

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

**Monitoraggio della contaminazione
microbica delle nocciole correlata alla
produzione di micotossine**



Relatori

prof.ssa Francesca Bosco

prof.ssa Micaela Demichela

Candidato

Silvia Dall'Omo

Marzo 2024

Indice

1	Sommario	5
2	Introduzione.....	8
2.1	<i>Caratteristiche della nocciola.....</i>	8
2.1.1	<i>Aspetti nutrizionali</i>	8
2.1.2	<i>Aspetti organolettici</i>	9
2.2	<i>Processo produttivo</i>	10
2.3	<i>Micotossine</i>	10
2.3.1	<i>Cenni sulla struttura chimica.....</i>	13
2.3.2	<i>Specie fungine produttrici di micotossine</i>	14
2.3.3	<i>La pericolosità delle micotossine</i>	19
2.3.4	<i>Prevenzione della formazione di micotossine</i>	20
2.3.5	<i>Detossificazione e decontaminazione.....</i>	26
2.3.6	<i>Metodi analitici per la determinazione della contaminazione</i>	28
2.3.7	<i>Limiti legislativi</i>	30
2.4	<i>Scopo della tesi</i>	32
3	Materiali e metodi	33
3.1	<i>Nocciole</i>	33
3.2	<i>Caratterizzazione morfologica.....</i>	34
3.3	<i>Caratterizzazione chimico-fisica</i>	35
3.3.1	<i>Valutazione del pH.....</i>	35
3.3.2	<i>Valutazione del contenuto di umidità percentuale</i>	35
3.4	<i>Caratterizzazione microbiologica.....</i>	35
3.5	<i>Allestimento dei microcosmi</i>	37
3.6	<i>Analisi respirometriche.....</i>	38
3.6.1	<i>Valutazione della CO₂ prodotta all'interno del microcosmo.....</i>	38
3.6.2	<i>Valutazione dell'RO₂.....</i>	39
3.7	<i>Valutazione delle micotossine</i>	41
3.7.1	<i>Preparazione del campione.....</i>	41
3.7.2	<i>Determinazione delle aflatossine</i>	42
3.8	<i>Descrizione delle prove realizzate</i>	43
4	Risultati e discussione	45
4.1	<i>Caratterizzazione morfologica, chimico-fisica e microbiologica delle nocciole....</i>	45
4.1.1	<i>Caratterizzazione morfologica.....</i>	45
4.1.2	<i>Caratterizzazione chimico-fisica: determinazione di pH e contenuto di umidità</i>	47
4.1.3	<i>Caratterizzazione microbiologica</i>	47
4.2	<i>Prima prova sperimentale.....</i>	49
4.2.1	<i>Analisi quantitativa della CO₂ prodotta.....</i>	49
4.2.2	<i>Evoluzione della biomassa nel tempo</i>	52

4.3	<i>Seconda prova sperimentale</i>	54
4.3.1	<i>Analisi quantitativa della CO₂ prodotta</i>	54
4.3.2	<i>Analisi quantitativa della velocità specifica di consumo dell'O₂ (RO₂)</i>	55
4.3.3	<i>Evoluzione della biomassa nel tempo</i>	57
4.4	<i>Terza prova sperimentale</i>	58
4.4.1	<i>Analisi quantitativa della CO₂ prodotta</i>	58
4.4.2	<i>Analisi quantitativa della velocità specifica di consumo dell'O₂ (RO₂)</i>	61
4.4.3	<i>Evoluzione della biomassa nel tempo</i>	63
4.5	<i>Confronto quantitativi di CO₂ prodotta - Prima, seconda e terza prova</i>	65
4.6	<i>Confronto della velocità specifica di consumo dell'O₂ (RO₂) - Seconda e terza prova</i> 68	
4.7	<i>Confronto tra O₂ consumato e CO₂ prodotta - Seconda e terza prova</i>	70
4.8	<i>Confronto visualizzazione biomassa - Prima, seconda e terza prova</i>	71
4.9	<i>Determinazione delle aflatossine totali</i>	72
4.9.1	<i>Confronto tra la quantità di CO₂, O₂ e le aflatossine prodotte</i>	75
5	Conclusioni	78
	Bibliografia	79

1 Sommario

La produzione di nocciole rappresenta uno dei più importanti settori nell'ambito della frutta a guscio. Questi prodotti non vengono solamente consumati tal quali ma sono la materia prima da cui si ottengono prodotti secondari di pasticceria e dell'industria dolciaria in generale.

Nel linguaggio comune, con il termine “nociola”, si intende la parte del frutto che viene abitualmente consumata. In realtà la nociola, in quanto frutto della pianta del nocciolo, *Corylus avellana*, è costituita da due parti: un guscio che contribuisce a circa il 50-60% del totale e un seme per il restante 50-40%. Quindi, ciò che viene consumato è il seme della nociola e non la nociola nella sua interezza [1]. Tuttavia, per chiarezza, nella seguente trattazione, ci si riferirà al seme del frutto con il termine “nociola” comunemente utilizzato.

Secondo i dati relativi all'anno 2022, i principali paesi coinvolti nella filiera corilicola, sono la Turchia, che detiene il primato produttivo ricoprendo circa il 64% della produzione mondiale, e l'Italia che soddisfa circa l'8% della richiesta globale. Altri paesi produttori sono: l'Azerbaijan (6%), gli Stati Uniti (6%) e il Cile (5%). Spagna, Francia e Cina contribuiscono alla produzione in percentuali molto ridotte, inferiori al 2%. Tuttavia, si ipotizza che entro il 2025 il Cile possa diventare il terzo produttore a livello mondiale [2] [3]. Nella seguente **Tabella 1.1** sono presentati in ordine decrescente i quantitativi (ton) di nocciole prodotte dai paesi sopra indicati come principali produttori mondiali.

Tabella 1.1: tonnellate di nocciole prodotte nei principali paesi citati – Dati tratti da [3]

Quantità	Turchia	Italia	Azerbaijan	Stati Uniti	Cile	Cina	Francia	Spagna
Ton	765000	98670	72105	70310	62557	24696	9960	8040

Tra i motivi per i quali le nocciole turche e italiane sono quelle più richieste vi è il fatto che esse hanno un maggior grado di sfericità. Questa è infatti una caratteristica che denota la più elevata qualità della nociola. Una maggiore sfericità comporta migliori caratteristiche dal punto di vista della croccantezza e un più semplice svolgimento dello stadio di tostatura. Tuttavia, a seconda del tipo di prodotto che si vuole ottenere, le richieste legate alla sfericità sono più o meno stringenti. Ad esempio, nel caso in cui una nociola rappresenti la materia prima per un prodotto secondario quale una crema, non è fondamentale questo aspetto [2].

Il crescente interesse nei confronti di tale frutto è dovuto alle sue caratteristiche nutrizionali che consentono di definirlo un *alimento funzionale*, ovvero un alimento in grado di apportare benefici alla salute umana grazie alla presenza di sostanze come tocoferoli e steroli. I tocoferoli, in particolare, proteggono le cellule dallo stress ossidativo e dai radicali liberi. Allo stesso tempo, gli steroli contribuiscono al mantenimento dei livelli di colesterolo entro i limiti salutarì [2].

Inoltre, le condizioni climatiche della regione in cui cresce il nocciolo hanno una forte influenza sulla composizione chimica del frutto. Nel dettaglio si fa riferimento al contenuto di olio e acidi grassi. Si è osservato come, in Spagna, in presenza di temperature più alte ci sia un maggior contenuto di olio (circa il 67%); al contrario in Turchia, dove il clima è più umido e piovoso, si osserva una concentrazione di olio minore (circa il 60%). Tuttavia, uno studio condotto in Italia ha restituito risultati diversi permettendo di individuare che, in presenza di temperature più basse, si ha un quantitativo di olio nella

nocciola superiore del 3-5% rispetto a quello presente in nocciole cresciute in un ambiente più caldo [2].

Per quanto riguarda gli acidi grassi, quello principalmente presente è l'acido oleico (circa 84% per le nocciole italiane e circa 76% per quelle turche) seguito dal linoleico (circa 8% nelle nocciole italiane e circa 15% nelle turche). Il rapporto tra acido oleico (monoinsaturo) e linoleico (polinsaturo) rappresenta un importante parametro per stimare la qualità del frutto: un rapporto elevato è direttamente correlato a una maggiore stabilità ossidativa e di conseguenza a una prolungata *shelf life* [2]. Gli acidi grassi insaturi sono caratterizzati da doppi legami, in prossimità dei quali sono presenti dei ripiegamenti della molecola. All'aumentare del numero d'insaturazioni si riduce la stabilità della molecola.

Inoltre, si è individuato che, in nocciole cresciute in regioni più fredde, il contenuto di acidi grassi insaturi è superiore a quello delle nocciole sviluppatesi in regioni calde e secche. È anche chiaro che le condizioni e il tempo di stoccaggio e lo stadio di crescita in cui si trova il frutto influenzano le tipologie di acidi grassi. Infatti, spesso durante lo stoccaggio, la quantità di acidi grassi saturi tende ad aumentare, a discapito di quelli insaturi che invece tendono a diminuire. In aggiunta, diversi studi hanno permesso di concludere che, in zone in cui il clima è caratterizzato da temperature più basse, si ha un maggiore contenuto di acidi grassi insaturi [2].

Durante tutto il processo produttivo di un prodotto alimentare di origine vegetale, quale ad esempio la frutta secca, è possibile che si verifichino delle contaminazioni dovute a funghi naturalmente presenti sulla superficie esterna dell'alimento. Essi, nel caso in cui siano funghi aflatossigeni, possono dare luogo alla formazione di micotossine, sostanze dannose per la salute umana. Gli alimenti maggiormente soggetti allo sviluppo di micotossine sono: cereali (mais), spezie, frutta secca (fichi) e frutta a guscio (nocciole, pistacchi, mandorle, noci, anacardi, etc.). Il motivo principale per cui la diffusione delle micotossine nelle matrici alimentari è così vasta, è legato al fatto che i funghi aflatossigeni riescono a crescere e a riprodursi in diverse condizioni ambientali. In tutto il mondo, infatti, sono presenti specie fungine in grado di adattarsi a condizioni ambientali variegata in termini di temperatura, compresa tra 5°C e 35°C, e umidità, compresa tra 80% e 95%. Pertanto, si osserva che, a seconda della zona e a seconda del tipo di alimento, si ha sviluppo di funghi diversi. Al momento si è a conoscenza di più di 300 tipologie di micotossine, diverse tra loro chimicamente e biologicamente per l'effetto che provocano sugli organismi con cui entrano in contatto. Tuttavia, solamente alcune tra queste (ex. aflatossine e ocratossine) sono effettivamente pericolose se presenti su alimenti [4].

Sebbene la diffusione di queste sostanze tossiche sia ubiquitaria, i loro effetti dannosi risultano letali soprattutto in quei paesi sottosviluppati in cui non sono applicati i giusti metodi di monitoraggio, rilevamento e decontaminazione. Nel resto del mondo, infatti, si è ormai arrivati a conoscenza delle migliori strategie adatte ad evitare la diffusione delle micotossine. In ogni Stato, sono presenti Organi deputati al controllo delle contaminazioni alimentari con l'obiettivo di preservare la salute del consumatore ma allo stesso tempo evitare il più possibile ingenti danni economici dati dalla presenza di cibo contaminato. Qualsiasi alimento contaminato, se non trattabile con l'obiettivo di ridurre il grado di contaminazione, viene eliminato [4].

A seconda del tipo di prodotto alimentare, enti regolatori come l'EFSA - European Food Safety Authority - (Europa) e l'FDA - Food and Drug Administration - (Stati Uniti d'America) stabiliscono dei limiti massimi di contaminazione entro i quali l'alimento non è ritenuto dannoso per la salute. In quest'ottica si pone l'attività sperimentale svolta nel presente lavoro di tesi avente l'obiettivo di analizzare e monitorare, tramite la tecnica

analitica della titolazione acido-base e tramite l'utilizzo del Respirometric Sensor (VELP Scientifica), lo sviluppo di biomassa fungina sulla superficie di nocciole e, infine, correlare la crescita microbica alla formazione di micotossine. In questo modo, diventa possibile confrontare i valori delle micotossine ottenuti sperimentalmente con quelli massimi stabiliti dalla legislazione.

La tesi è organizzata con una prima parte, in cui sono descritte nel dettaglio le caratteristiche delle nocciole dal punto di vista nutrizionale e organolettico e il processo produttivo che porta all'ottenimento della nocciola vendibile sul mercato e consumabile. In seguito, ci si focalizza sulle micotossine e, dopo un breve accenno sulla loro struttura chimica, si esaminano più nel dettaglio le specie fungine coinvolte e le condizioni favorevoli al loro sviluppo. Esposta la pericolosità legata alla presenza di tali sostanze, sono analizzati alcuni possibili metodi di decontaminazione e detossificazione. Infine, si descrivono alcune tecniche utilizzate per la quantificazione del grado di contaminazione e si correla il tutto ai limiti legislativi attualmente vigenti nell'Unione Europea e negli Stati Uniti d'America.

Nella seconda parte della tesi sono esposti i materiali e i metodi di cui ci si è serviti per la realizzazione delle prove sperimentali.

Infine, nella terza ed ultima parte della tesi si presentano i risultati dell'attività sperimentale svolta. L'elaborato termina con una breve conclusione in cui sono presentate le possibili prospettive future.

2 Introduzione

2.1 Caratteristiche della nocciola

2.1.1 Aspetti nutrizionali

La nocciola è uno dei frutti a guscio che, se consumato, può apportare benefici alla salute. Questo deriva dalla composizione tipica del prodotto che include tutti i macronutrienti ovvero grassi, carboidrati e proteine. Nella seguente tabella (**Tabella 1.2**) sono indicati i quantitativi dei macronutrienti (espressi in g di macronutriente rapportati a 100g di nocciole) rilevati in nocciole di diversa provenienza (Turchia, Italia e Stati Uniti) e il relativo contenuto calorico (kcal).

