con guscio	1,7 \pm 0,2	1,63 \pm 0,12	1,53 \pm 0,1	0,94 \pm 0,13	225 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1	94 \pm 4,1

Le nocciole sane, a un esame visivo, risultano avere un colore tendente al nocciola chiaro tipico della TGL; non presentano omogeneità nella forma e hanno pochi campioni rotti rispetto alle nocciole avariate.

In tabella 4.4 sono confrontati i parametri dimensionali dei campioni analizzati e quelli caratteristici della TGL.

Tabella 4.1.4 Confronto parametri dimensionali Lunghezza media A (cm), larghezza media B (cm), profondità media C (cm), IR medio, Dp medio (cm), Ψ medio (%)

Nocciole	Peso (g)	IR	D _p (cm)	Ψ (%)
Avariate scure	0,75	0,83	0,98	86,45
Avariate chiare	0,81	0,86	1,1	86,5
Cimiciate	1	0,8	1	83
Nocciole sane	1,1	0,92	1,2	93
Nocciole con guscio	2,3	0,94	1,7	94
Tonda Gentile delle Langhe con guscio	2,25	0,97	1,76	95,64
Tonda Gentile delle Langhe senza guscio	1,1	0,97	1,4	95,64

Dalla tabella si osserva che i tre campioni avariati sono sottodimensionati rispetto ai parametri di riferimento; le nocciole sane, invece, hanno un indice di rotondità IR pari a 0,92 di poco inferiore a quello standard (IR pari a 0,94); hanno un diametro medio D_p pari a 1,2 cm inferiore al diametro medio D_p standard pari a 1,4 cm e un peso invece uguale a quello di riferimento pari a 1,1g; le nocciole con guscio invece sono le uniche che rispettano i parametri standard.

In tabella 4.1.5 sono riportati i risultati delle misure del pH delle varie nocciole

Tabella 4.1.5 Valori medi di pH delle nocciole

Nocciole	pH in acqua distillata
Avariate scure	6
Avariate chiare	6,1
Cimiciate	6,1
Tostate scarto manuale	5,8
Tostate scarto avariate	5,5
Nocciole sane	5,5
Nocciole con guscio	6

Il pH di riferimento delle nocciole è tendente al neutro, pH=6,864 [23]; dalla tabella si evince che i campioni di tutte le tipologie di nocciole hanno un pH inferiore a quello di riferimento.

Per quanto riguarda l'umidità %, Il *Regolamento Europeo N.1284 del 2002* stabilisce che il tenore di umidità per la nocciola intera è il 12% e per il frutto sgusciato del 6%. Questi valori sono confrontati con quelli ottenuti sperimentalmente, tabella 4.5

In tabella 4.6 sono riportati i valori di umidità espressi in %.

Tabella 4.1.6 Valori medi %di umidità

Nocciole	Umidità %
Tostate scarto manuale	2,8
Tostate scaro avariate	3
Cimiciate	7,5

Avariate chiare	5,8
Avariate scure	6
Nocciole sane	8
Nocciole con guscio	10.8

Dai risultati si evince che solo le nocciole con guscio e tostate (sia scarto manuale che scarto avariato) hanno un'umidità%, rispettivamente pari 10,8%, 2,8%,3%, inferiore al limite del *Regolamento Europeo N.1284 del 2002* pari al 6%; mentre le avariate chiare e scure hanno un valore di umidità% uguale al limite del *Regolamento Europeo N.1284 del 2002* pari al 6%; le nocciole sane e cimiciate hanno un valore di umidità%, rispettivamente pari a 7,5% e 8%, leggermente superiore a quello del *Regolamento Europeo N.1284 del 2002* pari al 6%

4.2 Risultati Analisi respirometriche

Per le nocciole cimiciate sono stati allestiti sei microcosmi, inserendo in ciascuno di essi un ugual peso di nocciole pari a 35g:

- Un microcosmo non sterile di nocciole intere nel quale è stata aggiunto un quantitativo di acqua distillata pari a 20 ml, per portare l'umidità delle nocciole al 40% rispetto a quella calcolata con la formula (3.4)
- Un microcosmo non sterile di nocciole rotte nel quale è stata aggiunto un quantitativo di acqua distillata pari a 20 ml, per portare l'umidità delle nocciole al 40% rispetto a quella calcolata con la formula (3.4)
- Un microcosmo non sterile nocciole intere sulle quali è stata nebulizzata un volume di acqua pari a 1 ml
- Un microcosmo non sterile con nocciole rotte sulle quali è stata nebulizzata un volume di acqua pari a 1 ml
- Un microcosmo sterile di controllo contenente nocciole sterili
- Un microcosmo sterile di controllo senza nocciole.

In ogni microcosmo è stato valutato il quantitativo di CO₂ tramite titolazioni periodiche. In figura 4.2.1 sono rappresentate le nocciole dopo 6 giorni dall'allestimento dei microcosmi.



Figura 4.2.1 Da sinistra in alto nocciole intere nebulizzate, nocciole rotte nebulizzate, nocciole rotte con acqua sul fondo, nocciole intere con acqua sul fondo

Nei cerchi rossi sono evidenziate le nocciole su cui inizia a crescere biomassa; si evince che le nocciole (presenza di acqua sul fondo del vaso), sia rotte che intere, con contenuto di acqua superiore a quelle nebulizzate sono più suscettibili alla crescita di biomassa.

In figura 4.2.2 sono rappresentate le nocciole dopo 16 giorni dall'allestimento dei microcosmi.



Figura 4.2.2 Da sinistra in alto nocciole intere con acqua sul fondo, nocciole rotte con acqua sul fondo, nocciole intere nebulizzate, nocciole rotte nebulizzate

Dalle foto si evince che macroscopicamente la biomassa è cresciuta anche sulle nocciole intere nebulizzate con un 1 ml di acqua distillata mentre, invece sulle nocciole rotte nebulizzate la biomassa ancora non è visibile macroscopicamente.

In figura 4.2.3 sono rappresentate le nocciole dopo 28 giorni dall'allestimento dei microcosmi.



Figura 4.2.3 Da sinistra in alto nocchie intere rotte con acqua sul fondo, nocchie intere con acqua sul fondo, nocchie intere nebulizzate, nocchie rotte nebulizzate

Da un esame visivo si evince che su tutti i campioni di nocchie è possibile osservare biomassa; sulle nocchie rotte nebulizzate con 1 ml di acqua distillata la biomassa è stata osservata in ritardo rispetto alle nocchie intere nebulizzate con 1 ml di acqua distillata, nocchie intere e rotte con acqua sul fondo dei vasi di vetro.

La quantità di CO₂ prodotta dalla biomassa e cumulata, durante il periodo della prova (durata prova 30 giorni), in ciascun microcosmo è riportata in figura 4.2.4

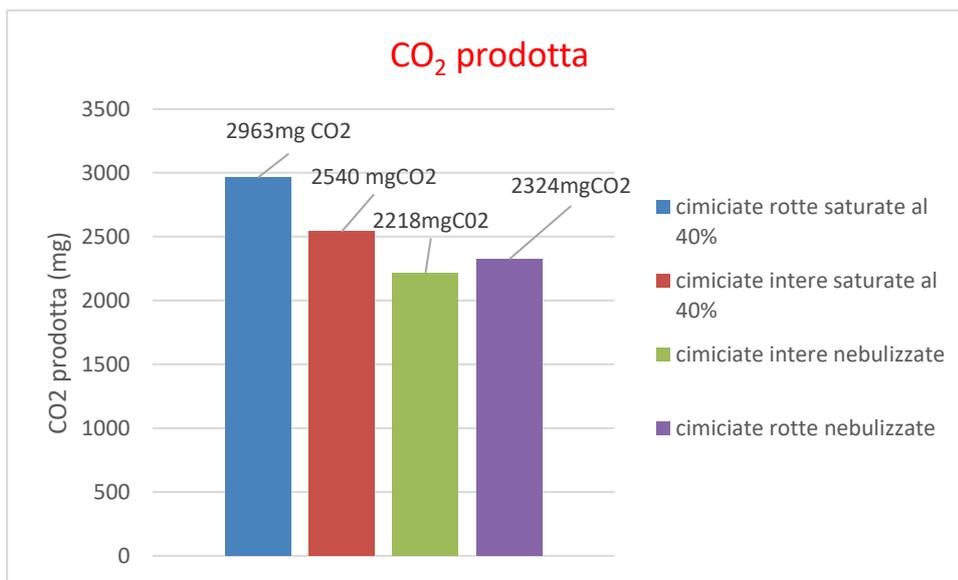


Figura 4.2.4 Valori cumulati di CO₂ in 30 giorni per i quattro microcosmi

Da un'analisi della figura 4.2.4 possiamo osservare che all'interno della stessa tipologia di nocchie, ovvero le cimiciate, le nocchie rotte con parametri morfologici (Peso =0,54g, IR=0,68, D_p=0,9cm) differenti da quelli delle nocchie intere (Peso=1.14g, D_p =1,14cm, IR=0,85) evidenziano differente attività respirometrica a parità di condizione di umidità%. Infatti, le nocchie cimiciate rotte con 20 ml di acqua distillata sul fondo del vaso di vetro producono il maggior quantitativo di CO₂ pari a 2963mg; mentre le nocchie intere con 20 ml di acqua distillata sul fondo del vaso di vetro acqua hanno prodotto un valore cumulativo di CO₂ pari a 2540 mg; le nocchie rotte e intere nebulizzate con 1 ml di acqua distillata invece producono un quantitativo cumulato di CO₂ inferiore, rispettivamente pari a 2324mg e 2218mg.