Tabella 1.2: quantitativi dei macronutrienti in nocciole di diversa provenienza e contenuto calorico – Tratto e modificato da [5].

Macronutrienti	Unità	Turchia	Italia	Stati Uniti
Proteine	g/100g	15,35±0,42	13,70±0,5	14,95±0,16
Grassi	g/100g	61,21±0,99	64,10±0,4	60,75±0,39
Carboidrati	g/100g	17,30±0,48	15,50	16,70
Contenuto calorico	kcal	631	642	628

Si desume che la percentuale di ogni componente rispetto al totale è dipendente dal paese di coltivazione del frutto. Di conseguenza anche il contenuto calorico cambia in relazione alla zona di coltivazione e in generale è compreso tra 628 kcal/100g_{nocciole} e 642 kcal/100g_{nocciole} [5]. Se si considerano i paesi riportati in **Tabella 1.2**, si vede che le nocciole con il maggiore contenuto proteico sono quelle di provenienza turca, mentre quelle italiane risultano essere quelle con il maggiore contenuto di grassi. Le nocciole turche risultano anche quelle con il maggior quantitativo di carboidrati. Considerato il contenuto calorico, si osserva che le nocciole prodotte in Italia presentano il livello massimo pari a 642 kcal. Gli Stati Uniti, invece, presentano valori intermedi sia in termini di contenuto proteico sia in termini di carboidrati. Il contenuto di grassi presente risulta essere inferiore rispetto a quello individuato in nocciole turche e italiane. Di conseguenza, anche il contenuto calorico è minore rispetto a quelle delle altre nocciole presenti in **Tabella 1.2**.

Inoltre, le nocciole costituiscono una importante fonte di minerali essenziali quali magnesio, fosforo, selenio e calcio, e vitamine sia idrosolubili (B1, B2, C) sia liposolubili (A, E, K). Si stima che un consumo giornaliero di 42,5 g di nocciole sia in grado di apportare benefici dal punto di vista delle malattie cardiovascolari e della demineralizzazione ossea. Anche in questo caso i quantitativi di ogni componente variano in relazione al paese di provenienza della nocciola [5]. Si riporta ora una tabella (**Tabella 1.3**) riassuntiva dei principali micronutrienti citati con i corrispondenti quantitativi medi presenti. A differenza di quanto fatto nel caso dei macronutrienti, non è stato possibile mettere in relazione i quantitativi con i paesi di provenienza delle nocciole. Inoltre, i dati riportati non sono valori puntuali ma sono per lo più intervalli.

Tabella 1.3: micronutrienti (minerali e vitamine) - Tratto e modificato da [5].

	Micronutrienti	Unità	Quantità
Minerali	Magnesio	mg/100g	160-225
	Fosforo	mg/100g	290-356
	Calcio	mg/100g	115-193,4
	Selenio	µg/100g	2,4-60
Vitamine	B1	mg/100g	0,42-0,64
	B2	mg/100g	0,10-0,16
	C	mg/100g	5,54-6,30
	A	µg/100g	1
	E	mg/100g	15,02-25,66
	K	µg/100g	14,20

Considerando invece gli amminoacidi, sono presenti sia quelli essenziali sia quelli non essenziali. Anche gli amminoacidi non essenziali sono fondamentali, in particolare arginina, cisteina, glicina e tirosina. Infatti, la distinzione tra essenziali e non essenziali non è relativa all'importanza che questi rivestono ma serve a distinguere quelli che l'organismo è in grado di sintetizzare in autonomia dagli altri che invece vanno assunti tramite una dieta equilibrata. Per questa ragione le nocciole rappresentano un valido aiuto per l'organismo in quanto sono in grado di fornire elementi non sintetizzabili *ex novo* dall'organismo ma fondamentali a garantire il mantenimento di uno stato di buona salute [5].

2.1.2 Aspetti organolettici

Con il termine organolettico si intende quell'insieme di percezioni quali sapore, aroma, odore e colore, che coinvolgono i cinque sensi nel momento in cui un prodotto alimentare viene consumato. Nell'ambito dell'industria alimentare questo aspetto è fondamentale in quanto si desidera che il consumatore sia soddisfatto del prodotto. Nel caso specifico delle nocciole ci si riferisce principalmente al sapore e all'aroma, caratteristiche peculiari dell'alimento grazie alla presenza di specifici componenti.

Il sapore tipico della nocciola è, infatti, garantito dall'unione di zuccheri, acidi organici, amminoacidi liberi, tannini e ulteriori composti aromatici [5]:

- La presenza di **zuccheri** conferisce la dolcezza al prodotto e si stima che il quantitativo totale presente, dato da zuccheri semplici e complessi, sia di 3,58g/100g di nocciole. Gli aspetti che influenzano la tipologia di zuccheri presenti sono legati al clima in cui cresce la pianta.
- Gli **acidi organici** individuati nelle nocciole sono l'acido malico seguito dall'acido citrico e dall'acido ossalico. L'acido malico è quello predominante e conferisce alla nocciola una nota di asprezza e di gusto fruttato. Tuttavia, non è stata ancora individuata in modo preciso l'esatta composizione di acidi organici in termini di quantità relative di ogni componente rispetto al totale degli acidi organici presenti.
- Ugualmente agli acidi organici, anche per gli **amminoacidi** non si hanno informazioni complete e precise. È stato notato che quelli predominanti sono l'arginina e l'acido glutammico. Questi componenti donano sapore amaro e un certo grado di acidità. Inoltre, gli amminoacidi sono fondamentali per garantire il tipico colore della nocciola tendente al marrone e, in seguito a tostatura, sono tra i responsabili dello sviluppo dell'aroma.
- I **tannini** sono ulteriori componenti responsabili della colorazione del prodotto e, nel momento in cui si assapora una nocciola, donano una sensazione di astringenza dovuta all'interazione con le proteine presenti nella saliva.

Per quanto riguarda l'aroma, esso è garantito dalla presenza di numerosi composti volatili che tendono a svilupparsi durante il processo di tostatura (Sezione 2.2). Tra questi

si citano i chetoni, le aldeidi e le pirazine. Il principale composto chetonico responsabile del tipico odore di nocciola tostata è il filbertone (5-metil-(E)-2-epten-4-one). Tale composto è presente anche in nocciole non tostate ma in quantità irrisorie [5].

2.2 *Processo produttivo*

Il processo di lavorazione e produzione che porta all'ottenimento del frutto pronto al consumo è costituito da diversi *step* [6].

Una volta maturo, il frutto si stacca dal nocciolo e si ha la **raccolta** manuale o con apposite macchine. La successiva operazione è l'**essiccazione**, fondamentale al fine di garantire una più lunga conservazione della nocciola. Grazie a questo passaggio, realizzabile sia in modo naturale esponendo le nocciole al sole sia tramite essiccatori che sfruttano un flusso di aria calda a 30-40 °C, si riduce il contenuto di umidità dal 30-40% fino a circa il 6% [6] [7].

I prodotti così trattati sono sistemati in sacchi di juta e mandati alla fase successiva di **sgusciatura**. In questo stadio si ha la separazione meccanica del guscio dal frutto [6].

Si verificano in seguito una fase di **calibrazione** e **controllo qualità** che hanno l'obiettivo di classificare le nocciole in base alla dimensione e successivamente scartare eventuali frutti non conformi alle richieste [6].

Lo *step* successivo è la **tostatura** e viene realizzato in forni a tunnel rotativi. Il processo di tostatura è uno stadio fondamentale che viene realizzato in ambito industriale prima dell'immissione del prodotto sul mercato. Si stima, infatti, che circa il 95% delle nocciole commercializzate siano state precedentemente sottoposte a tostatura. L'obiettivo di tale pratica consiste nel migliorare il prodotto dal punto di vista delle caratteristiche organolettiche e inibire lo sviluppo di microrganismi potenzialmente patogeni. Lo sviluppo di sapori, aromi e odori peculiari si ha grazie alle reazioni di Maillard, insieme di reazioni che coinvolgono uno zucchero e un amminoacido. A tale scopo, il processo si realizza sfruttando elevate temperature comprese tra 100 °C e 160 °C, per tempi variabili di 10-60 minuti [8]. Inoltre, le condizioni operative a cui si conduce la tostatura consentono anche la rimozione del tegumento marrone, il perisperma, che riveste il seme e che altrimenti donerebbe un sapore amaro al prodotto a causa dell'elevata quantità di tannini presenti [1]. La rimozione del perisperma è anche agevolata dal movimento rotatorio a cui sono sottoposte le nocciole all'interno del forno. Si creano infatti sfregamenti tra una nocciola e un'altra adiacente che favoriscono il distacco del tegumento [1]. Un ulteriore importante effetto della tostatura consiste nella riduzione dell'umidità del frutto dal 4-6% all'1-3% [9].

Infine, si ha la **trasformazione** della nocciola in prodotto finito, nel caso in cui l'acquirente richieda ad esempio farina, granella o pasta di nocciole. I prodotti così ottenuti vengono imballati in appositi *packaging* atti a garantirne la conservabilità [6].

Nel paragrafo 2.3.4 verrà descritto nel dettaglio come, durante le varie fasi del processo produttivo, ci possano essere contaminazioni fungine che possono portare allo sviluppo di micotossine.

2.3 *Micotossine*

Le micotossine sono sostanze tossiche che rappresentano un problema nell'ambito dell'industria alimentare e nello specifico in quella della frutta a guscio. Si definiscono come metaboliti secondari dei funghi filamentosi, i quali si sviluppano sulla superficie del frutto e riescono ad accrescersi grazie all'elevato contenuto di lipidi e carboidrati presenti nelle nocciole. La presenza di funghi risulta, infatti, inevitabile nell'ambiente ed essi, essendo in grado di resistere a condizioni ambientali molto eterogenee dal punto di vista dei

valori massimi e minimi di temperatura, umidità, pH e attività dell'acqua (a_w) riescono a sopravvivere e ad accrescersi sulla superficie dell'alimento che contaminano. Infatti, sebbene sia presente un guscio esterno al frutto che garantisce una buona protezione dalla contaminazione, a seconda delle condizioni climatiche e di immagazzinaggio del frutto, è possibile assistere alla formazione di micotossine. Ad esempio, in regioni caratterizzate da clima tropicale e subtropicale è più probabile assistere alla presenza di micotossine specifiche, le aflatossine. Per quanto riguarda, invece, l'immagazzinaggio riveste un ruolo fondamentale il contenuto di umidità presente nell'ambiente. Nel caso in cui l'umidità dell'ambiente di stoccaggio superasse l'umidità relativa dell'alimento, l'alimento stesso subirebbe un incremento del contenuto di umidità e del valore di a_w . Questo aspetto implica in modo diretto una maggiore possibilità del frutto di essere soggetto a crescita fungina e sviluppo di micotossine [4].

Uno studio [10] condotto su nocciole di origine diversa, avente l'obiettivo di individuare come diverse condizioni di stoccaggio in termini di umidità, a_w e tipo di *packaging* utilizzato potessero modificare la qualità del frutto, ha confermato la grande influenza di questi fattori sulla conservabilità delle nocciole. Nella **Tabella 1.4** sono presentate le condizioni testate.

Tabella 1.4: condizioni di stoccaggio (T e RH) testate - Tratto e modificato da [10]

Condizione di stoccaggio	T (°C)	RH (%)
T ambiente	23,4 ± 2,5	50,5 ± 6,7
Stufa		
(T controllata, RH non controllata)	30,0 ± 0,0	36,0 ± 3,6
Stufa		
(T controllata, RH non controllato)	50,0 ± 0,0	13,2 ± 1,5
Camera climatica		
(T e RH controllate)	30,0 ± 0,0	90,0 ± 0,0
Camera climatica		
(T e RH controllate)	50,0 ± 0,0	90,0 ± 0,0
Refrigerazione	2,30 ± 1,7	48,1 ± 13,3
Congelamento	-15,4 ± 2,6	61,7 ± 6,2

Lo stoccaggio a 50 °C con RH pari a 13,2% provoca una disidratazione del frutto e di conseguenza sembrerebbe essere una condizione favorevole al mantenimento della sua qualità. Tuttavia, il frutto subirebbe un peggioramento delle sue proprietà organolettiche a causa del possibile instaurarsi di reazioni Maillard. Al contrario, lo stoccaggio in una camera climatica con RH pari a 90%, indipendentemente dalla temperatura, provoca un incremento del contenuto di umidità all'interno delle nocciole e quindi una riduzione della *shelf-life* dell'alimento [10].

Allo stesso tempo, anche l'attività dell'acqua (a_w), essendo una indicazione della quantità di acqua libera e disponibile all'effettiva realizzazione di reazioni chimiche e biochimiche, come quelle che coinvolgono la crescita di microrganismi, influenza la durabilità di un alimento. Si riporta di seguito la formula (1) che consente di valutare l' a_w [11]:

$$a_w = \frac{P}{P_0} \quad (1)$$

Dove:

- P è la pressione di vapore dell'acqua presente nell'alimento a una temperatura T
- P_0 è la pressione di vapore dell'acqua pura alla stessa temperatura T

L' a_w si definisce come un valore compreso tra 0 e 1 ed è stato individuato che in presenza di a_w minore o uguale a 0,6 i microrganismi perdono la loro capacità di moltiplicarsi [10] [11].

Lo studio ha concluso che le uniche condizioni di stoccaggio in cui l' a_w risulta superiore a 0,6, e dunque favorevole alla crescita microbica, sono quelle in camera a 30 °C e 50°C con una RH del 90% [10].

La ricerca svolta ha anche permesso di concludere che la tipologia di *packaging* utilizzato (confezioni in polietilene LDPE e LLDPE) o una eventuale assenza di qualsiasi tipo di confezionamento, non hanno influenza sulla qualità delle nocciole poiché il contenuto di umidità non è cambiato utilizzando confezioni diverse [10].

La presenza di funghi filamentosi non implica inevitabilmente la presenza di micotossine in quanto le condizioni favorevoli alla crescita fungina non sempre coincidono con quelle favorevoli allo sviluppo di micotossine [4]. Inoltre, solamente alcune specie fungine sono in grado di produrre micotossine e non tutti i ceppi della stessa specie sono produttori di tali sostanze. Considerata una data specie, ceppi diversi possono produrre micotossine diverse [4].

Nel caso di nocciole di provenienza turca, si rilevano quantità di micotossine superiori rispetto alle nocciole italiane a causa del clima umido e piovoso che favorisce lo sviluppo di muffe e a causa del fatto che la fase di essiccamento viene svolta all'aria aperta [12] [13].

La formazione di micotossine rappresenta uno strumento che il fungo utilizza come difesa da agenti esterni quali insetti e microrganismi e, tra questi ultimi, si citano i batteri che condividono le stesse esigenze nutritive e ambientali (condizioni di T , pH, umidità relativa) [14]. Al contrario, le micotossine non rivestono alcun ruolo nella crescita fungina [4]. Sebbene questo aspetto al momento non sia del tutto chiaro, si è a conoscenza che, nel caso dei batteri, le micotossine hanno una azione inibente nei confronti del loro sistema di *quorum sensing* ovvero quel meccanismo con cui i batteri regolano l'espressione dei geni coinvolti nella formazione di un biofilm o di quelli che codificano per i fattori di virulenza [11]. In particolare, si è scoperto che alcune specie appartenenti al genere *Penicillium* sono in grado di produrre composti inibitori del meccanismo di *quorum sensing* di *Pseudomonas aeruginosa* [14].

2.3.1 Cenni sulla struttura chimica

Le micotossine principalmente presenti sulle nocciole sono le aflatossine e le ocratossine. In generale, le micotossine sono molto eterogenee dal punto di vista della struttura chimica (**Tabella 1.5**) e tali differenze sono responsabili di effetti diversi sulla salute umana [15].

Tabella 1.5: principali micotossine presenti nelle nocciole – Tratto e modificato da [15]

Micotossina	Formula	Massa Nominale (U)
Aflatossine		
Aflatossina B1 (AFB1)	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312
Aflatossina B2 (AFB2)	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314
Aflatossina G1 (AFG1)	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328
Aflatossina G2 (AFG2)	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330
Ocratossine		
Ocratossina A (OTA)	C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₆	404
Ocratossina B (OTB)	C ₂₀ H ₁₉ NO ₆	369

Si specifica che le lettere *B* (*blue*) e *G* (*green*) che classificano il tipo di aflatossina sono una indicazione del colore con cui queste risultano visibili quando sono colpite da una radiazione ultravioletta a 360 nm [16].

Le micotossine sono composti aromatici sostituiti, caratterizzati da un basso peso molecolare, minore di 500 dalton [15].

Di seguito (**Figura 1.2**) si riporta la struttura chimica delle micotossine elencate precedentemente.

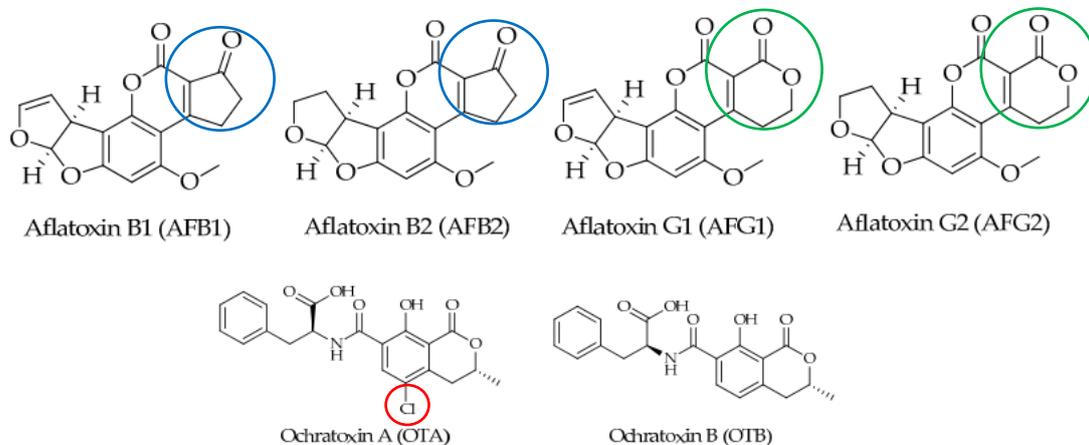


Figura 1.2: strutture chimiche delle principali micotossine-tratto e modificato da [15]

Si osserva che l'AFB1 e l'AFB2 sono caratterizzate da una struttura contenente un ciclopentenone, un chetone ciclico a cinque atomi di carbonio evidenziato in blu nella **Figura 4.2**. Nelle aflatossine di categoria G il ciclopentenone è assente ed è sostituito da un anello lattonico a cinque unità (δ -lattone), indicato in verde.

L'ocratossina A è caratterizzata dalla presenza di un atomo di cloro; il quale contribuisce ad aumentarne gli effetti tossici. Nel caso dell'ocratossina B l'atomo di cloro è assente.

2.3.2 Specie fungine produttrici di micotossine

I generi principalmente responsabili dello sviluppo di micotossine nelle nocciole sono *Penicillium*, in particolare *P. commune*, *P. solitum*, *P. verrucosum* e *Aspergillus*, in particolare *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*. Le aflatossine sono prodotte in gran parte da *A. flavus*, mentre le ocratossine sono prodotte molto spesso anche da *P. verrucosum* [15].

Penicillium è un genere fungino saprofito e dunque si trova nel terreno e dove sono presenti sostanze organiche in via di decomposizione. Tuttavia, alcune specie sono solite contaminare alcuni alimenti (*P. expansum* si trova tipicamente sulle mele, *P. verrucosum* sulle nocciole) [17]. Allo stesso modo, anche il genere *Aspergillus* è saprofito e le diverse specie elencate precedentemente sono in grado di contaminare le nocciole.

Sebbene siano presenti metodi molecolari utili a identificare i diversi tipi di funghi, la caratterizzazione fungina e la successiva classificazione in genere e specie è spesso basata sull'osservazione al microscopio, sulla valutazione delle velocità di crescita e sull'aspetto che questi mostrano quando fatti crescere su un terreno di coltura [17]. Per quanto riguarda *Penicillium*, gli studi realizzati hanno permesso di individuare una colorazione delle spore del fungo tendente al verde [17]. Considerato il genere *Aspergillus*, si ha *A. flavus* che si presenta con conidi di colore giallo-verde, *A. parasiticus* mostra spore di colore verde scuro e infine *A. niger* si contraddistingue poiché le spore sono marrone scuro o nere [18]. Nella seguente **Figura 1.3** sono presentate le immagini delle specie fungine appartenenti al genere *Aspergillus* citate [19] [20]. Nella **Figura 1.4** è rappresentato *P. verrucosum* [21].

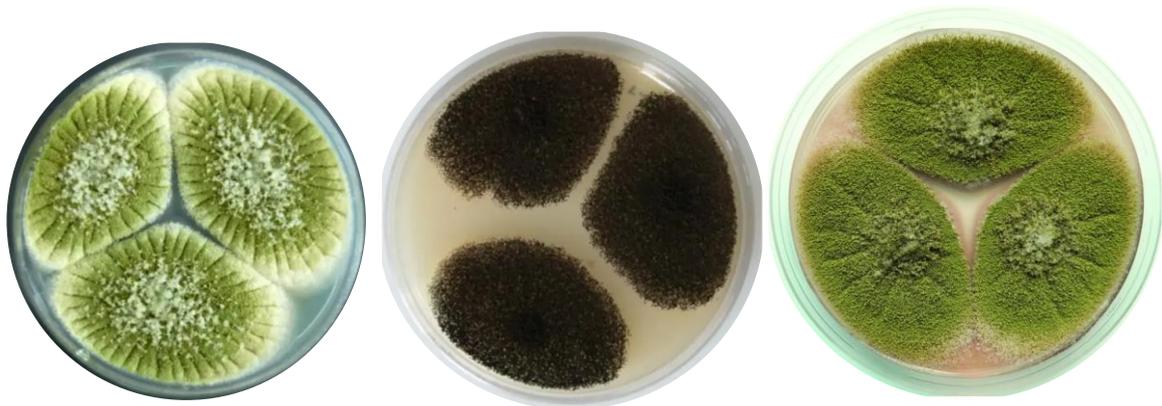


Figura 1.3: spore fungine rispettivamente di *A. flavus*, *A. niger*, *A. parasiticus* – Tratto e modificato da [19] [20]



Figura 1.4: spore fungine di *P. verrucosum* – Tratto e modificato da [21]

2.3.2.1 Condizioni di crescita fungina e produzione di micotossine

La crescita fungina e la produzione delle micotossine sono influenzate dalle condizioni ambientali, tra queste sono particolarmente importanti temperatura, umidità e a_w . Inoltre, ogni specie fungina è in grado di crescere e produrre micotossine in presenza di valori specifici definiti come valori ottimali. Per questa ragione, è possibile che si verifichino contaminazioni multiple da parte di specie fungine diverse dal momento in cui si ha la raccolta del frutto fino alla fase di stoccaggio e, di conseguenza, il tutto si potrebbe tradurre in maggiori concentrazioni di micotossine [4].

A. flavus e *A. parasiticus* trovano condizioni ottimali di crescita in regioni subtropicali e temperate calde in cui la temperatura varia tra 30 e 35°C. Similmente anche *A. niger*. Le specie di *Penicillium* responsabili della contaminazione di matrici alimentari sono solitamente mesofile con una temperatura ottimale di crescita più bassa e di circa 25°C [18] [17]. Nella sezione successiva 2.3.2.2 si analizza più nel dettaglio l'effetto della temperatura sulla velocità di crescita microbica, a seconda della tipologia di microrganismo (psicrofilo, mesofilo o termofilo).

Nella **Tabella 1.6** sono indicate le condizioni ottimali di crescita e produzione di micotossine nel caso dei funghi micotossigeni menzionati: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger* e *P. verrucosum*.

Tabella 1.6: condizioni ottimali di crescita e di produzione di micotossine per *A. flavus*, *A. parasiticus* e *P. verrucosum* – Tratto e modificato da [16, 4, 18]

Funghi	Crescita		Crescita ottimale		Produzione ottimale di micotossine	
	T [°C]	a_w	T [°C]	a_w	T [°C]	a_w
<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	15-44	0,91-0,99	35	0,95	33	0,99
<i>A. niger</i>	8-47	0,93-0,98	35-37	0,94	20-25	0,95-0,98
<i>P. verrucosum</i>	5-37	0,89-0,94	23	0,88	25	0,90

Si nota che, come precedentemente anticipato, le condizioni ottimali di crescita e produzione di micotossine variano per ogni fungo micotossigeno. È stato, però, riscontrato che, nel caso in cui la temperatura sia compresa tra 25 e 30°C, l'umidità relativa tra l'88% e il 95% e l' a_w sia maggiore di 0,78, tanto la crescita fungina quanto la formazione di micotossine risultano favorite [4].

2.3.2.2 Temperatura

La temperatura è il parametro su cui solitamente si agisce per controllare l'attività dei microrganismi. Per comprendere al meglio l'effetto che la temperatura esercita sulla velocità di crescita microbica risulta utile osservare la seguente immagine (**Figura 1.5**).

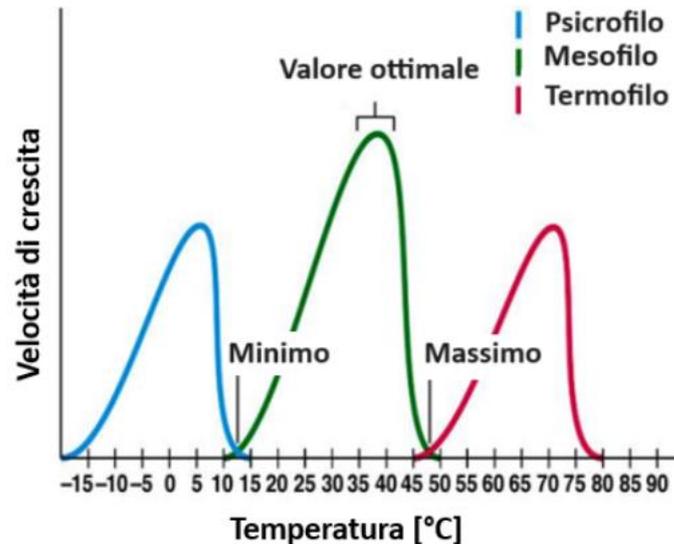


Figura 1.5: grafico delle velocità di crescita in funzione delle temperature per microrganismi psicrofili, mesofili e termofili – Tratto e modificato da [11]

Si osserva che sono rappresentate tre curve corrispondenti a classi di microrganismi che si distinguono tra loro a seconda degli intervalli di temperatura in cui normalmente crescono. Infatti, sono presenti microrganismi psicrofili, mesofili e termofili e si vede come, al variare della temperatura, si abbiano conseguenti modificazioni nella velocità di crescita. In ciascuna curva è possibile individuare valori minimi, ottimali e massimi, corrispondenti a valori di temperatura noti come “punti cardinali” [22]. Ogni punto cardinale relativo ai valori ottimali, è in realtà rappresentato da un intervallo di valori, tipico di ciascuna classe di microrganismi (**Tabella 1.7**).