La curva cumulativa di CO₂ in figura 4.2.5 evidenzia che, nei primi 6 giorni di allestimento della prova, le nocciole cimiciate rotte e intere con 20 ml di acqua distillata sul fondo del vaso producono lo stesso valore di CO₂ pari a 330mg; le altre due tipologie di campioni, invece, producono un quantitativo di CO₂ molto inferiore nei primi sei giorni: le nocciole rotte nebulizzate con 1 ml di acqua distillata producono 80mg di CO₂, quelle intere nebulizzate con 1 ml di acqua distillata producono 180mg di CO₂.

La produzione di CO₂ è stata più lenta per le cimiciate rotte nebulizzate, mentre le nocciole cimiciate rotte con 20 ml di acqua distillata hanno la produzione più veloce; infatti, dalla pendenza delle rette di interpolazione delle curve dei quattro campioni, figura 4.2.6, si evince che le cimiciate rotte nebulizzate hanno una velocità di produzione di CO₂ pari a 85,8 mgCO₂/giorno: nettamente più bassa rispetto agli altri campioni (nocciole cimiciate intere nebulizzate velocità di produzione pari a 95 mgCO₂/giorno; nocciole cimiciate intere con 20 ml di acqua hanno velocità di produzione pari a 96 mgCO₂ /giorno; nocciole cimiciate rotte con 20 ml di acqua hanno velocità di produzione pari a 111mgCO₂/giorno).

In tutti e quattro i casi si osserva una produzione di CO₂ per tutta la durata della campagna di prova e una diminuzione della velocità di produzione di CO₂ dal ventesimo giorno fino alla fine della prova pari a 30 mgCO₂/giorno per tutti i campioni, figura 4.2.7.

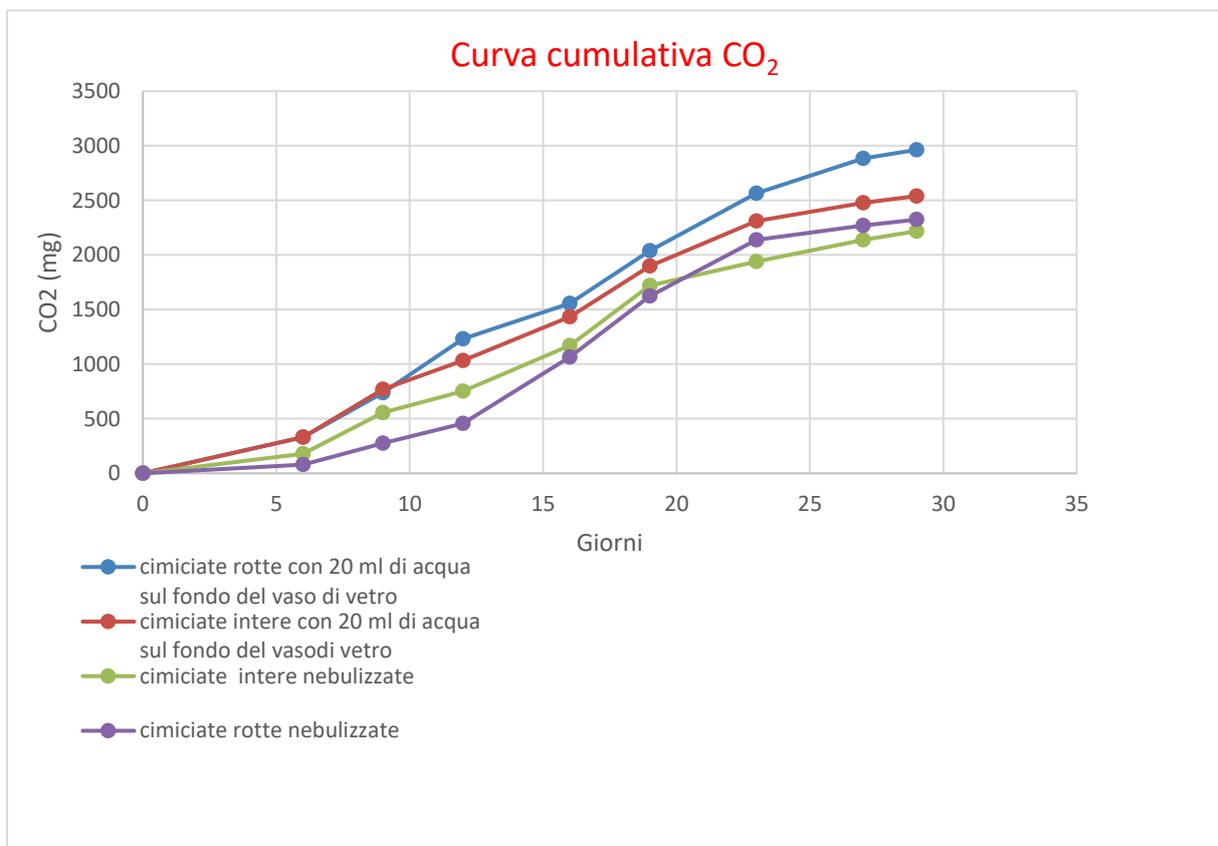


Figura 4.2.5 Curva cumulativa CO₂ in 30 giorni per i quattro microcosmi

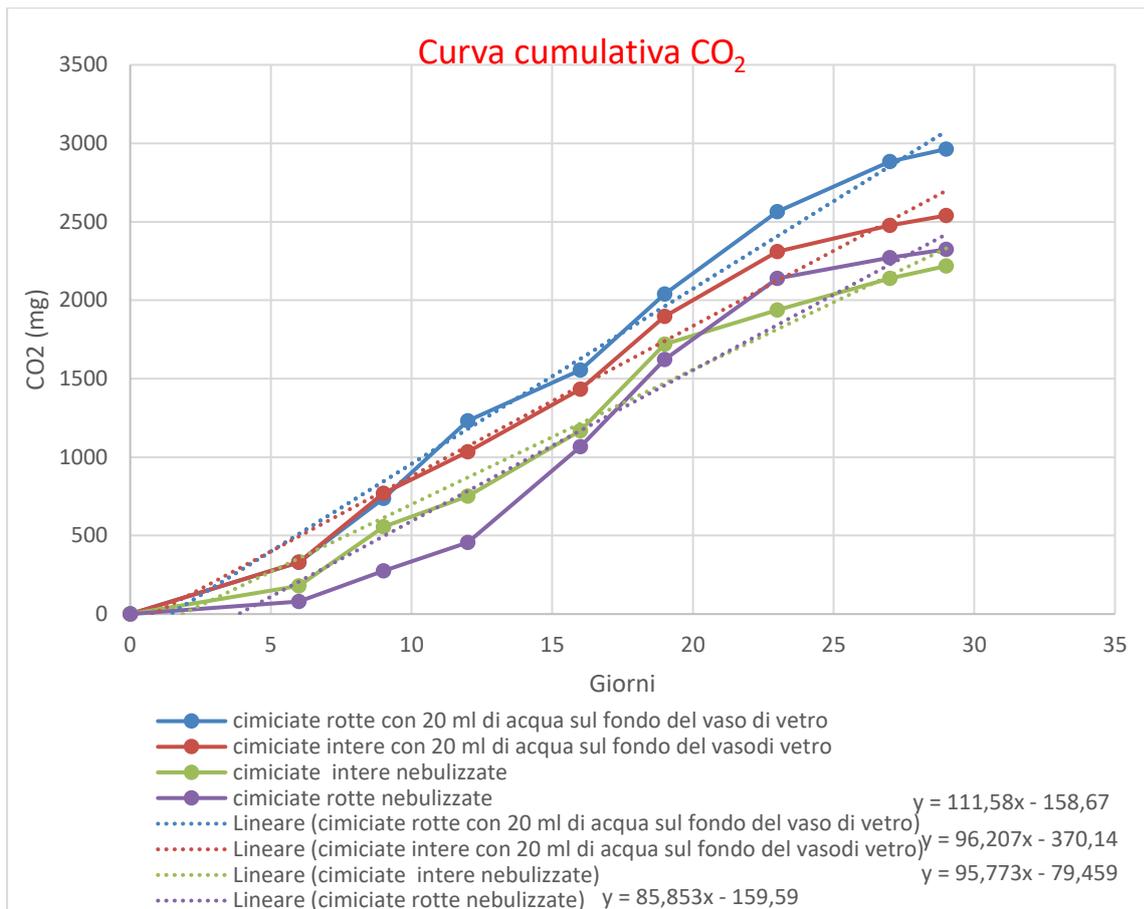


Figura 4.2.6 Curve cumulative con rette di interpolazione

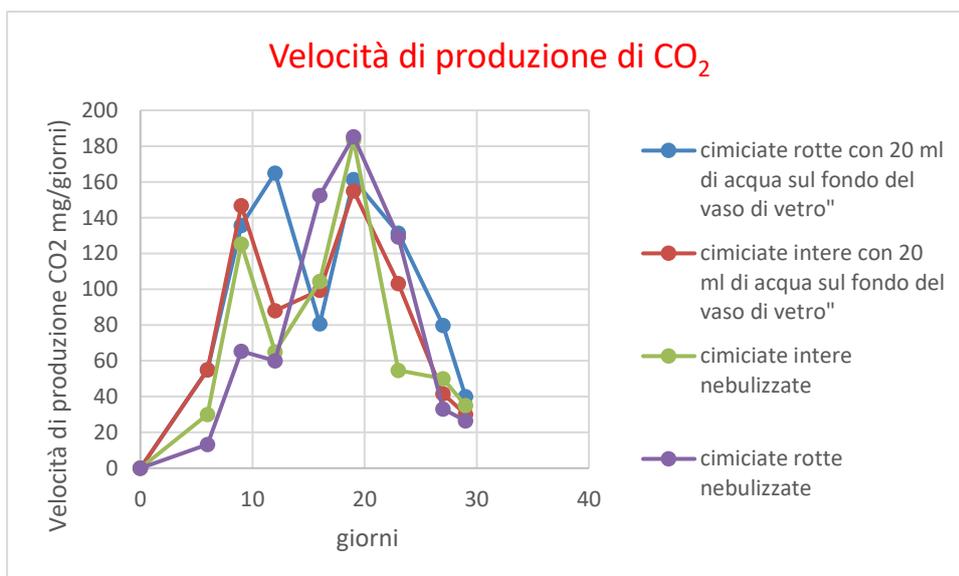


Figura 4.2.7 Curva di velocità di produzione della CO₂

Per la seconda campagna di prove respirometriche sono stati allestiti 4 microcosmi, inserendo in ciascuno di essi un ugual peso di nocciole pari a 35g:

- Un microcosmo con nocciole sane nel quale è stato aggiunto un quantitativo di acqua distillata pari a 20 ml, per portare l'umidità delle nocciole al 40% rispetto a quella calcolata con la formula (3.4).
- Un microcosmo con nocciole con guscio nel quale è stato aggiunto un quantitativo di acqua distillata pari a 25 ml, per portare l'umidità delle nocciole al 40% rispetto a quella calcolata con la formula (3.4)
- Un microcosmo con nocciole cimiciate (sia rotte che intere) nel quale è stato aggiunto un quantitativo di acqua distillata pari a 20 ml, per portare l'umidità delle nocciole al 40% rispetto a quella calcolata con la formula (3.4)
- Un microcosmo sterile di controllo contenente nocciole con guscio sterili
- Un microcosmo sterile di controllo contenente nocciole sane sterili
- Un microcosmo sterile di controllo contenente nocciole cimiciate sterili

Da notare che il quantitativo di acqua inserita sul fondo del vaso di vetro sia per le nocciole sane che cimiciate è uguale in quanto hanno stesso peso, ovvero 35g all'interno dei microcosmi, e quasi stessi valori medi % di umidità, come si evince in tabella 4.5.

In ogni microcosmo è stato valutato il quantitativo di CO₂ tramite titolazioni periodiche. In figura 4.2.8 sono rappresentate le nocciole dopo 18 giorni dall'allestimento dei microcosmi.



Figura 4.2.8 Da sinistra nocciole cimiciate (sia rotte che intere), nocciole sane, nocciole con guscio

Dalle foto si evince che, dopo 18 giorni dall'allestimento dei microcosmi, le nocciole cimiciate presentano macroscopicamente più biomassa rispetto alle nocciole sane; sulle nocciole guscio, macroscopicamente non è presente crescita di biomassa.

Crescita di biomassa sulle nocciole dopo 31 giorni dall'allestimento, figura 4.2.9

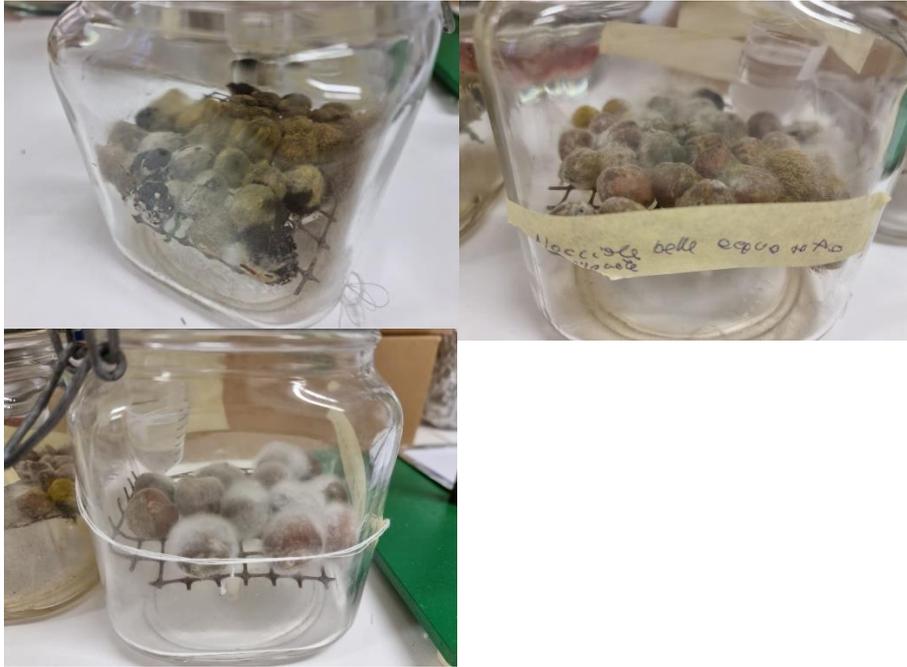


Figura 4.2.9 Da sinistra in alto nocciole cimiciate (sia intere che rotte), nocciole sane, nocciole con guscio

Osservando a occhio nudo la biomassa cresciuta si evince che sulle cimiciate è notevolmente aumentata; sulle nocciole sane e nocciole con guscio si osserva macroscopicamente biomassa di colore diverso, sulle sane di colore giallo-verde, sulle nocciole con guscio di colore bianco.

Crescita di biomassa dopo 54 giorni dall'allestimento dei microcosmi, figura 4.2.10.



Figura 4.2.10 Da sinistra nocciole cimiciate (sia rotte che intere), nocciole sane, nocciole con guscio

Osservando macroscopicamente la biomassa cresciuta, dopo 54 giorni, si evince che sulle cimiciate e sulle nocciole sane è aumentata molto di più rispetto alle nocciole con guscio.

Da un'analisi della figura 4.2.11 si nota che le nocciole cimiciate producono il maggior quantitativo di CO_2 pari a 2623mg seguite dalle nocciole sane con 1876 mg; le nocciole con guscio invece ne producono una quantità nettamente inferiore pari a 1248 mg.

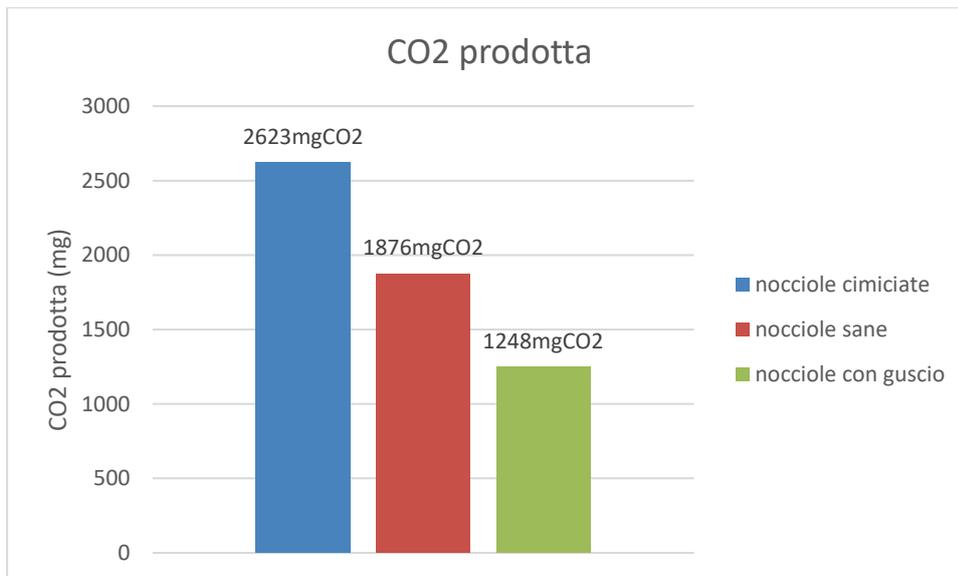


Figura 4.2.11 Valori cumulativi di CO₂ prodotta dai tre microcosmi in 54 giorni

La curva cumulativa di CO₂ in figura 4.2.12 evidenzia che nei primi 8 giorni di allestimento della prova la produzione di CO₂ è stata osservata maggiormente per le nocciole cimiciate per un valore pari a 336mg; mentre per le nocciole sane e con guscio nei primi 8 giorni la produzione è nettamente inferiore rispetto alle cimiciate (le nocciole sane hanno un valore cumulato di CO₂ pari a 114mg, le nocciole con guscio hanno un valore cumulato di CO₂ pari a 77mg). La produzione di CO₂ è stata nettamente più lenta per le nocciole con guscio, come si evince dalla pendenza della curva pari a 25,2 mgCO₂/giorno, nettamente più bassa rispetto alle altre (pendenza curva delle nocciole sane è pari a 39,2 mgCO₂/giorno, la pendenza della curva delle cimiciate è pari a 54,2 mgCO₂/giorno); da questi valori si deduce che la velocità di produzione di CO₂ per le nocciole sane è intermedia tra quelle cimiciate e quelle con guscio. In tutti e tre i casi si osserva una produzione di CO₂ per tutta la durata della campagna di prova; in seguito, negli ultimi 30 giorni si è assistito ad una diminuzione della velocità di produzione di CO₂ per tutti e tre i campioni fino a un valore pari a 30 mgCO₂/giorno, figura 4.2.13