Tabella 1.7: valori minimi, ottimali, massimo di T per microrganismi psicrofili, mesofili, termofili – Tratto da [11]

	Minimo [°C]	Valore ottimale [°C]	Massimo [°C]
Psicrofili	-15	0-10	15
Mesofili	15	25-35	45
Termofili	50	45-65	75

Dalla **Figura 1.5**, si vede che ogni curva ha un andamento parabolico in cui a temperature inferiori al valore minimo non si verifica crescita microbica. Nel tratto compreso tra il valore minimo e l'ottimale, a un incremento della temperatura corrisponde un aumento della velocità di crescita microbica. Avvicinandosi gradualmente all'intervallo ottimale di valori, si ha una maggiore pendenza delle curve e di conseguenza un più rapido aumento della velocità di crescita [22]. Al di sopra del valore ottimale, a un aumento della temperatura corrisponde un decremento della velocità di crescita microbica, corrispondente a un rallentamento della crescita e a una fase di morte [4].

2.3.2.3 pH

La possibilità che un alimento subisca una contaminazione fungina è direttamente correlata al suo valore di pH [23]. È noto che *A. flavus* e *A. parasiticus* riescono a riprodursi in condizioni di pH compreso tra 2 e 11 [24]. In particolare, *A. parasiticus* cresce in condizioni di pH di 3-8 a 30°C. *P. verrucosum* trova condizioni ideali a pH compresi tra 6 e 8 a 37°C [24]. Dal momento che il pH delle nocciole è circa 6 [25], queste specie fungine sono state frequentemente individuate come le principali responsabili della presenza di micotossine in nocciole.

Sebbene ogni specie fungina abbia valori ottimali di pH, non è possibile individuare una relazione diretta tra il pH degli alimenti su cui si sviluppano i funghi e la loro velocità di crescita. Infatti, il pH influenza anche la crescita dei batteri presenti sulla superficie di un alimento e si presuppone che questi entrino in competizione con i funghi presenti. Quindi, a causa della presenza di batteri, la cui crescita può essere favorita da specifici valori di pH dell'alimento, si assiste a una possibile diminuzione della velocità di crescita fungina [26]. Questo si verifica soprattutto in condizioni di pH prossime alla neutralità in cui molti batteri trovano le condizioni di crescita ottimali [23].

Nell'industria alimentare spesso si sfrutta la capacità dei batteri lattici (LAB) di agire come agenti inibenti la crescita fungina [26]. L'effetto inibitorio deriva dalla capacità dei LAB di produrre acidi organici (acido lattico e acido acetico), idrogeno e batteriocine [26]. In uno studio [27], in cui è stata analizzata l'azione antifungina dei LAB nei confronti di *Aspergillus* e *Penicillium* presenti nel pane, è emerso che, al variare del pH del terreno di coltura liquido (costituito da idrolizzato di farina di frumento - WFH), cambia l'effetto inibitorio degli acidi organici. La minima concentrazione di acido lattico in grado di inibire del 50% la germinazione dei conidi di *Penicillium* è risultata pari a 80 mM a pH 3,5 e 160 mM a pH 6. Nel caso di *Aspergillus*, sono state individuate concentrazioni pari a 180 mM a pH 3,5 e concentrazioni superiori a 300 mM a pH 6. L'effetto inibitorio dell'acido acetico è risultato maggiore in quanto, a parità di azione inibente, sono necessarie minori concentrazioni di acido. Considerato *Penicillium*, si ha che a pH 3,5 la concentrazione di acido acetico necessaria è pari a 0,9 mM, valore che diventa pari a 24 mM a pH 6. Per *Aspergillus* le concentrazioni sono pari a 18 mM (pH 3,5) e 120 mM (pH 6).

È altresì noto che il pH influenza anche la produzione di micotossine [4]. In uno studio [28] sono stati analizzati gli effetti che una variazione del pH del terreno di coltura ha sulla produzione di AFB1 e AFG1, da parte di *A. parasiticus* e *A. flavus*. È emerso che, a una diminuzione del pH fino a valori minori di 3, corrisponde una riduzione della quantità di AFG1 dieci volte maggiore rispetto a quella che si verifica con AFB1. È ipotizzabile che, in presenza di pH < 3, alcuni enzimi responsabili della formazione di AFG1, subiscano una inibizione e pertanto i quantitativi di AFG1 risultino inferiori rispetto a quelli di AFB1. Al contrario, con un pH compreso tra 4 e 6, le concentrazioni di AFB1 e AFG1 sono risultate confrontabili (211 µg/g di AFB1 e 259 µg/g di AFG1 prodotti da *A. flavus* a pH 4,5).

2.3.2.4 Substrato

L'alimento fornisce i nutrienti necessari allo sviluppo del fungo e alla conseguente formazione di micotossine. Ulteriori fattori che influenzano la produzione di micotossine sono la presenza di condizioni ottimali in termini di pH, temperatura e contenuto di zuccheri semplici, monosaccaridi e disaccaridi. La principale differenza tra zuccheri semplici e complessi, polisaccaridi, risiede nel fatto che questi ultimi, affinché possano essere metabolizzati, devono prima essere scomposti, tramite reazione di idrolisi, in zuccheri semplici e questa fase richiede più tempo. Pertanto, nel caso in cui ci sia abbondanza di zuccheri semplici la crescita fungina risulta più rapida rispetto al caso in cui prevalgono

quelli complessi [4]. Uno studio [29] condotto su *Alternaria* spp., genere fungino che cresce a temperature ottimali comprese tra 18 e 30°C e che può contaminare frutta, verdura e cereali, ha messo in evidenza gli effetti di pH, temperatura e concentrazione di zuccheri semplici (glucosio, fruttosio, saccarosio) sulla produzione di micotossine. Dalle condizioni testate (pH 3,5 e 8, temperatura 6, 15 e 25°C, concentrazioni di zuccheri semplici del 3, 6 e 9%) è emerso che le uniche favorevoli allo sviluppo di micotossine, da parte di *A. tenuis*, sono pH 5 e temperatura di 15°C. Il pH 3 e il pH 8 non hanno avuto alcun effetto sullo sviluppo di micotossine. Le temperature di 6 e 25°C, accoppiate a pH 5 non costituiscono le condizioni ottimali per la formazione di micotossine. Per quanto riguarda gli zuccheri la concentrazione ottimale allo sviluppo di micotossine è variabile tra il 3-9% a seconda del tipo di zucchero presente (glucosio, fruttosio, saccarosio).

Azoto e carbonio sono i principali macronutrienti che favoriscono la crescita fungina e pertanto, dato il loro elevato quantitativo nelle matrici alimentari, si giustifica l'ampia diffusione delle contaminazioni fungine [4]. Nel dettaglio, si è analizzato come la produzione di AFB1 da parte *Aspergillus* spp. risulti favorita in presenza di specifici nutrienti come glucosio, ribosio e glicerolo. In aggiunta, anche la presenza di micronutrienti come zinco e rame possono favorire la produzione di aflatossine da parte di *A. flavus*. È stato realizzato uno studio in cui si è visto come la presenza di diversi zuccheri possa favorire la produzione di AFB1 da parte di *A. flavus*. Dall'analisi è stato riscontrato che concentrazioni del 3-6% di glucosio o saccarosio promuovono la produzione dell'aflatossina [30]. Le nocciole, essendo costituite da circa il 4% di zuccheri tra i quali il saccarosio è il più abbondante (74,6% del totale), sono facilmente soggette ad attacchi fungini e produzione di aflatossine [5]. Tra i micronutrienti costituenti le nocciole, l'unico che effettivamente è stato dimostrato avere un effetto favorente la produzione di AFB1 è lo zinco: a un aumento di 20 volte della concentrazione di zinco rispetto alla situazione di controllo è corrisposto un aumento di 4 volte della concentrazione di aflatossina B1 [30].

2.3.2.5 L'influenza del cambiamento climatico sulle micotossine

A causa dei cambiamenti climatici e del surriscaldamento globale si sta assistendo a una variazione della tipologia di micotossine presenti in una specifica area geografica [4]. In particolare, il surriscaldamento globale è responsabile di un aumento di temperatura media di 2-5°C e di conseguenti inconvenienti legati a fenomeni di siccità come la riduzione dei raccolti ottenuti [31].

Inoltre, sebbene i funghi termofili siano normalmente presenti in zone a latitudini basse e gli psicrofili in aree geografiche a latitudini alte, come effetto del cambiamento climatico si è osservato che le micotossine prodotte da funghi psicrofili solitamente presenti in zone a basse temperature iniziano ad essere individuate anche in regioni a temperatura maggiore. Allo stesso modo le micotossine prodotte da funghi termofili e tipiche di zone calde tropicali iniziano ad essere presenti in zone temperate in cui si è verificato un innalzamento della temperatura media. Tutto ciò comporta contaminazioni nuove e inaspettate nelle derrate alimentari [4] [32]. *Aspergillus* spp. è di solito presente in zone molto calde, tropicali e subtropicali e fino ai primi anni 2000 non è stata rilevata la sua presenza in zone temperate come l'Europa. Negli anni successivi, invece, a causa del progressivo cambiamento climatico, alcune specie (es. *A. flavus*) e le relative aflatossine sono state rilevate anche in Europa come contaminanti di derrate di mais [32].

Il cambiamento climatico, inoltre, ha anche effetti secondari come variazioni nei tipi e nelle quantità di insetti presenti, nei tempi di maturazione dei frutti e nelle fasi post-raccolta del processo produttivo. La maggiore quantità di insetti presenti si traduce in maggiore danneggiamento dei gusci dei frutti e di conseguenza maggiore probabilità di

contaminazione fungina mentre quando si parla di fasi post-raccolta si intendono le fasi di essiccamento. Infatti, in zone in cui le temperature sono molto elevate si rende necessario raccogliere i frutti in anticipo quando non hanno ancora raggiunto piena maturazione e di conseguenza la fase di essiccamento viene ridotta [4].

Con l'obiettivo di studiare le conseguenze che i cambiamenti climatici hanno sulla contaminazione da micotossine nell'industria alimentare, è possibile basarsi su modelli predittivi, che consentono di prevedere e quantificare la quantità di micotossine. I primi modelli realizzati si basavano su informazioni circa i periodi di fioritura e maturazione delle piante; oltre che parametri ambientali come la temperatura, l'umidità e l'intensità delle piogge nella regione di coltivazione. Dall'analisi è emerso che, in presenza di un incremento di 2°C della temperatura media ambientale dovuto al surriscaldamento globale, la concentrazione di aflatossine tenderà ad aumentare. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi dal momento che non sono ancora stati individuati, per ogni area geografica, modelli quantitativi specifici su cui basarsi per valutare l'effetto dei cambiamenti climatici [32].

2.3.3 *La pericolosità delle micotossine*

Il consumo di alimenti contaminati da micotossine comporta l'insorgenza di intossicazioni. In particolare, è possibile che le micotossine provochino effetti acuti o cronici sulla salute umana. Si parla di effetti acuti nel caso in cui si abbia una esposizione di breve durata ma intensa a livello di quantitativo di micotossine con cui si entra in contatto e che può provocare la morte [33]. Al contrario, gli effetti cronici sono provocati dall'esposizione a concentrazioni di micotossine minori ma prolungate nel tempo, come nel caso della cancerogenicità [33]. L'insieme delle malattie che si sviluppano in seguito a un consumo di alimenti contaminati viene definito micotossicosi. Le micotossine, infatti, risultano cancerogene, mutagene, epatotossiche, teratogene e nefrotossiche [34]. Si cita, ad esempio, che l'aflatossina B1 è stata classificata dalla International Agency for Research on Cancer (IARC) come sostanza tossica appartenente al gruppo 1, categoria che include tutte le sostanze la cui cancerogenicità è stata confermata e comprovata scientificamente [15]. L'ocratossina A è stata invece inserita nella categoria 2B che comprende le possibili sostanze carcinogene per l'uomo [16].

Tuttavia, la gravità e l'intensità con cui tali effetti collaterali si manifestano dipende da persona a persona anche in relazione a caratteristiche individuali come, ad esempio, il peso corporeo. Il tutto dipende anche dall'eventuale instaurarsi di effetti sinergici dovuti alla presenza di più tipologie di micotossine [34]. Nel caso specifico dell'ocratossina A, il pericolo è legato anche all'effetto di accumulo nell'organismo a causa dell'impossibilità di quest'ultimo di detossificarla o espellerla [35].

Inoltre, la pericolosità delle micotossine è anche dovuta al fatto che esse tendono ad accumularsi durante il processo produttivo alimentare e pertanto, in caso di contaminazioni fungine in diverse fasi del processo, si può osservare anche un aumento della concentrazione totale di micotossine presenti all'interno dei lotti di prodotto contaminati [4].

Il rischio di consumare alimenti contaminati è anche legato al fatto che le micotossine sono in grado di contaminare matrici alimentari di diverso tipo: frutta, cereali, spezie, frutta secca, frutta a guscio [36]. Di seguito si riporta una tabella (**Tabella 1.8**) in cui sono indicati i principali alimenti contaminati da aflatossine e ocratossine con la corrispondente specie fungina responsabile della contaminazione. Nell'ultima colonna della tabella sono elencati gli effetti tossici provocati sull'organismo dal consumo di alimenti contaminati.

Tabella 1.8: Principali alimenti contaminati da micotossine ed effetti tossici – Tratto e modificato da [36]

Micotossine	Funghi	Alimenti contaminati	Effetti tossici
Aflatossine	<i>A. flavus</i>	Cereali	Cancerogenicità, teratogenicità, epatotossicità, epatiti, emorragie, lesioni renali
	<i>A. parasiticus</i>	Semi oleosi	
	<i>A. niger</i>	Cocco Frutta a guscio (es. Nocciole)	
Ocratossine	<i>P. verrucosum</i>	Cereali	Danni a fegato e reni, perdita di appetito, nausea e vomito, cancerogenicità
	<i>P. nordicum</i>	Frutta e frutta a guscio (es. Nocciole)	
	<i>A. ochraceus</i>	Vino	
		Spezie	

Infine, l'assunzione di micotossine, oltre ad avvenire consumando alimenti contaminati di origine vegetale, può anche verificarsi consumando prodotti di origine animale. Nel caso in cui un animale si nutrisse di mangime contaminato da aflatossine (AFB1), queste si potrebbero trasformare nell'AFM1 che, di conseguenza, sarebbe presente anche in prodotti derivati come il latte [36].

2.3.4 Prevenzione della formazione di micotossine

Vista la pericolosità legata al consumo di alimenti contaminati, risulta necessario attuare delle strategie con l'obiettivo di ridurre il più possibile il quantitativo di micotossine prodotte in un alimento in quanto, una volta sviluppatesi, non sono facilmente eliminabili dal momento che sono termoresistenti. Nel caso in cui la concentrazione di micotossine fosse superiore ai limiti di legge, l'unica possibilità sarebbe quella di scartare il lotto contaminato avendo così ingenti perdite economiche e in termini di prodotto [16].

Pertanto, è opportuno agire in un'ottica di prevenzione della formazione di micotossine. Sebbene non esistano al momento metodi in grado di controllarne ed evitarne totalmente lo sviluppo, a seconda dello stadio del processo produttivo, è possibile attuare delle strategie con l'obiettivo di controllare e ridurre il più possibile i quantitativi presenti negli alimenti. Le possibili strategie di controllo delle micotossine negli alimenti sono le seguenti: *Good Agricultural Practice* (GAP), *Good Manufacturing Practise* (GMP) e *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCP). Questi documenti includono delle linee guida e delle regole da seguire affinché un prodotto alimentare possa essere considerato sicuro. Tra gli aspetti trattati in queste guide si menzionano le modalità di prevenzione della formazione delle muffe e l'eventuale loro rimozione [33]. Si riporta di seguito una spiegazione di tali pratiche (**Figura 1.6**).

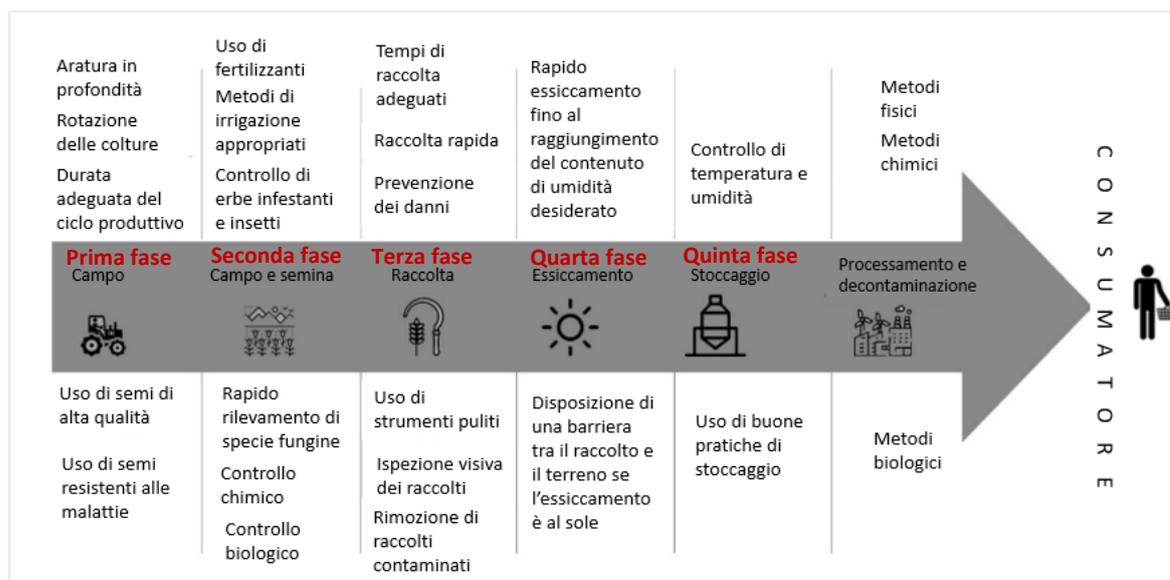


Figura 1.6: strategie di controllo della formazione di micotossine durante il processo produttivo – Tratto e modificato da [4].

Si osserva come i principali momenti del processo produttivo coinvolti nella strategia di controllo delle micotossine siano quelli di **pre-raccolta**, di seguito suddivisi in prima fase e seconda fase (Cap. 2.3.4.1 e 2.3.4.2), **raccolta**, **essiccamento**, **stoccaggio** e **processamento**.

Nei paragrafi successivi ci si riferisce alle prime cinque fasi del processo, indicate in rosso nella **Figura 1.6**. La fase finale di decontaminazione è trattata nel paragrafo 2.3.5.

2.3.4.1 Prima fase

La prima fase di prevenzione della contaminazione avviene durante la semina. È questo il momento in cui è possibile la prima contaminazione fungina e le specie maggiormente coinvolte e presenti nel terreno sono *Fusarium* spp. e *Alternaria* spp.; al contrario *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., sebbene siano le principali specie responsabili della presenza di micotossine nelle nocciole, risultano presenti in quantitativi minori nei terreni. In questa prima fase risulta estremamente utile conoscere quali sono le specie di funghi presenti e quali tra questi sono tossigeni. In questo modo diventa possibile attuare strategie appropriate di coltivazione e raccolta per ridurre le contaminazioni fungine come ad esempio l'aratura in profondità, la rotazione delle colture, la programmazione delle date di semina e raccolta e l'utilizzo di semi di alta qualità [4].

Grazie all'*aratura in profondità* si eliminano eventuali residui di materiale vegetale derivante da colture precedenti; altrimenti i funghi presenti nel suolo riuscirebbero a sfruttare la presenza di questi residui e a sopravvivere, diventando così una possibile fonte di contaminazione per le coltivazioni successive. Ugualmente, la *rotazione delle colture* ha come obiettivo quello di evitare che si formino nel terreno delle muffe che invaderebbero facilmente la stessa tipologia di pianta. È stato notato, infatti, che la contaminazione da micotossine risulta più frequente nel caso in cui un terreno sia stato sfruttato per la coltivazione dello stesso tipo di pianta per molti anni [4].

Inoltre, risulta anche utile decidere già in fase iniziale quali saranno le *date di semina e raccolta* dei frutti; in questo modo, sulla base del clima della zona, è possibile effettuare la raccolta nei momenti più adatti ovvero quando il frutto ha raggiunto la giusta maturazione

e il meteo è favorevole. Le condizioni meteorologiche migliori consistono in bassa umidità e scarse piogge [4].

L'utilizzo di *semi di alta qualità* serve a garantire che la pianta sia più resistente alle contaminazioni fungine e di conseguenza anche la formazione di micotossine sia meno probabile. Questo aspetto è di fondamentale importanza soprattutto nelle zone con clima caldo e umido in cui si ha maggiore probabilità di avere contaminazione fungina. Tuttavia, è bene precisare che al momento non sono ancora disponibili semi totalmente resistenti a tutte le specie fungine [4].

2.3.4.2 Seconda fase

La fase successiva di controllo si avvale dell'utilizzo di *fertilizzanti*, fondamentali per assicurare la presenza dei nutrienti necessari alla crescita e alla salute della pianta. In questo modo, la pianta è più forte e resistente a eventuali attacchi fungini; d'altro canto, un uso eccessivo di fertilizzanti può avere l'effetto opposto. Anche una *giusta irrigazione* in termini di tempi e quantità di acqua aiuta a prevenire le infezioni fungine. Quando una pianta ha sempre a disposizione il quantitativo di acqua di cui ha bisogno è meno soggetta a infragilimento strutturale e di conseguenza ad aggressioni esterne [4]. L'irrigazione deve essere tale da garantire il mantenimento di adeguate condizioni di umidità del terreno evitando che la pianta incorra in fenomeni di carenza di acqua. A tal fine, è possibile predisporre più sistemi di irrigazione, facendo in modo che tutte le piante siano irrigate in ugual misura. È stato dimostrato che, a seconda del tipo di terreno su cui cresce la pianta, vi è una maggiore possibilità che questa sia infettata da funghi. Nel caso di un terreno sabbioso che trattiene con più difficoltà l'acqua, la proliferazione fungina è favorita, a maggior ragione in caso di siccità. Al contrario, se il terreno ha la tendenza a trattenere maggiormente l'acqua, il rischio di subire fenomeni di siccità si riduce e di conseguenza anche la possibilità di infezioni fungine. È stato condotto uno studio in cui sono stati analizzati i livelli di contaminazione da aflatoxine in piante di arachidi coltivate in diversi terreni. Dall'analisi realizzata è stato possibile ipotizzare che, se la pianta è coltivata in un terreno con la giusta disponibilità di acqua, la concentrazione di micotossine si riduce. Al contrario, in piante sottoposte a stress a causa di carenza di acqua, il livello di contaminazione da micotossine risulta superiore [37].

Anche l'attacco di insetti, provocando danni alle piante e rendendole, quindi, più facilmente attaccabili dai funghi, è responsabile di un incremento delle contaminazioni. Per questa ragione si rimuovono il più possibile eventuali residui vegetali che li attirano e si ricorre all'utilizzo di *insetticidi* [4]. Un vantaggio nell'utilizzo degli insetticidi risiede nel fatto che, riducendo il possibile attacco degli insetti si riduce anche la necessità di dover ricorrere a pesticidi agenti sulla biomassa fungina [38].

A questo punto della fase pre-raccolta è fondamentale servirsi di tecniche specifiche utili a individuare la presenza di biomassa fungina. A tal fine, ci si avvale di tecniche micologiche che prevedono la coltura, l'isolamento e l'identificazione della specie. Tuttavia, poiché tali tecniche sono onerose dal punto di vista del tempo impiegato, si prediligono metodi più rapidi di biologia molecolare. Una delle tecniche utilizzate è la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) che consente di amplificare *in vitro* tratti specifici del DNA. Trovato il sequenziamento del DNA del fungo è possibile confrontarlo con quelli presenti nelle banche dati genomiche. Individuata la contaminazione, è possibile agire tramite metodi di controllo chimico o biologico, con l'obiettivo di ridurre l'entità e di conseguenza cercare di evitare la formazione di micotossine [4].

Il metodo di controllo chimico prevede l'utilizzo di fungicidi. Tuttavia, se da un lato essi sono molto efficaci, dall'altro risultano tossici e dannosi per la salute umana in quanto

si depositano sul prodotto che viene poi consumato [4]. Numerosi studi si sono concentrati sull'effetto che i pesticidi hanno, oltre che sulla biomassa fungina, anche sulla produzione di micotossine. Sono emersi dati contrastanti circa l'efficacia dei pesticidi sul controllo del quantitativo di micotossine sviluppatesi a seguito di una contaminazione da *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. Il fatto che la maggior parte degli studi realizzati sia stato svolto *in vitro* potrebbe giustificare il motivo per il quale sono stati ottenuti risultati contrastanti. Infatti, specie diverse appartenenti allo stesso genere fungino mostrano spesso capacità di produzione di micotossine diversa e, per questo motivo, è possibile che i risultati ottenuti siano contrastanti. [39].

Il controllo biologico risulta, a prima vista, più sicuro rispetto a quello chimico in quanto prevede l'utilizzo di microrganismi non pericolosi quali funghi non produttori di aflatoxine, lieviti e batteri, che sono appositamente inoculati nel terreno in cui cresce la pianta con l'obiettivo di creare una competizione con le specie tossigene presenti [4]. In questo modo si cerca di evitare che le specie tossigene siano dominanti rispetto a quelle non tossigene e si tenta così di ridurre le quantità di micotossine prodotte. Questo fenomeno, in base al quale i ceppi non tossigeni entrano in competizione con quelli tossigeni per sfruttare i nutrienti presenti, è noto come esclusione competitiva [40]. Da alcuni studi si è visto che l'utilizzo di ceppi non aflatoxigenici di *A. parasiticus* e *A. flavus* ha permesso di ridurre il grado di contaminazione da aflatoxine [4]. Anche questo metodo presenta però degli svantaggi non trascurabili. Innanzitutto, ci potrebbe essere la formazione, ad opera dei funghi usati come agenti di controllo biologico, di metaboliti tossici diversi dalle micotossine ma comunque pericolosi. Il fungo non tossigeno, utilizzato come agente di controllo biologico, potrebbe influenzare negativamente le vie metaboliche dei funghi tossigeni, i quali potrebbero produrre micotossine modificate. Ci sarebbe, dunque, il rischio di sottostimare la presenza delle micotossine e i relativi rischi per la salute [40].

2.3.4.3 Terza fase

La terza fase è la raccolta; durante questo stadio il controllo del grado di umidità assume grande importanza per la riduzione della contaminazione da micotossine. Poiché il contenuto di umidità è fortemente dipendente dal clima sarebbe preferibile effettuare la raccolta quando il clima è per lo più secco; tuttavia, a volte non è possibile e dunque il rischio di contaminazione aumenta considerevolmente. Questo si verifica soprattutto in paesi sottosviluppati in cui, oltre a un clima molto umido, le apparecchiature per realizzare l'essiccazione e ridurre il quantitativo di umidità sono inadatte e obsolete [37] [4].

Al fine di ridurre le contaminazioni fungine, è necessario che il frutto venga raccolto quando ha raggiunto il grado di maturazione ottimale. È stato visto che frutti raccolti ancora acerbi o troppo maturi sono soggetti a un maggior grado di contaminazione da micotossine [41]. Dal momento che i frutti, una volta maturi, tendono a staccarsi dall'albero e a cadere nel terreno, è opportuno cercare di raccogliarli il prima possibile in quanto, a livello del terreno, sono naturalmente presenti funghi, come *A. flavus*, che potrebbero contaminare il frutto [42].