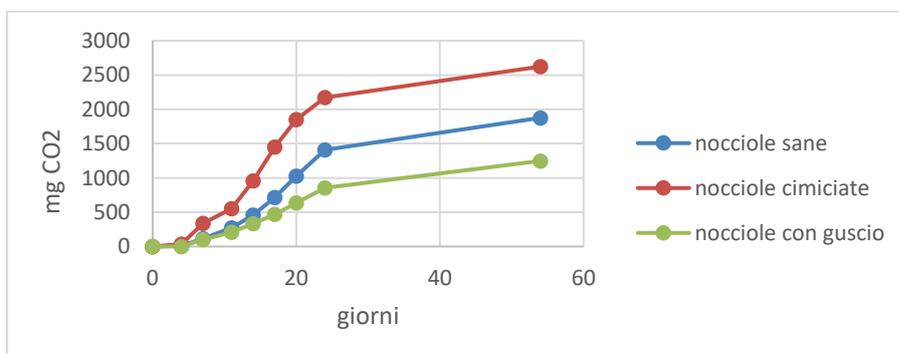


Figura 4.2.12 Curva cumulativa CO₂ dei tre microcosmi in 54 giorni

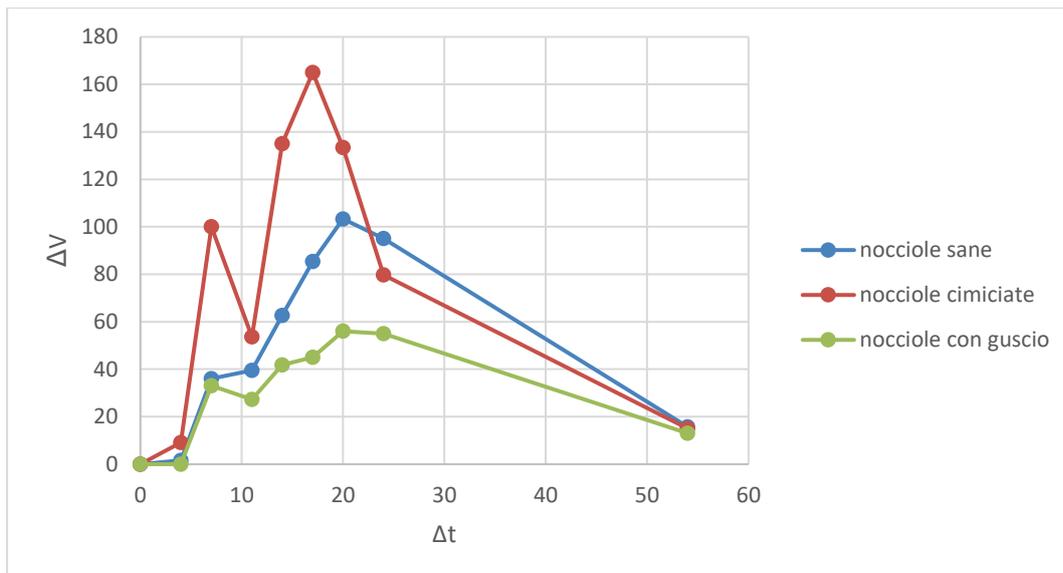


Figura 4.2.13 Velocità di produzione di CO2 in 54 giorni per i tre microcosmi

I risultati riguardanti i campioni doppiolayer e campioni multilayer sono stati rilevati dopo 69 giorni. Campione 1 doppiolayer, figura 4.2.14.

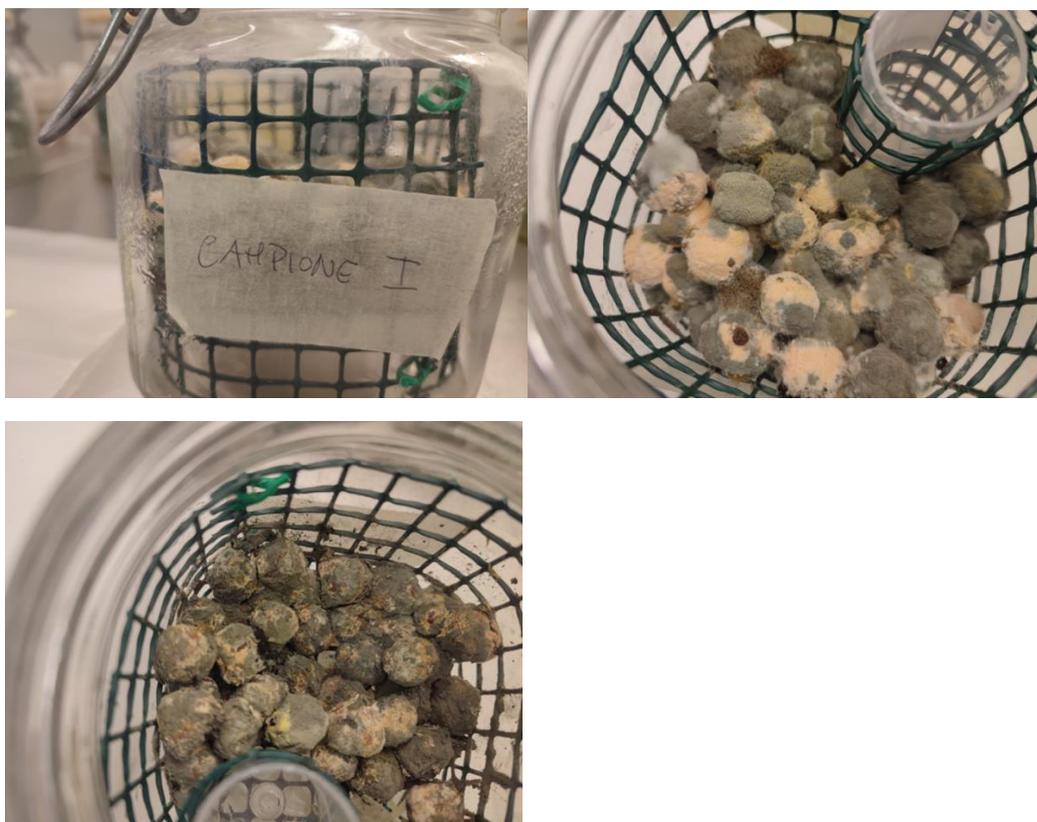


Figura 4.2.14 Campione 1 doppiolayer, a destra in alto biomassa sullo strato superiore e in basso a sinistra biomassa sullo strato inferiore.

Campione 3 doppiolayer, figura 4.2.15



Figura 4.2.15 Campione 3 doppiolayer, biomassa sugli strati inferiori e superiori del doppiolayer

Campione 5 doppiolayer, figura 4.2.16.



Figura 4.2.16 Campione 5 doppiolayer, in alto a destra biomassa sullo strato superiore, e sugli strati inferiori del doppiolayer.

Comparando macroscopicamente le foto dei campioni bilayer, si nota come macroscopicamente sul campione 1 sia cresciuta più biomassa rispetto agli altri due campioni; in tutti e tre i casi la consistenza delle nocchie è molto friabile.

Campione 2 multilayer, figura 4.2.17



Figura 4.2.17 Campione 2 multilayer, in alto a destra biomassa sugli strati superiori, in basso a sinistra biomassa sugli strati inferiori

Campione 4 multilayer, figura 4.2.18



Figura 4.2.18 Campione 4 multilayer, in alto a destra strati superiori del multilayer, in basso a sinistra strati inferiori del multilayer.

Campione 6 multilayer, figura 4.2.19



Figura 4.2.19 Campione 6 multilayer, in alto a destra biomassa sugli strati superiori, in basso a sinistra biomassa sugli strati inferiori.

Confrontando le immagini dei campioni multilayer si evince che macroscopicamente la crescita di biomassa è maggiormente presente sul campione 4 (sia sugli strati superiori che inferiori) ed è anche più eterogenea; sugli altri due campioni, da osservazione macroscopica, si nota che la biomassa è cresciuta in misura minore e ha lo stesso colore bianco. Inoltre, sui campioni 2 e 6 la biomassa è poco presente sugli strati superiori rispetto agli strati inferiori, più vicini al quantitativo di acqua presente sul fondo del vaso.

La cumulativa CO_2 dei campioni doppiolayer, figura 4.2.20 evidenzia che nei primi 8 giorni la produzione di CO_2 è quasi nulla; dal decimo giorno in poi la produzione aumenta notevolmente per il campione 1 fino a un valore finale di CO_2 pari a 4791mg; infatti, la pendenza della curva è notevolmente più alta pari a 72,44 $\text{mgCO}_2/\text{giorno}$. I campioni 3 e 5 hanno la produzione di CO_2 nettamente più bassa rispettivamente pari a 2581 mg di CO_2 e 2203 mg di CO_2 ; la loro produzione di CO_2 è molto più lenta rispetto quella del campione 1, infatti le pendenze delle curve dei campioni 3 e 5 sono pari a 39,5 $\text{mgCO}_2/\text{giorno}$ e 32,6 $\text{mgCO}_2/\text{giorno}$.

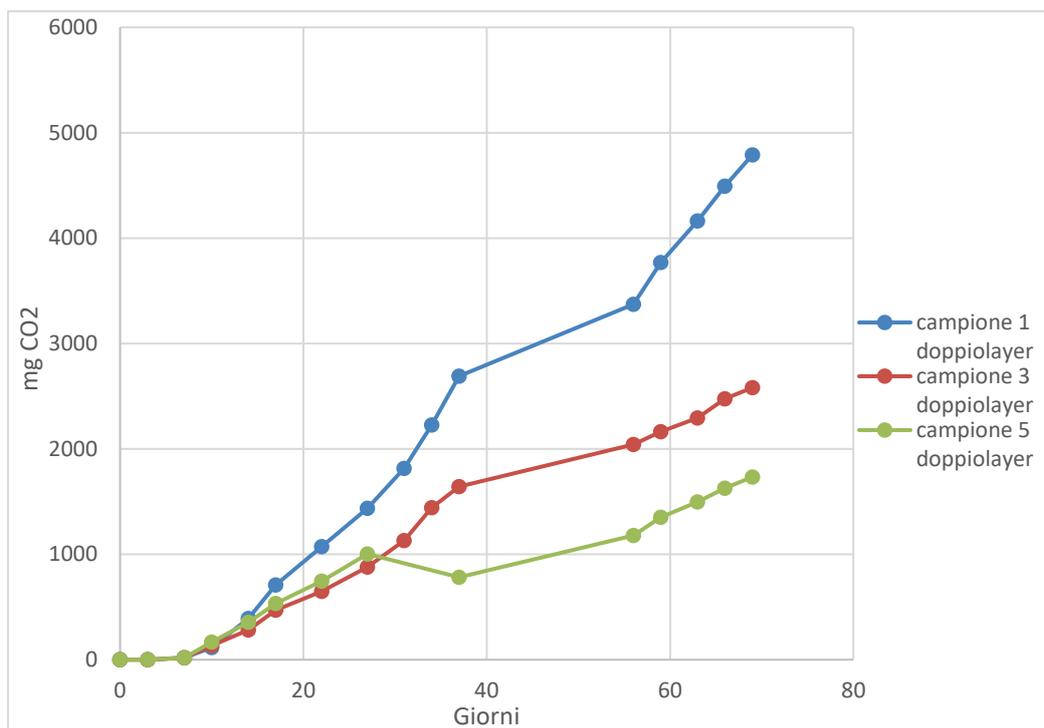


Figura 4.2.20 Curva cumulativa CO₂ dei campioni doppiolayer per 69 giorni

La curva cumulativa CO₂ dei campioni multilayer, figura 4.2.21 evidenzia che nei primi 8 giorni la produzione di CO₂ è nulla; dal decimo giorno in poi la produzione aumenta notevolmente per il campione 4 fino a un valore finale pari a 3440 mgCO₂/giorno, infatti la pendenza della curva è notevolmente più alta rispetto alle pendenze delle altre due curve per un valore pari a 54,7 mgCO₂/giorno; inoltre, anche dalle foto si evince che, macroscopicamente, su questo campione è presente una crescita maggiore di biomassa rispetto ai campioni 2 e 6. Il campione 6 presenta un valore cumulativo di CO₂ intermedio pari a 2711 mg, mentre il campione 2 ha il valore cumulativo di CO₂ più basso pari a 2203 mg.; infatti entrambi i campioni 6 e 2 hanno velocità di produzione di CO₂ più bassa rispetto al campione 4, rispettivamente pari a 42,3 mgCO₂/giorno e 37,4 mgCO₂/giorno.

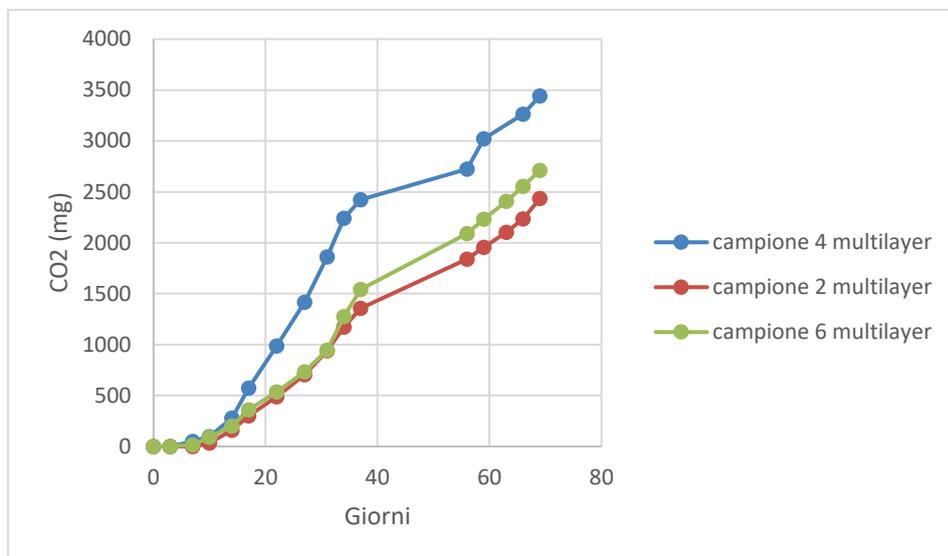


Figura 4.2.21 Curva cumulativa CO₂ dei campioni multilayer per 69 giorni

4.3 Risultati delle analisi delle Aflatossine

I campioni analizzati sono i seguenti:

- Nocciole sane saturate al 40% pretrattate in centrifuga (campione BC)
- Nocciole intere cimiciate saturate al 40% pretrattate in centrifuga (campione ICC)
- Nocciole rotte cimiciate saturate al 40% pretrattate in centrifuga (campione RCC)
- Nocciole sane doppiolayer saturate al 40% pretrattate in centrifuga (campioni 1 e 3)
- Nocciole sane multilayer saturate al 40% pretrattate in centrifuga (campioni 4 e 2)

In figura 4.3.1 è riportato il profilo della curva standard calcolata con la formula (3.6).

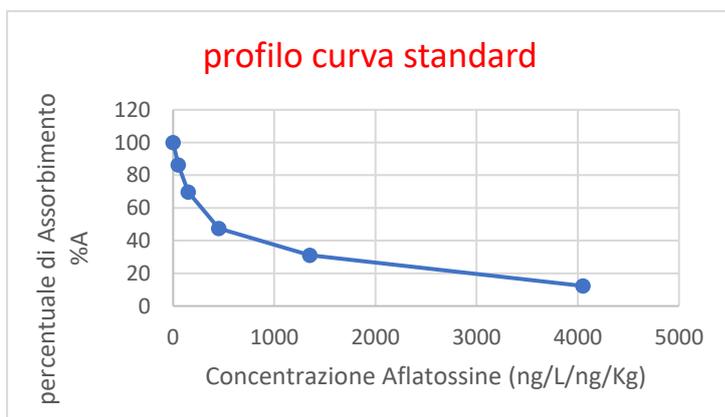


Figura 4.3.1 Profilo curva standard: asse y assorbanza percentuale (%), asse x concentrazione aflatossine agli standard (ng/L/ng/Kg).

Dal grafico si evince che l'assorbanza è inversamente proporzionale alla concentrazione di aflatossine.

Per ogni tipologia di campione pretrattata nelle due diverse modalità (centrifuga e autoclave) sono state eseguite le medie dei valori di assorbanza percentuale% rilevati dalla lettura spettroscopica; anche per i campioni doppiolayer e multilayer analizzati in duplicato è stata eseguita la media dei valori di assorbanza percentuale%.

Successivamente i valori di assorbanza calcolati per gli standard e per i campioni e i valori delle concentrazioni (μg aflatossina/Kgnocciole) di aflatossine degli standard sono stati riportati in un grafico semilogaritmico; in questo modo è stato possibile determinare la concentrazione (μg Aflatossine/Kg di nocciole) per i campioni analizzati, figura 4.3.2.

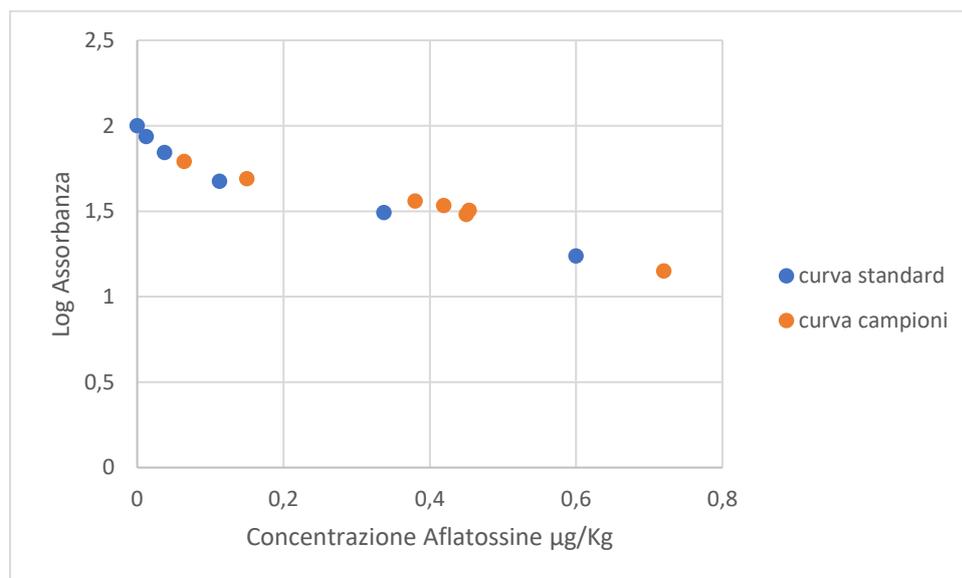


Figura 4.3.2 Grafico per determinare le aflatossine: asse y logaritmo dell'assorbanza A, asse x concentrazione aflatossine μg aflatossine/Kg nocciole

In tabella 4.3.1 sono riportate le concentrazioni medie di aflatossine per i diversi campioni espresse in μg aflatossina/Kgnocciole e i periodi di durata delle prove respirometriche e la quantità di CO_2 .