Occorre, inoltre, prestare attenzione a non provocare danni ai frutti durante la raccolta in modo da non facilitare la creazione di condizioni favorevoli ad attacchi fungini. Nel caso in cui, a una prima osservazione, si notassero frutti danneggiati dalla presenza di funghi è necessario rimuoverli e scartarli così che anche il resto del raccolto non subisca conseguenti contaminazioni [37]. In uno studio [41] condotto in Turchia, si è analizzato come diverse modalità di raccolta delle nocciole possano influenzare la quantità di micotossine sviluppatesi. I principali metodi di raccolta testati sono: raccolta manuale e raccolta da terra di frutti precedentemente caduti. Dai risultati è emerso che le modalità di

raccolta migliori sono quelle in cui le nocciole non vengono a contatto con il terreno. Infatti, nel caso di raccolta manuale, sono state registrate concentrazioni di micotossine più basse ($0,6 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{kg}$) rispetto a quelle valutate nel caso di nocciole raccolte dal terreno in seguito alla caduta naturale dall'albero e in seguito a un periodo di permanenza al suolo di tre giorni ($3,18 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$). Il metodo di raccolta ideale è un metodo meccanico su tela (tramite una apposita macchina si scuote dolcemente l'albero e si favorisce la caduta dei frutti su una tela sottostante); tuttavia, a causa della conformazione geografica delle zone in cui è stata fatta la ricerca non è stato possibile applicare questo metodo. Il metodo meccanico rappresenta il metodo ideale in quanto si evita il contatto tra i frutti e il terreno e, inoltre, si riesce a garantire che tutti i frutti raccolti siano allo stesso livello di maturazione, cosa che non è possibile realizzare con la raccolta manuale [41].

Un altro aspetto che può influire sulla presenza fungina è la mancata pulizia delle apparecchiature con cui si realizza la raccolta; ciò può provocare il trasferimento di un fungo da un lotto contaminato a un altro [4].

2.3.4.4 Quarta fase

Non è affatto inusuale che, in seguito alla raccolta, il prodotto venga sottoposto a uno stadio di essiccazione con l'obiettivo di ridurre il contenuto d'acqua residuo (fino a circa il 6%) e preservare il frutto da contaminazioni nelle fasi successive del ciclo produttivo [4]. Tuttavia, durante il processo di essiccazione, è possibile che si sviluppino condizioni favorevoli alla crescita fungina all'interno dell'essiccatore stesso. Infatti, se all'interno dell'apparecchiatura si dovesse raggiungere la temperatura di rugiada, inizierebbe a formarsi condensa sulla superficie del prodotto e si creerebbero condizioni di umidità favorevoli allo sviluppo fungino [7].

I possibili metodi di essiccazione sono: essiccazione all'aria aperta ed essiccazione solare, essiccazione con aria calda e l'essiccazione con vapore surriscaldato [7].

L'essiccazione all'aria aperta costituisce il metodo più antico e comporta una maggiore probabilità di contaminazione, dovuta al fatto che spesso il prodotto viene disposto a diretto contatto con il terreno. Un possibile metodo per ridurre la contaminazione è quello di disporre i prodotti da essiccare su un telo che, essendo interposto tra il terreno e i prodotti alimentari (in questo caso le nocciole), funge da barriera nei confronti delle specie fungine presenti nel terreno. Il limite di questo metodo è che l'efficienza di essiccamento e il tempo richiesto al raggiungimento del contenuto di umidità desiderato, è fortemente influenzato dalle condizioni climatiche [7]. In Turchia, in cui nel periodo di raccolta dei frutti si ha un clima umido e piovoso, l'essiccamento all'aria al sole può durare fino a 2-3 settimane [12]. L'essiccazione solare è un metodo alternativo che combina la modalità di essiccamento all'aria aperta al sole con un flusso di aria, eventualmente riscaldata, che contribuisce a ridurre la durata del processo e il contenuto finale di umidità. Si è stimato che con questo metodo la durata della fase di essiccamento si riduce del 65% rispetto al caso in cui si realizza l'essiccamento all'aria aperta [7].

Il metodo che trova più applicazione dell'industria alimentare è sicuramente l'essiccazione con aria calda. Questa tecnica consente di realizzare il processo in condizioni igieniche migliori rispetto ai precedenti metodi descritti e consente di ridurre notevolmente la durata della fase di essiccamento [7]. In una ricerca, è stato osservato che applicando l'essiccamento con aria calda a 40°C a nocciole di provenienza turca la durata del processo si è ridotta a 33 h; mentre con il metodo tradizionale all'aria aperta erano state necessarie 110 h [41]. Le temperature dell'aria calda tipicamente utilizzate non sono molto alte ($30\text{-}40^\circ\text{C}$) e, per questa ragione, queste non hanno alcun effetto sulla riduzione della concentrazione di micotossine presenti [7].

Un metodo promettente ma non ancora utilizzato per quanto riguarda la riduzione del contenuto di aflatossine presenti è l'essiccazione con vapore surriscaldato. Questa applicazione prevede l'utilizzo di vapore surriscaldato in sostituzione dell'aria calda. Il vapore viene reso surriscaldato andando a fornire calore sensibile così che la sua temperatura superi quella del punto di saturazione a una data pressione. L'utilizzo di vapore surriscaldato ha il vantaggio di essere a temperature superiori rispetto all'aria calda e di poter, quindi, realizzare in modo efficace la riduzione del contenuto di aflatossine, oltre che effettuare un più rapido essiccamento [7]. È stato realizzato uno studio in cui è stata testata questa tecnica e sono stati analizzati gli effetti che l'essiccazione con vapore surriscaldato ha nei confronti di micotossine prodotte da *Fusarium* nel grano. Utilizzando vapore a 185°C e per una durata del processo di 6 minuti, si è osservata una riduzione del 52% del contenuto di micotossina oltre che una completa rimozione dell'acqua presente nel campione [43].

2.3.4.5 Quinta fase

L'ultima fase è lo stoccaggio in cui si accumula il prodotto per un tempo più o meno lungo ad esempio all'interno di silos. In questa fase, un eventuale sviluppo di micotossine è da imputare a contaminazioni fungine avvenute negli stadi precedenti del processo produttivo oppure a manipolazioni non adeguate del prodotto. Le specie principalmente coinvolte appartengono ai generi *Penicillium* e *Aspergillus*, funghi in grado di crescere quando il contenuto di umidità (RH) è compreso tra il 70% e il 90% a una temperatura ottimale compresa tra 25 e 35°C [4]. In uno studio, è stata valutata l'influenza delle condizioni di umidità e temperatura sullo sviluppo di micotossine in nocciole artificialmente infettate con *A. parasiticus*. In nocciole conservate a 15°C a valori di RH pari a 85, 90, 98% non è stata rilevata la presenza di micotossine. All'aumentare della temperatura fino a 28°C e in condizioni di umidità di 85%, è stata osservata la presenza di aflatossine dopo 28 giorni di stoccaggio (11,1 µg/kg di aflatossine totali B1+G1). In presenza di RH pari a 98% il quantitativo di aflatossine totali (B1+B2+G1+G2) è nettamente superiore e pari 821,4 µg/kg. Questo studio ha confermato come condizioni di umidità superiori al 70% accoppiate a temperature di conservazione maggiori di 25°C, siano responsabili di un aumento della concentrazione di aflatossine [44].

Inoltre, ulteriori fattori che possono contribuire in modo sinergico a un incremento della contaminazione sono: la quantità di aria, e quindi di ossigeno presente all'interno dei silos, la composizione del prodotto in termini di nutrienti che il fungo può sfruttare per crescere, la durata dello stoccaggio e le condizioni igieniche.

Dal momento che i funghi aflatossigeni sono per la maggior parte aerobi obbligati, la conservazione di nocciole all'interno di silos in cui è presente ossigeno sembra essere la condizione che più favorisce lo sviluppo di micotossine. Per questo motivo sono stati realizzati diversi studi aventi l'obiettivo di analizzare come, l'applicazione di atmosfere modificate all'interno dei silos di stoccaggio, possa avere un effetto positivo sulla riduzione delle concentrazioni di micotossine [37]. La creazione di atmosfere modificate consiste nell'andare a sostituire l'aria presente nello spazio di testa del silos, a contatto con i prodotti alimentari con un gas come azoto o anidride carbonica.

È stato realizzato uno studio in cui, al variare delle condizioni di stoccaggio, si è visto come cambiava la qualità delle nocciole. Le diverse condizioni testate erano le seguenti: nocciole in guscio a temperatura ambiente (10-26°C) e RH pari a 60-80%, nocciole sgusciate conservate a 4°C e 55% RH con possibile creazione di atmosfera modificata (99% azoto, 1% ossigeno). L'analisi ha dimostrato che l'utilizzo di basse temperature, eventualmente accoppiate alla presenza di atmosfere modificate, garantisce un maggiore mantenimento della qualità del prodotto come conseguenza di una riduzione dei

fenomeni di ossidazione lipidica [45]. Infatti, un fenomeno indesiderato che è possibile che si verifichi durante lo stoccaggio è l'idrolisi e l'ossidazione dei lipidi presenti nelle nocciole. Questa reazione chimica provoca fenomeni di irrancidimento consistenti nella perdita delle proprietà organolettiche delle nocciole con lo sviluppo di odori e aromi indesiderati. Inoltre, si verifica anche una perdita nel contenuto nutrizionale [37]. Tuttavia, dallo studio riportato non è stato possibile ricavare una correlazione tra le diverse condizioni di stoccaggio e la formazione di micotossine.

In conclusione, dalle ricerche condotte è stato possibile trovare conferma del fatto che le condizioni di stoccaggio che assicurano una ridotta possibilità di sviluppo di micotossine sono:

- $RH < 70\%$
- Temperatura bassa e costante, minore di 20°C

Risulta quindi fondamentale monitorare continuamente tali parametri ed effettuare campionamenti periodici per la valutazione della qualità del prodotto. Infatti, grazie a controlli periodici è possibile agire immediatamente nel caso in cui si verificassero problemi [4].

2.3.5 *Detossificazione e decontaminazione*

Sulla base di quanto esposto nel Cap. 2.3.3 e 2.3.4, appare evidente come la soluzione migliore per evitare la presenza di micotossine sia agire nelle fasi iniziali del processo produttivo. Tuttavia, si è visto come questo non assicuri una totale assenza di micotossine. Inoltre, a causa dell'eterogeneità delle micotossine, risulta complesso individuare un unico metodo in grado di rimuoverle tutte in modo efficace e in ugual misura. I metodi di decontaminazione utilizzati sono di tipo fisico, chimico e biologico e devono possedere alcune caratteristiche [4]:

- Capacità di rimuovere le micotossine e allo stesso tempo anche le eventuali spore fungine
- Capacità di mantenere i valori nutrizionali del prodotto
- Possibilità di essere applicato in modo semplice ed economico, senza il pericolo di rovinare le apparecchiature

Il metodo di decontaminazione ideale dovrebbe consentire allo stesso tempo l'eliminazione delle micotossine in modo permanente, non dovrebbe provocare la formazione di sottoprodotti indesiderati e tossici e, infine, dovrebbe garantire il mantenimento delle proprietà organolettiche e nutritive dell'alimento. Tuttavia, al momento, non esistono ancora metodi in grado di assicurare tutte queste caratteristiche; anche se il metodo di decontaminazione biologico risulta essere quello che più si avvicina all'essere un metodo ideale [33].

La **decontaminazione fisica** consiste nella separazione del materiale danneggiato e contaminato da quello intatto. Essa può anche prevedere l'utilizzo di elevate temperature (trattamento termico) o di radiazioni a diversa lunghezza d'onda (irraggiamento) [4]. Le lunghezze d'onda delle principali radiazioni utilizzate sono: 10^{-5} - 10^{-1} nm per i raggi gamma, 10^2 - $4 \cdot 10^2$ nm per i raggi UV, 10^6 - $3 \cdot 10^8$ nm per le microonde.

Tuttavia, i metodi termici non costituiscono la scelta migliore per la distruzione delle micotossine. Come precedentemente anticipato, dal momento che esse sono estremamente resistenti alle alte temperature, vi è la necessità di allungare i tempi del trattamento e questo si traduce in una maggiore possibilità di danneggiare l'alimento dal punto di vista dei valori nutrizionali e delle proprietà organolettiche [4].

Dall'altro lato, l'utilizzo di metodi radiativi ha il vantaggio di assicurare una rimozione più efficace delle micotossine. L'utilizzo di radiazioni a diversa lunghezza d'onda, ionizzanti come i raggi gamma e non-ionizzanti come i raggi UV, le microonde e le radiazioni solari, consente di ridurre sia il quantitativo di micotossine sia di microrganismi. Tuttavia, l'applicazione di radiazioni ionizzanti, caratterizzate da alta energia (10 keV-10 MeV), può provocare una mutazione nel materiale genetico a causa del loro elevato grado di penetrazione nella materia. Ad oggi, questa pratica di decontaminazione è ancora poco diffusa e la massima dose di radiazione a cui si può sottoporre un alimento è pari a 10 kGy, soglia approvata dalla Comunità Europea e ritenuta sicura per la salute umana dal FAO/IAEA/WHO Expert Committee [33].

Il secondo metodo è la **decontaminazione chimica**. Esso prevede l'utilizzo di composti quali acido cloridrico, ozono, perossido d'idrogeno e sostanze naturali come spezie, erbe ed eventuali estratti. Tali sostanze sono addizionate direttamente all'alimento o nel suo *packaging*. Si può ricorrere all'utilizzo di acidi forti o acidi deboli ma, dal momento che la maggior parte delle micotossine non viene danneggiata dal trattamento con acidi deboli, l'utilizzo di acidi forti risulta l'unica opzione. D'altro canto, il trattamento con acidi forti può provocare la formazione di composti tossici o metaboliti delle micotossine [33].

Il trattamento con ozono, approvato dalla Food and Drug Administration nel 2001 come metodo efficace per la rimozione di microrganismi durante i processi produttivi alimentari, se da un lato risulta vantaggioso per la rimozione delle micotossine in quanto agisce sul doppio legame degli alcheni presenti nella loro struttura chimica, dall'altro necessita di un tempo maggiore per essere efficace e può provocare una diminuzione della qualità dell'alimento dovuta a una sua possibile ossidazione. Uno studio condotto nel 2013, ha evidenziato che il trattamento con ozono, a 50 mg/L per 60 h, ha consentito la rimozione dell'89,4% dell'aflatossina B1 presente nelle arachidi [46].