Tabella 4.3.1 Concentrazione media di aflatossine (μg Aflatossine/Kg di nocciole), periodo di durata delle prove respirometriche (Giorni) e la quantità di CO_2 mg

	μg Aflatossine/Kg di nocciole	Durata prova respirometrica (giorni)	CO_2 Cumulata (mg)
Cimiciate intere	0,064	30	2550
Cimiciate rotte	0,15	30	2963
Nocciole sane	0,45	54	1863
Nocciole sane doppiolayer (campione1)	0,71	69	4791
Nocciole sane doppiolayer (campione 3)	0,38	69	2851
Nocciole sane multilayer (campione 2)	0,45	69	2434
Nocciole sane multilayer (campione 4)	0,41	69	3440

Dalla tabella 4.3.1 si evince che il quantitativo di aflatossine è inferiore ai limiti normativi per tutti i campioni (*Regolamento della Commissione Europea No 165/2010* ha fissato i limiti per le nocciole destinate al consumo a 10µg/Kg per le aflatossine totali (FB1, AFB2, AFG1, AFG2) e a 10 µg/Kg per l'aflatossina AFB1).

Le nocciole cimiciate rotte che hanno respirato (valore di CO₂ pari a 2963mg) di più rispetto alle nocciole cimiciate intere (valore di CO₂ pari a 2550mg) hanno un quantitativo di aflatossine maggiore pari a 0,15 µgAflatossine/Kg di nocciole, mentre le nocciole cimiciate intere un valore di aflatossine pari a 0,064 µgAflatossine/Kg di nocciole; le nocciole sane hanno un quantitativo di aflatossine pari a 0,45 µgAflatossine/Kg di nocciole. Le nocciole del doppiolayer (campione 1) presentano il valore più elevato di CO₂ pari a 4791mg tra tutti i campioni doppiolayer e multilayer e anche il valore più elevato di aflatossine pari a 0,71 µgAflatossine/Kg di nocciole.

5 Valutazione dei rischi

La contaminazione con aflatossine è un problema di *food-safety* e il *Regolamento della Commissione Europea No 165/2010* ha fissato i limiti per le nocciole destinate al consumo a 10µg/Kg per le aflatossine totali (FB1, AFB2, AFG1, AFG2) e a 10 µg/Kg per l'aflatossina AFB1.

I rischi derivanti dalle micotossine dipendono non solo dal pericolo ma anche dall'esposizione che è diversa nei vari paesi del mondo; le cause della diversa esposizione si riconducono ai diversi livelli di contaminazione e di abitudini alimentari ragioni per cui il JEFCA (Comitato congiunto di esperti FAO/OMS sugli additivi alimentari) ha stabilito i tenori tollerabili di assunzione giornaliera di micotossine TDI (Tolerable, Daily Intake), tabella 5.1.

Tabella 5.1 Valori TDI delle aflatossine ed effetti tossici

Micotossina	TDI	Effetti tossici
Aflatossina	ALARA	Epatiti, nefriti, carcinogenesi
Ocratossina A	120ng/Kgpc/sett	nefriti
Patulina	400ng/Kg pc/giorno	Epatiti, carcinogenesi
Zearalenone	200ng/Kg pc/giorno	ipofertilità
Deossinivalenolo	1000ng/Kgpc/giorno	vomito
Fumonisine	2000 ng/Kg pc/giorno	epatiti

Uno studio sulla contaminazione da aflatossine su nocciole turche [5] ha dimostrato che la crescita di specie fungine aflatossigene e il conseguente rischio potenziale di produzione di aflatossine avviene sia in fase di raccolta che in fase di post raccolta durante gli step di essiccazione, cernita, stoccaggio, confezionamento, trasporto. Pertanto, risulta indispensabile lo sviluppo di uno strumento di valutazione de rischi in modo da estendere il controllo della sicurezza alimentare all'intera supply chain del prodotto alimentare; in questo modo si garantisce la qualità dell'alimento, la sicurezza del consumatore e si evitano perdite economiche.

5.1 Descrizione della metodologia.

La fase preliminare è la mappatura dell'intera filiera alimentare suddividendola in 4 step generali, figura 5.1.1.



Figura 5.1.1 Step generali della filiera alimentare

Lo step relativo all'Industria di lavorazione è suddiviso in 5 macroprocessi, figura 5.1.2.

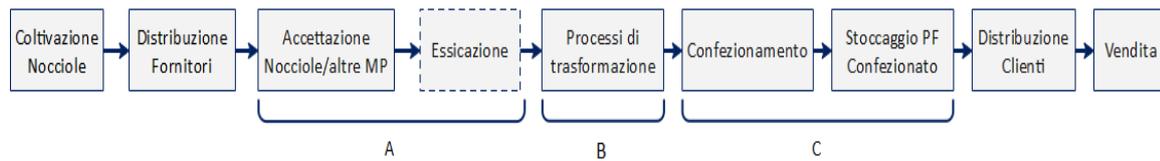


Figura 5.1.2 I cinque macroprocessi dell'Industria di lavorazione

Le materie prime arrivano allo stabilimento nella fase di Accettazione, dove, a seconda dell'umidità in ingresso delle nocciole si procede con il processo di essiccazione. La fase di accettazione ed essiccazione può essere considerata un singolo nodo A, in quanto a prescindere dalla tipologia di prodotto (nociola sgusciata, tostata, nociola in granella) si deve procedere per queste due fasi; il processo di trasformazione rappresenta il secondo nodo B ed esso varia a seconda del prodotto che si vuole ottenere: ad esempio il nodo B può essere la sgusciatura se si vuole la nociola sgusciata, oppure la tostatura, oppure la granellatura se si vuole ottenere le granelle di nocciole; infine, si ha il nodo C rappresentato dalle due fasi di confezionamento e stoccaggio.

In questo lavoro di tesi la valutazione delle aflatoossine è stata eseguita sulle nocciole sgusciate pertanto, sono stati analizzati il nodo B (sgusciatura) e C.

La suddivisione della filiera alimentare in nodi o sottosistemi permette di conoscere ciò che accade in ogni fase, di anticipare e correggere eventuali anomalie nel processo e di garantire la tracciabilità del prodotto; per ciascun nodo la probabilità di contaminazione da micotossine è stata valutata con il metodo dell'albero degli eventi ETA.

Prima di applicare l'albero degli eventi è stato necessario identificare i pericoli tramite l'utilizzo di una matrice di potenziali pericoli; nella matrice vengono considerati i fattori che contribuiscono alla contaminazione dell'alimento; per la realizzazione della matrice è stata fondamentale la ricerca di dati in letteratura [24], i dati storici sulle malattie di origine alimentare [25] e il confronto con esperti. La matrice dei pericoli è riportata in figura 5.1.3.

HAZARD MATRIX AND CONTRIBUTING FACTORS ALONG THE SUPPLY CHAIN										
SC	Situations likely to contribute to product contamination	Mycotoxin	Salmonella	Bacteria/ Molds	Insects	Pesticides	Chemical substances	Allergens	Acrylamide	Foreign bodies
Raw product Pre-processing	Organic manure		▲	●						
	Soil	●	●	●	▲		●			■
	Irrigation water		●	●			●			
	Rain water	■		●	▲					
	Air			●	●		●			
	Nearby crops				●	●	●	●		
	Treatments					●	●			
Processing/preparation Food processing plant	Improper moisture adjustment (drying)	■	▲	●						
	Contamination by worker		●	●						●
	Cleaning of equipment		▲	●				●		●
	Heat processes								■	
	Manipulation during process		▲	●						●
	Room-temperature holding	■		●						
	Prolonged storage	▲		●	●					
	Contamination from other ingredients	●						●		●
	Equipment failure						●			●
	Cleaning of environment		●	●	▲					
	Contamination by packaging									●
Means of transport			●	●					●	
Post-processing	Prolonged storage	●	●	●	●		●	●	●	●
	Contamination by worker	●	●	●	●		●	●	●	●
	Contamination by other vectors	●	●	●	●		●	●	●	●
	Cleaning of environment	●	●	●	●		●	●	●	●
	Contamination by packaging	●	●	●	●		●	●	●	●
	Means of transport	●	●	●	●		●	●	●	●

Figura 5.1.3 Matrice dei pericoli

I vari fattori che contribuiscono alla contaminazione sono classificati con un indice che rappresenta la potenza con cui possono contaminare l'alimento, tabella 5.1.1 [24].