Anche questa tipologia di trattamento non è del tutto sicura a causa dei rischi per la salute provocati dai sottoprodotti che si creano [4].

Gli svantaggi dei metodi chimici e fisici hanno richiesto la necessità di applicare metodi di **decontaminazione biologica**. In questo modo, tramite microrganismi come batteri, lieviti, muffe, è possibile degradare le micotossine a sostanze meno dannose. Questi metodi sono poco costosi ma richiedono maggiore tempo per realizzare la degradazione [4].

I principali microrganismi utilizzati sono i batteri lattici e il lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Essi realizzano la rimozione delle micotossine trasformandole in altri composti meno tossici. Il principale vantaggio di questo metodo risiede nel fatto che, a differenza di quanto succede applicando i metodi di decontaminazione tradizionali, chimici e termici, non si ha la formazione di sottoprodotti tossici [33].

Diversi studi si sono concentrati sull'utilizzo di *S. cerevisiae* come lievito in grado di ridurre il quantitativo di OTA presente nel vino. La contaminazione deriva dalla presenza di ceppi di *Aspergillus* e *Penicillium* sui grappoli dell'uva. *S. cerevisiae* viene utilizzato come agente fermentativo durante il normale processo produttivo del vino e durante la fermentazione si è osservata una riduzione del contenuto di OTA. La capacità detossificante di *S. cerevisiae* deriva dalla struttura chimica dei composti costituenti la parete cellulare, come chitina e β -glucani, che riescono a legare le molecole di OTA e ad assicurarne la rimozione. L'utilizzo di *S. cerevisiae* come agente detossificante prevede a volte l'inattivazione del lievito tramite l'applicazione di calore e l'utilizzo dei componenti della parete cellulare come agenti in grado di adsorbire le micotossine. Uno studio ha dimostrato

come l'utilizzo di miscele di chitina e β -glucani consenta la riduzione del quantitativo di OTA presente nel vino del 64-74% [47].

Tra i metodi di decontaminazione biologica, suscita interesse la catalisi enzimatica che, per ridurre il quantitativo di micotossine presenti, prevede l'utilizzo di enzimi quali lattasi e perossidasi. Gli enzimi, essendo altamente specifici, riuscirebbero a interagire in modo efficace con le micotossine da rimuovere. Sebbene l'utilizzo di questo metodo risulti, ad oggi, molto promettente non sono ancora stati realizzati studi specifici per individuarne le modalità di attuazione. Inoltre, andrebbero anche analizzate le possibili interazioni tra gli enzimi utilizzati per detossificare l'alimento e quelli presenti e aggiunti nell'alimento stesso durante il processo produttivo. Al momento, non essendo ancora stati realizzati gli studi che comprovano la sicurezza e l'efficacia dell'utilizzo di questo metodo per la rimozione delle micotossine dagli alimenti, non è stato approvato nessun enzima da parte dell'Unione Europea [33].

2.3.6 *Metodi analitici per la determinazione della contaminazione*

La determinazione del grado di contaminazione è una fase cruciale ed è costituita da più operazioni svolte in serie. È altresì vero che l'analisi delle micotossine presenti è molto complessa a causa dei quantitativi estremamente ridotti di tali sostanze, dell'ordine dei μg , e della loro eterogeneità dal punto di vista chimico. Per tale ragione esistono diversi metodi che consentono di rilevarne la presenza e che si differenziano tra loro a seconda della capacità di rilevare una specifica micotossina o classe di micotossine [4].

In prima istanza, si realizza un *campionamento* della materia prima da sottoporre a successiva analisi. La fase di campionamento è fondamentale ad assicurare che l'analisi sia corretta e che i valori di contaminazione individuati siano quelli effettivamente presenti [48].

Infatti, una sottostima della concentrazione di micotossine presenti potrebbe risultare molto pericolosa mentre una sovrastima porterebbe ad avere scarti di prodotto eccessivi. Per tale ragione il campionamento viene realizzato dopo aver miscelato il lotto da analizzare così da assicurarne il più possibile un certo grado di omogeneità.

In seguito, si effettua l'*estrazione* delle micotossine presenti tramite estrazione liquido-liquido. La necessità di realizzare questo passaggio deriva dal fatto che la concentrazione di micotossine risulta molto bassa e la loro quantificazione deve essere molto accurata [48].

L'estrazione liquido-liquido si basa sulla capacità di un soluto di essere trasferito da una fase liquida a un'altra fase liquida immiscibile con la prima. Le fasi liquide possono essere acquose o di tipo organico e la scelta del tipo di solvente dipende dalla natura polare o apolare delle micotossine. Micotossine polari saranno estratte più facilmente servendosi di un solvente organico (esano, cicloesano) addizionato con acqua, al contrario micotossine apolari saranno agevolmente estratte con soli solventi organici. Di solito per le aflatossine si utilizza un solvente organico (acetone, esano, cloroformio o metanolo) miscelato con acqua. Per l'ocratossina A si utilizza come solvente una miscela metanolo-acqua [48].

Nel caso specifico delle micotossine, solitamente si preferisce realizzare la loro separazione sfruttando una interazione antigene-anticorpo ovvero realizzando una cromatografia di affinità. La fase stazionaria, infatti, è costituita da anticorpi che instaurano un legame con le micotossine. L'interazione tra antigene e anticorpo deve essere selettiva, molto specifica e reversibile. Sfruttando la reversibilità del legame antigene-anticorpo, si realizza il successivo distacco dei contaminanti trattenuti dalla fase solida tramite lavaggio

con una soluzione denaturante l'anticorpo. Le soluzioni principalmente utilizzate sono costituite da glicina e HCl (0,1M) a pH 2-3. La denaturazione dell'anticorpo è reversibile e, una volta denaturato l'anticorpo e favorito il distacco dell'antigene, si riporta il pH a un valore prossimo alla neutralità così da favorire il *refolding* dell'anticorpo nella sua forma nativa [49].

Dopo aver realizzato l'estrazione delle micotossine si effettua la loro *determinazione*. Anche per questo *step* ci si avvale di tecniche cromatografiche come l'HPLC (High Precision Liquid Chromatography) spesso accoppiata a spettrometria di massa (MS) o a rilevatori a raggi ultravioletti (UV) e fluorescenza (FLD). Tuttavia, l'utilizzo di tecniche come questa, sebbene consenta di ottenere risultati precisi, comporta costi elevati e tempi lunghi. Per questo motivo viene per lo più utilizzata dopo aver rimosso la maggior parte delle sostanze indesiderate tramite tecniche meno onerose. Pertanto, si prediligono tecniche diverse, più semplici e rapide da applicare quali [48]:

- Test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
- Test a flusso laterale – LFD (Lateral Flow Detection)
- Cromatografia su strato sottile – TLC (Thin Layer Chromatography)

Il metodo ELISA è un test di immunoassorbimento enzimatico, basato su reazioni instauratesi tra un antigene e un anticorpo. Il vantaggio di questo tipo di metodo è l'elevata selettività e specificità. Inoltre, questa pratica è veloce, efficiente e i costi sono ridotti. I test ELISA sono per lo più identificati come test qualitativi e, affinché si abbia una maggiore sicurezza sulla concentrazione di contaminanti così rilevati, è sempre opportuno effettuare un'ulteriore verifica tramite metodi più accurati come la HPLC [4].

Il secondo metodo (LFD) si basa sulla capacità di rilevare in pochi minuti la presenza di una sostanza specifica in un campione grazie all'utilizzo di strisce reattive immunocromatografiche. Il principio alla base del test è una interazione antigene-anticorpo. Una striscia assorbente che contiene molecole di anticorpi viene messa a contatto con il campione liquido contenente eventualmente l'analita di interesse (antigene). Nel caso in cui nel campione liquido sia effettivamente presente l'antigene, si può osservare sulla striscia reattiva la comparsa di una linea colorata. Sebbene questo metodo sia molto rapido, poco costoso ed efficace nella determinazione della presenza di analiti di interesse quali le micotossine, non consente di quantificare direttamente le concentrazioni dei contaminanti, le quali possono essere determinate con analisi successive [50].

La TLC è una tecnica cromatografica di ripartizione che prevede l'utilizzo di una piastra di gel di silice contenente degli standard di riferimento e costituente la fase stazionaria. La fase mobile è costituita da un solvente (cloroformio-acetile in rapporto v/v 9:1, dietil etere-metanolo-acqua in rapporto v/v/v 96:3:1) che viene posto in una camera cromatografica. Lo svolgimento del test prevede che sulla lastra cromatografica venga depositato e successivamente assorbito il campione da analizzare. La lastra contenente il campione assorbito viene immersa nella camera cromatografica contenente la fase mobile. Il solvente per diffusione risale lungo la lastra e si ha la separazione dei singoli componenti che costituiscono la fase stazionaria. Infatti, ogni specie si muoverà lungo la lastra seguendo il flusso del solvente con una velocità diversa in base al coefficiente di ripartizione, il quale definisce le proporzioni con cui una data specie si suddivide tra due fasi immiscibili. Quando il solvente raggiunge l'estremità opposta della lastra si ritiene conclusa la corsa cromatografica. La lastra è rimossa dalla camera cromatografica e, una volta asciugatasi, viene trattata con sostanze che, interagendo con le molecole separate, rendono visibile il percorso compiuto da ogni specie. Successivamente per confronto con gli standard si riesce

a individuare ogni singola sostanza presente in quanto si assume che specie che hanno percorso la stessa distanza abbiano le stesse caratteristiche [48, 49].

La scelta della tecnica più adatta da applicare dipende da vari aspetti, tra cui la semplicità e velocità di realizzazione e i costi, i quali devono rendere possibile la ripetibilità dell'analisi senza ingenti spese.

2.3.7 Limiti legislativi

Nell'Unione Europea l'organo deputato al controllo degli aspetti legati alla sicurezza alimentare è l'EFSA (European Food Safety Authority). L'attività svolta dall'EFSA ha l'obiettivo di salvaguardare la vita e la salute di uomini e animali, avendo anche la giusta cura nei confronti di piante e ambiente. Nell'ambito della sicurezza alimentare, tale organo si occupa anche di effettuare una valutazione del rischio legato all'esposizione alle micotossine. Tale valutazione viene realizzata considerando classi specifiche di popolazione che possono essere esposte al rischio in misura diversa. L'EFSA realizza la valutazione del rischio servendosi dei dati che ogni stato fornisce in seguito a monitoraggi periodici eseguiti in accordo con specifiche direttive europee [51].

La gestione del rischio è invece un aspetto di cui si occupa ciascuno Stato membro: sulla base delle informazioni scientifiche fornite dall'EFSA, ogni stato emana un regolamento in cui sono sanciti i massimi livelli tollerabili di micotossine [51].

Nello specifico vengono definiti dei limiti massimi di micotossine tollerabili in relazione al tipo di alimento e al tipo di contaminante. Attualmente si fa riferimento al regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 e si riporta di seguito la tabella (**Tabella 1.9**) riportante i tenori massimi di aflatossine in termini di $\mu\text{g}/\text{kg}$ [52].

Tabella 1.9: tabella con i tenori massimi di aflatossine - Tratto e modificato da [52]

Prodotti alimentari	Concentrazioni massime di AF ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	B1	B1+B2+G1+G2
Nocciole da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego come ingredienti di prodotti alimentari	8	15
Nocciole destinate al consumo umano diretto o all'impiego come ingredienti di prodotti alimentari	5	10

Si precisa che i valori riportati in **Tabella 1.9** si riferiscono alla sola parte commestibile del frutto. Inoltre, l'aflatossina B1 viene anche considerata singolarmente poiché è quella più frequentemente presente.

Noti i valori massimi, il Regolamento stabilisce ulteriori regole da seguire. In particolare, nell'Art.3 si specifica che nel caso in cui prodotto avesse una contaminazione superiore ai limiti questo non è miscelabile con altri prodotti rispettanti i tenori massimi.

Inoltre, i prodotti da sottoporre a cernita non possono essere miscelati con altri già pronti al consumo. Infine, non è consentita la detossificazione mediante metodo chimico [52].

Negli anni seguenti sono state apportate delle modifiche al Regolamento ed è stata emanata la versione N. 165/2010 del 26 febbraio 2010. La revisione è stata redatta in seguito a uno studio in cui l'EFSA ha valutato l'effetto di un innalzamento della soglia massima di aflatossine totali (B1, B2, G1, G2) da 4 µg/kg a 10 µg/kg per frutta a guscio diversa da nocciole, mandorle e pistacchi. Dalle analisi condotte dall'EFSA si è visto che un innalzamento delle soglie massime non influisce negativamente sulla salute umana. Inoltre, un aumento di tali valori ha un ulteriore risvolto positivo ovvero il fatto di poter commercializzare in modo più semplice i prodotti in tutto il mondo; potendo così acquistare alimenti anche da paesi in cui i limiti vigenti sono diversi e meno stringenti. In ogni caso, è sempre opportuno cercare di non raggiungere il tenore massimo in modo da porsi in maniera cautelativa nei confronti di questa tipologia di contaminazioni [53].

Similmente all'Europa, anche negli Stati Uniti è presente un ente deputato al controllo della sicurezza dei prodotti alimentari ossia la Food and Drug Administration (FDA). All'interno di un documento emanato dalla FDA nell'agosto 2000 è stabilita una soglia di sicurezza per il contenuto di aflatossine totali (B1, B2, G1, G2) pari a 20 µg/kg [54], valore doppio rispetto a quello europeo pari a 10 µg/kg.

2.4 Scopo della tesi

Il lavoro di tesi sperimentale si pone l'obiettivo di osservare se su nocchie comuni, poste in condizioni ottimali di crescita, possa svilupparsi biomassa di origine fungina. A tal fine si è monitorata l'attività respiratoria, espressa in termini di CO₂ prodotta e O₂ consumato, dei microrganismi presenti e si è correlata indirettamente tale attività alla crescita della biomassa e allo sviluppo di aflatoxine.