Tabella 5.1.1 Classificazione dei fattori che contribuiscono alla contaminazione

Fattore	Simbolo	Indice
Principale fattore contributivo	■	4
Fattore contributivo	▲	3
Potenziale	●	2
Probabilmente distrutto nei processi futuri	-	1

I fattori che contribuiscono alla contaminazione sono valutati in ciascun nodo della filiera, in questo studio ci si è focalizzati sulle micotossine come fattori contribuenti; in particolare nel nodo B e C sono stati assegnati degli indici alle micotossine nelle situazioni che contribuiscono alla contaminazione; per ciascun nodo sono stati calcolati gli indici cumulativi e assegnati a questi la probabilità di accadimento [26], tabella 5.1.2, tabella 5.1.3

Tabella 5.1.2 tabella indici cumulativi e probabilità

Situazioni che contribuiscono alla contaminazione	Micotossine Nodo B	Micotossine Nodo C
Regolazione dell'umidità (Essiccazione)	-	-
Contaminazione dal personale	-	-
Pulizia/manutenzione delle apparecchiature	-	-
Processo termico	-	-
Manipolazione durante il processo	-	-
Mantenimento della temperatura dell'ambiente	-	-
Stoccaggio prolungato	▲	▲
Contaminazione da altre materie prime/ingredienti	●	-
Malfunzionamento apparecchiature	-	-
Pulizia insufficiente degli ambienti	-	-
Contaminazione da packaging	-	-

Impiego di mezzi di trasporto non adatti	-	-
Indice Cumulativo	5	3
Probabilità	0,0005	0,0001

Tabella 5.1.3 Indice cumulativo associato alla probabilità cumulata

Indice cumulativo	Probabilità
≤ 4	1 x 10 ⁻⁴
5 – 8	5 x 10 ⁻⁴
9 – 12	5 x 10 ⁻⁴
13 – 16	5 x 10 ⁻²
≥ 17	1 x 10 ⁻¹

Dopo aver calcolato la probabilità di micotossine per i singoli nodi B e C è stato costruito l'albero degli eventi ETA al fine di stimare la probabilità complessiva di micotossine.

L'albero degli eventi è un metodo grafico di logica induttiva in cui si rappresentano le sequenze di eventi che possono verificarsi come conseguenza di un evento iniziatore, punto di partenza dell'albero. Nell'albero degli eventi la propagazione degli eventi avviene attraverso una serie di fasi (nodi) della filiera alimentare, in questo caso, confezionamento più stoccaggio, ciò dà origine a una ramificazione dell'albero; in ogni fase il ramo superiore soddisfa una determinata condizione, ovvero la contaminazione da micotossine, il ramo inferiore non soddisfa tale condizione; ad ogni ramo di ogni singola fase viene assegnata probabilità di accadimento dell'evento basate sull'opinione degli esperti, sulla bibliografia, sulle banche dati; poi si calcola la probabilità di contaminazione cumulata per tutti i rami superiori e per tutti i rami inferiori; successivamente tutte le probabilità cumulate per i rami superiori e inferiori si sommano per ottenere la probabilità di contaminazione cumulata lungo tutto il processo di confezionamento e stoccaggio, figura 5.1.4

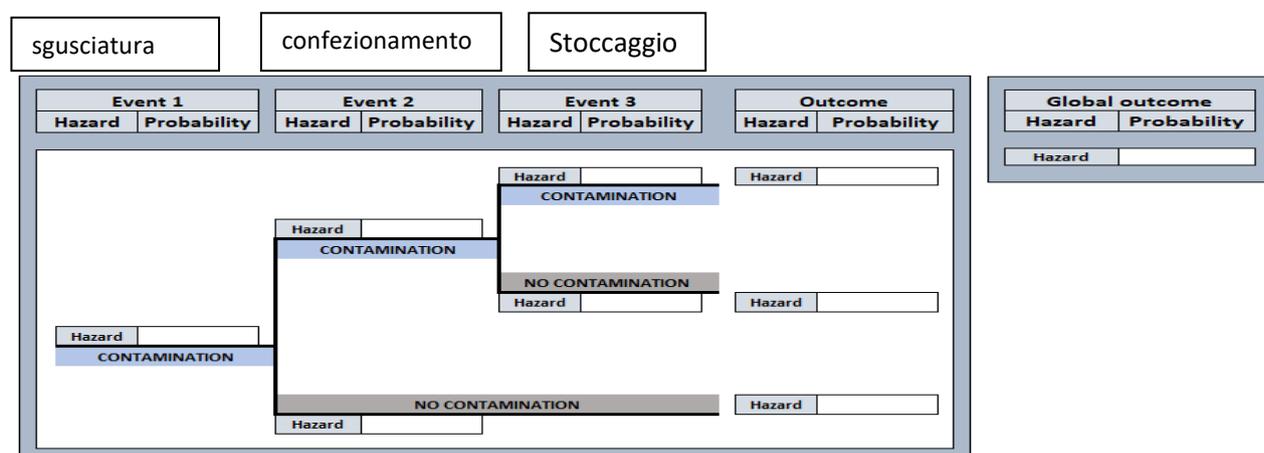


Figura 5.1.4 Albero degli eventi per le nocciole

Infine, dopo aver calcolato la probabilità di contaminazione cumulata per tutto il processo, si associa un indice come già descritto in tabella 5.1.3. Successivamente, l'indice di gravità per la conseguenza (in questo caso contaminazione da aflatossine) viene assegnato, considerando i valori elencati nella Tabella 5.1.4.

Tabella 5.1.4 tabella degli indici delle conseguenze

Indice di gravità	Categoria	Descrizione delle conseguenze
0	Nessuno	Nessun effetto
1	Molto basso	Sentirsi male per alcuni giorni
2	Basso	Malattia diarroica
3	Medio	Ospedalizzazione
4	Alto	Sequela croniche

Infine, dalla combinazione di probabilità e gravità utilizzando la matrice di analisi del rischio viene effettuata la valutazione del rischio per determinare la tollerabilità del rischio., figura 5.1.5.

Likelihood (Probability Index)	Severity index of consequences			
	1 Very low	2 Low	3 Medium	4 High
1 Rare	1 Low	2 Low	3 Low	4 Low
2 Unlikely	2 Low	4 Low	6 Moderate	8 Moderate
3 Possible	3 Low	6 Moderate	9 Moderate	12 High
4 Likely	4 Low	8 Moderate	12 High	16 High
5 Almost certain	5 Moderate	10 High	15 High	20 High

Figura 5.1.5 Matrice analisi dei rischi

5.2 Risultati valutazione dei rischi

Attraverso l'Albero degli eventi è stata calcolata la probabilità di contaminazione cumulativa P pari a 0,0164 e ad essa è stata assegnato un indice pari a 3, secondo quanto indicato in tabella 5.2.1 [26].

Tabella 5.2.1 Tabella indice di probabilità cumulativa

Indice di probabilità	Rango di probabilità	Probabilità media	Probabilità limite
1	$<10^{-4}$ tranne 0	0,0001	0,0001
2	10^{-3} - 10^{-4}	0,0005	0,001
3	10^{-2} - 10^{-3}	0,005	0,01
4	10^{-1} - 10^{-2}	0,05	0,1
5	$>10^{-1}$	0,1	$>0,1$

L'indice di rischio è stato calcolato con la formula (5.1)

$$R = P * C \quad (5.1)$$

R= Indice di Rischio

P= Probabilità di contaminazione cumulativa

C= Conseguenza

Alla conseguenza, ovvero la contaminazione da micotossine, è stato associato un indice di gravità pari a 4, come indicato in tabella 5.1.4.

Il rischio calcolato R è pari a 12, quindi ci si trova nella zona rossa della matrice dei rischi, ovvero Rischio Alto, pertanto, sono necessarie misure di mitigazione per abbassare il livello di rischio.

Conclusioni

L'albero degli eventi è un metodo di analisi logico induttivo applicato alle nocciole sgusciate nel nodo C (confezionamento più stoccaggio) ed ha rivelato un rischio alto nella contaminazione da micotossine; del resto, come già accennato nell' Introduzione dal 2016 ad oggi il CREA DC insieme a SAGEA_Centro di Saggio ha organizzato una campagna di monitoraggio per il fenomeno della "nociola avariata"[3]. Questo progetto, condiviso anche dalla divisione Hazelnut Company del gruppo Ferrero, ha condotto delle analisi su tutte le difettosità della nocciola in tutte le fasi dal raccolto fino al post-raccolta in aziende corilicole campione sia campane che piemontesi. In particolare, durante la stagione 2020, dalle analisi eseguite sulle nocciole piemontesi sgusciate, si registra la presenza di specie fungine aflatossigene; nello specifico in laboratorio sono stati isolati funghi appartenenti al genere *Penicillium*, *Aspergillus* e la specie *Trichothecium roseum* [3].

In questo lavoro di tesi il metodo è stato sviluppato per una parte della supply chain delle nocciole, ovvero, confezionamento e stoccaggio partendo dalla sgusciatura come evento iniziatore; l'adattabilità e replicabilità del metodo consentono di poter estendere l'analisi anche agli altri nodi della filiera delle nocciole (tostatura, granellatura) individuando così tra questi quelli con rischio più alto. Inoltre, un altro sviluppo futuro può essere l'integrazione della valutazione del rischio sull'intera supply chain con il calcolo dei KPI (Key Performance Indicators) i cui valori consentono di monitorare le prestazioni dei processi industriali, e di conseguenza di implementare azioni correttive per migliorare le condizioni di sicurezza.

Nel caso specifico della sgusciatura e stoccaggio i relativi KPI da monitorare sono sicuramente temperatura e umidità; infatti, le nocciole devono essere stoccate a una temperatura pari a 5° C e un'umidità relativa pari al 50% [8]; questo per evitare lo sviluppo di specie fungine aflatossigene che rappresentano un potenziale rischio di produzione di micotossine in condizioni climatiche favorevoli come descritte in tabella 2.4.

Per quanto riguarda il fattore umidità, in questo lavoro di tesi è stato dimostrato che nei microcosmi con una maggiore umidità si ha una maggiore attività respirometrica della biomassa a parità di temperatura (T ambiente); infatti sono state monitorate le attività respirometriche di:

- 35g nocciole cimiciate intere e 35g nocciole cimiciate rotte poste all'interno di microcosmi saturati al 40% di umidità relativa (la saturazione è stata raggiunta introducendo 20 ml di acqua distillata sul fondo del vaso) (T ambiente)
- 35g nocciole cimiciate rotte e 35g nocciole cimiciate intere poste all'interno di microcosmi non saturati al 40% ma, in questo le superfici delle nocciole sono state nebulizzate con 1 ml di acqua distillata

Le nocciole cimiciate rotte e intere saturate al 40% di umidità hanno mostrato una maggior attività respirometrica, figura 6.1.

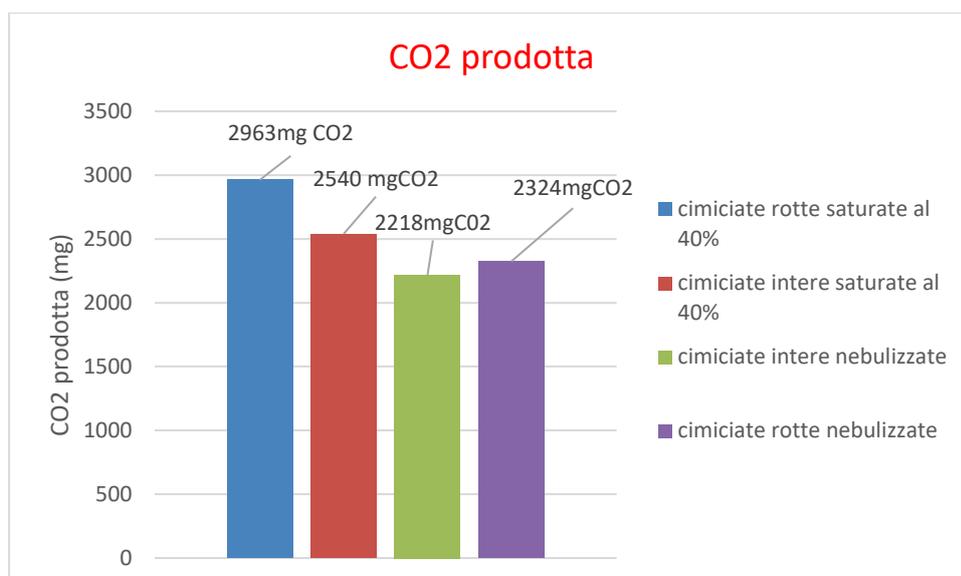


Figura 6.1 Valori cumulati di CO₂

Un altro parametro importante da monitorare durante lo stoccaggio è la CO₂.

Infatti, la crescita di specie fungine sulle nocciole è stata monitorata misurando (tramite titolazione) il quantitativo di CO₂ (prodotto di respirazione); al termine delle prove respirometriche sono stati eseguiti i test Elisa che hanno rilevato la presenza di aflatossine, Tabella 6.1

Tabella 6.1 Livelli di aflatossine nelle nocciole (μg Aflatossine/Kg di nocciole), CO₂ (mg) cumulata e durata della prova (giorni)

	μg Aflatossine/Kg di nocciole	Durata prova respirometrica (giorni)	CO ₂ Cumulata (mg)
Cimiciate intere	0,064	30	2550
Cimiciate rotte	0,15	30	2963
Nocciole sane	0,45	54	1863
Nocciole sane doppiolayer (campione 1)	0,71	69	4791
Nocciole sane doppiolayer (campione 3)	0,38	69	2851
Nocciole sane multilayer (campione 2)	0,45	69	2434
Nocciolesane multilayer (campione 4)	0,41	69	3440

Dalla tabella 6.1 si evince che il campione 1 doppiolayer ha il quantitativo di aflatossine totali rilevato più alto pari a 0,71 (μg Aflatossine/Kg di nocciole) e anche il valore di CO₂ cumulato più elevato pari a 4791mg; questo valore è comunque inferiore ,ai limiti normativi (*Regolamento della Commissione Europea No 165/2010* ha fissato i limiti per le nocciole destinate al consumo a 10 μg /Kg per le aflatossine totali (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) e a 10 μg /Kg per l'aflatossina AFB₁).

Anche se il quantitativo di micotossine per tutti i campioni analizzati è inferiore ai limiti normativi, si è riusciti a dimostrare sperimentalmente che su tutti i campioni, con diversi valori di CO₂ cumulata, tabella 6.1, si rilevano micotossine.

Lo scopo della tesi è stato convalidato e quindi la CO₂ può essere considerata un early warning in quanto indice di un potenziale rischio da contaminazione.

Il sistema di monitoraggio di CO₂ utilizzato nel lavoro di tesi è stato discontinuo, in quanto ogni volta che si eseguiva la titolazione occorreva aprire il microcosmo, estrarre la provetta con la soluzione di NaOH più CO₂, titolare la soluzione e poi aggiungere nella provetta da riporre nel microcosmo una soluzione fresca di NaOH. Alla luce di ciò è opportuno sviluppare un sistema di monitoraggio continuo di CO₂ integrando l'utilizzo di sensori.

Riferimenti Bibliografici

- [1] Ministero delle politiche agricole, alimentari e forestali- Allegato tecnico ‘Piano del settore corilicolo’ - <https://www.politicheagricole.it>
- [2] Berra L., Latino G., 2022, La tutela della nocciola di qualità: criticità produttive e avversità naturali- <https://quaderniagricoltura.regione.piemonte.it>
- [3] Vitale S., Petrucci M., 2021, Problematiche legate ad alcune difettosità riscontrate nelle nocciole piemontesi nel 2020- <https://nocciolare.it>
- [4] Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale del Piemonte- Rapporto Attività 2013-Micotossine- <https://www.arpa.piemonte.it>
- [5] Seyhan F., Pembeci C., 2008, Factors influencing fungal and aflatoxins levels in Turkish hazelnuts (*Corylus avellana* L.) during growth, harvest, drying and storage: a 3-year study.
- [6] Food and Drug Administration (FDA Washington DC, Qualified Health Claims: Letter of Enforcement Discretion-Nuts and Coronary Disease-
- [7] Commission Regulation (EU) No 165/2010, Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins
- [8] Corte M., Sonnati C., 2010, La coltivazione nel nocciolo in Alta langa
- [9] ERSA Servizio fitosanitario e chimico, ricerca, sperimentazione e assistenza tecnica, Bilancio fitosanitario 2021 del nocciolo, <http://difesafitosanitaria.ersa.fvg.it/difesa-e-produzione-integrata/difesa-integrata-obbligatoria/bollettini-fitosanitari/nocciolo/bollettini-produzione-integrata-e-biologica-del-nocciolo-2021>
- [10] Tavella L., Gianetti G., 2006, Le principali avversità del nocciolo in Piemonte, Atti del Convegno “Le avversità del nocciolo in Italia”, Petria 16 (1): 45-58
- [11] Belisario A., Santori A., Approfondimenti sulla eziologia ed epidemiologia della necrosi grigia della nocciola, C.R.A. Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale.
- [12] Daou R., Joubrane K., Maroun R., Khabbaz L., Ismail A., El Khoury A., 2021, Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies, AIMS Agriculture and Food, 6(1):416-447, [DOI: 10.3934/agrfood.2021025]
- [13] Piro R., Biancardi A., Micotossine, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia-Romagna ‘B. Ubertini’
- [14] Sautour M., Mansur Soares C., Divies C., Bensoussan M., Dantigny P., 2002, Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (2002) 28, 311–315 [DOI: 10.1038/sj/jim/7000248]
- [15] Laboratório de Toxicologia, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá <http://www.uem.br/acta>

- [16] Keskin Seba Z., Gursoy N., 2019, Investigation of Natural Mycoflora and Aflatoxin Formation in Hazelnuts and Products, Cumhuriyet Sci. J., Vol.40-4 (2019) 967-977.
- [17] Prella A., Spadaro D. Garibaldi A., Gullino M., 2012, Aflatoxin monitoring in Italian hazelnut products by LC-MS, Centre of Competence for the Innovation in the Agro-environmental Sector (AGROINNOVA), University of Turin, Grugliasco, TO, Italy.
- [18] Wacoo A., Vuzi P., Wendi D., Hawumba J., 2014, Methods for detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops, Journal of Applied Chemistry, [DOI:10.1155/2014/706291]
- [19] Wolf K., Schweigert F., Mycotoxins Analysis: a focus on rapid methods, Institute of Nutrition Science, University of Potsdam
- [20] Valentini N., Zeppa G., Rolle L., 2003, Applicazione della colorimetria, della ‘Texture Analysis’ e dell’analisi sensoriale nella caratterizzazione delle nocciole italiane.
- [21] Bonisoli E., Delprete C., Sesana R., Tamburro A., Tornincasa S., 2014, Testing and simulation of the three point bending anisotropic behaviour of hazelnut shells, Biosystems Engineering 129 (2015) 134-141
- [22] Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, *Decreto 23 Febbraio 2004*, Approvazione dei metodi ufficiali di analisi biochimica del suolo-Determinazione della Respirazione del Suolo.
- [23] Brown S., Trivieri L., 2013, *The Acid-Alkaline Food Guide*
- [24] OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità), 2008. Focolai di malattie di origine alimentare: linee guida per l'indagine e il controllo. Ginevra: Organizzazione Mondiale della Sanità.
- [25] EFSA ed EDC (Autorità Europea per la sicurezza alimentare e Centro Europeo per la prevenzione
- [26] FAO & OMS (Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura/Organizzazione Mondiale della Sanità), 2009. Caratterizzazione del rischio dei pericoli microbiologici negli alimenti: linee guida. Serie di valutazione del rischio microbiologico n. 17. Roma: FAO e OMS