In ultima analisi, individuata la correlazione tra l'attività respirometrica e le concentrazioni delle aflatoxine, è possibile utilizzare i risultati ottenuti come valori di riferimento su cui basarsi per previsioni future; avendo una indicazione dei momenti in cui è necessario intensificare il monitoraggio respirometrico. L'attività sperimentale svolta si è incentrata su come la creazione di condizioni costanti di temperatura e umidità, possa favorire lo sviluppo di biomassa e la conseguente formazione di aflatoxine.

Per il monitoraggio dell'attività respiratoria dei funghi sono stati opportunamente allestiti dei sistemi chiusi, microcosmi, in cui si è incubato un *monolayer* di nocchie. I microcosmi utilizzati sono bottiglie in vetro in forma tronco-conica, con un volume pari a 1,050 L. A seconda delle prove sperimentali, ci si è serviti di due diverse configurazioni e una di queste ha previsto la presenza del Respirometric Sensor (VELP Scientifica).

Per tutte le prove sperimentali, la determinazione della CO₂ prodotta (sezione 3.6.1) è stata periodicamente realizzata per mezzo della sua cattura da parte di una soluzione di NaOH, presente in ogni microcosmo, e successiva titolazione acido-base.

La quantificazione dell'O₂ consumato (sezione 3.6.2) è stata realizzata grazie al Respirometric Sensor che ha consentito di valutare la velocità specifica di consumo dell'O₂ (RO₂), in funzione della variazione di pressione interna al microcosmo.

La valutazione del grado di contaminazione da aflatoxine presenti su nocchie sottoposte a diversi periodi d'incubazione è stata realizzata con un *kit* ELISA commerciale che permette una quantificazione accurata, rapida e poco costosa (sezione 3.7).

3 Materiali e metodi

Nel seguente capitolo saranno descritte, in una prima parte, le nocciole utilizzate nell'attività sperimentale e, in seguito, ci si soffermerà sulle analisi che hanno permesso la caratterizzazione delle nocciole dal punto di vista della morfologia (valutazione dimensionale), dal punto di vista chimico-fisico (valutazione del pH e del contenuto di umidità percentuale) e microbiologico.

Successivamente, sono espone le fasi di allestimento dei microcosmi utilizzati e le tipologie di analisi respirometriche effettuate. Infine, si descrivono la metodologia di determinazione delle aflatossine totali presenti in campioni diversi di nocciole.

3.1 Nocciole

Gli esperimenti realizzati hanno previsto l'uso di nocciole distribuite comunemente sul mercato. Tali nocciole si presentano sgusciate e tostate (**Figura 3.1**). La confezione in cui vengono commercializzate è realizzata in PET e, grazie alla presenza della tecnologia brevettata Safe-T-Fresh®, si riesce a garantire la richiudibilità della confezione, mantenendo la freschezza del prodotto [55]. Per le prove realizzate ci si è serviti di nocciole conservate a temperatura ambiente pari a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e di nocciole conservate a 4°C .



Figura 3.1: esempio di nocciole della confezione

3.2 Caratterizzazione morfologica

È stata effettuata un'analisi morfologica su 20 nocciole scelte in modo casuale con l'obiettivo di evidenziarne le caratteristiche principali.

Se si considera la tipica forma di una nocciola, come mostrato in **Figura 3.2**, è possibile individuare tre dimensioni caratterizzanti ovvero lunghezza (A), larghezza (B) e profondità (C) [56].

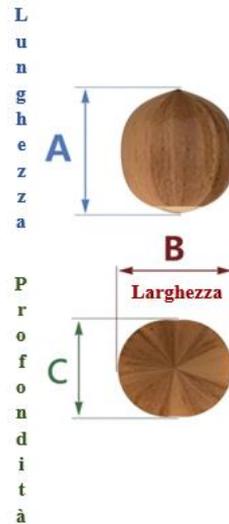


Figura 3.2: Dimensioni caratterizzanti la nocciola, tratto e modificato da [56]

Dopo aver misurato tramite un calibro le tre dimensioni di ogni nocciola, è stato possibile calcolare l'indice di rotondità ($I.R.$) (2), ovvero un indice compreso tra 0 e 1 per il quale tanto più il valore è prossimo all'1, tanto più la nocciola risulta tonda. Si è anche calcolato il diametro medio (D_p) (3), a partire dal quale è stato possibile ricavare la percentuale di sfericità (Φ) (4), parametro che indica quanto la nocciola risulta sferica [56]:

$$I.R. = \frac{B+C}{2 \cdot A} \quad (2)$$

$$D_p = (A \cdot B \cdot C)^{1/3} \quad (3)$$

$$\Phi = 100 \cdot \frac{D_p}{A} \quad (4)$$

3.3 Caratterizzazione chimico-fisica

3.3.1 Valutazione del pH

Al fine di valutare il pH, sono stati pesati tramite bilancia di precisione 10 g di nocciole. Vi è stata aggiunta acqua distillata in volume pari a 25 ml. Quindi, il contenuto del becker è stato posto in agitazione per due ore, trascorse le quali si sono attesi circa dieci minuti prima di effettuare la misurazione.

La valutazione del pH della fase liquida è stata realizzata senza separare le nocciole dal liquido e immergendo la sonda direttamente all'interno del becker contenente le nocciole.

3.3.2 Valutazione del contenuto di umidità percentuale

Il contenuto di umidità percentuale è stato valutato considerando una massa di $16 \pm 0,33$ g di nocciole (peso umido). Sono state realizzate cinque repliche, a partire dalle quali si è calcolato il valore medio.

Ogni campione di nocciole è stato posizionato all'interno di un contenitore di alluminio, posto successivamente in stufa per 24 h. Trascorse le prime 24 h, ogni campione è stato pesato, valutando così il peso secco, ed è stato riposto in stufa per altre 24 h, trascorse le quali si è pesato nuovamente il campione. Si è proceduto in questo modo fino a quando non è più stata rilevata alcuna variazione del peso delle nocciole. È stato possibile calcolare il contenuto di umidità percentuale come segue (5):

$$\text{Umidità percentuale} = \frac{\text{Peso umido} - \text{Peso secco}}{\text{Peso umido}} \cdot 100 \quad (5)$$

3.4 Caratterizzazione microbiologica

Sono state realizzate anche delle prove di caratterizzazione microbiologica della biomassa, con l'obiettivo di individuare quella presente in origine sulle nocciole, ovvero prima dell'incubazione. Sono state prese in esame, infatti, nocciole denominate *nuove* in quanto derivanti da una confezione aperta al momento della caratterizzazione, nocciole *vecchie* derivanti da una confezione aperta 2 mesi prima e nocciole *vecchie* ma risalenti a una confezione aperta da 5 mesi.

Ci si è serviti di piastre di Petri da 9 cm di diametro contenenti il terreno di coltura Malt Extract Agar (MEA). Questo si presenta come un terreno di coltura adatto all'isolamento, alla coltivazione e al conteggio di lieviti e muffe. Il terreno è costituito da diversi componenti fondamentali ad assicurare la presenza dei nutrienti necessari alla crescita microbica ossia D(+) glucosio (20 g/L), estratto di malto (20 g/L), peptone per batteriologia (2 g/L) e agar (20 g/L). Il glucosio è una fonte di carbonio, elemento che rappresenta uno dei macronutrienti più importanti insieme a ossigeno, azoto, idrogeno, fosforo e zolfo. L'estratto di malto, invece, è una fonte di vitamine e di nutrienti utili alla crescita microbica. Il peptone rappresenta una fonte essenziale di amminoacidi ed è formato da idrolizzati di proteine di origine animale, vegetale o microbica. L'agar infine è un agente gelificante e solidificante [57].

Il terreno di coltura così preparato ha un pH pari a 6. Tuttavia, nelle prove realizzate ci si è serviti anche di piastre costituite da MEA a pH 4. È stata dunque realizzata un'acidificazione del terreno aggiungendo HCl (1 M) fino al raggiungimento del pH desiderato. Il vantaggio nell'utilizzare un terreno a pH acido risiede nel fatto che in questo modo è possibile limitare la crescita batterica.

In seguito, i due tipi di terreni hanno subito un ciclo di sterilizzazione in autoclave. Terminata la sterilizzazione, si è atteso che il terreno si raffreddasse fino al raggiungimento di circa 45°C e se ne è colato 20 mL in ogni piastra, avendo cura di non provocare la formazione di bolle.

Nel frattempo, si è proceduto all'estrazione della biomassa dalle nocciole. Si è creata una sospensione di nocciole e soluzione fisiologica sterile contenente NaCl 0,85% (NaCl 0,9 g/L) in cui il rapporto tra la quantità di nocciole e il volume di fisiologica può essere variato. L'estrazione è stata protratta per 30 minuti, trascorsi i quali si separano le nocciole dalla soluzione di estrazione servendosi di una pinza da laboratorio [58].

L'inoculo si effettua spargendo tramite micropipetta un volume di 100 µL di sospensione. L'estratto può essere dispensato tal quale oppure diluito con acqua sterile in rapporto v/v di 1:10 o 1:100.

Successivamente, tramite un'ansa sterile si sparge la sospensione su tutta la superficie del terreno in modo omogeneo. Infine, le capsule di Petri vengono chiuse e poste in termostato a 25°C.

Nel caso in esame, sono state realizzate due prove di estrazione di biomassa differenti tra loro per il rapporto tra nocciole e soluzione fisiologica e per le diluizioni della sospensione inoculata.

Nella prima prova il rapporto nocciole/acqua fisiologica sterile è stato di 1 g/9 mL e l'inoculo è stato realizzato con estratto tal quale ed estratto diluito in rapporto v/v 1:10 e 1:100. La prova è stata condotta su piastre MEA a pH 6 e pH 4 (per ogni capsula si è realizzato un duplicato).

Nella seconda prova, le condizioni per la sospensione sono state modificate. Infatti, in questo caso, il rapporto nocciole/fisiologica è stato di 1 g/2 mL e, a differenza della precedente prova, non sono state realizzate diluizioni dell'estratto.

Inoltre, è stato realizzato un campionamento superficiale utilizzando delle piastre di Petri commerciali di terreno MEA addizionato di cloramfenicolo, un antibiotico avente l'obiettivo di limitare la carica batterica eventualmente presente. Questa tipologia di piastre viene utilizzata di norma per il campionamento microbiologico di superfici e, dunque, si procede ponendo un *monolayer* di nocciole all'interno di una capsula di Petri e appoggiandovi sopra, con una leggera pressione, la piastra. In questo modo le nocciole aderiscono al terreno e di conseguenza la biomassa presente sulla loro superficie viene trasferita sul terreno. Successivamente anche queste piastre vengono incubate a 25°C. La caratterizzazione microbiologica ha previsto la realizzazione di piastre (ognuna realizzata in duplicato) ottenute a partire da nocciole *nuove*, *vecchie* di 2 mesi e *vecchie* di 5 mesi.

3.5 Allestimento dei microcosmi

La crescita microbica è stata monitorata servendosi di sistemi chiusi, microcosmi, allestiti così da ospitare le nocciole. Tali sistemi sono costituiti da bottiglie in vetro in forma tronco-conica con tappo a vite a tenuta (**Figura 3.3**) oppure, in una seconda configurazione, il tappo a vite a tenuta è dotato di un alloggiamento per il sensore (Respirometric Sensor – VELP Scientifica) (**Figura 3.4**). Si riporta, inoltre, un modello 3D delle bottiglie utilizzate e in cui sono indicate, espresse in mm, le quote principali (**Figura 3.5**). Il volume libero delle bottiglie è di 1,050 L.



Figura 3.3:
microcosmo con tappo
a vite a tenuta



Figura 3.4: microcosmo
con tappo a vite a
tenuta e sensore

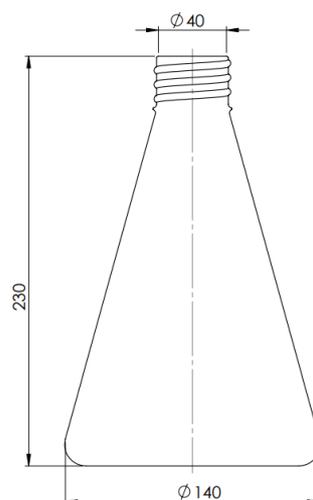


Figura 3.5: dimensioni [mm] della bottiglia

All'interno di tutte le bottiglie utilizzate è stata disposta una rete in materiale polimerico con maglie di dimensione di 3 mm, opportunamente dimensionata così da ricoprire interamente il fondo del sistema. Il supporto risulta fondamentale al fine di garantire la presenza di una superficie di appoggio omogenea per tutte le nocciole in esame, così che lo spazio di testa che separa le nocciole dal tappo a tenuta sia lo stesso per ognuna di esse. Inoltre, nelle prove successivamente presentate le nocciole sono state disposte in monostrato sulla rete in materiale plastico.

L'allestimento dei microcosmi prevede una prima fase di sterilizzazione del materiale in uso ovvero le bottiglie contenenti il supporto polimerico e le provette, successivamente inserite in ogni microcosmo e riempite con una soluzione di NaOH, utile a catturare la CO₂ prodotta, in seguito quantificata con titolazione acido-base. Nel caso di microcosmi con tappo a vite a tenuta (**Figura 3.3**) la provetta viene inserita all'interno della bottiglia e mantenuta a una distanza di 2 cm dalle nocciole. Nel caso di microcosmi dotati di Respirimetric Sensor, la provetta è inserita all'interno di un apposito porta provetta di forma cilindrica, evidenziato in rosso in **Figura 3.4**. Il ciclo di sterilizzazione si realizza in autoclave a 121 °C, per 20 min e alla pressione di 2 atm.

In seguito alla sterilizzazione, operando sotto cappa a flusso laminare, è stato inserito in ogni microcosmo un campione di 38±0,25 g di nocciole (peso secco), mentre sul fondo del sistema è stato addizionato un volume pari a 20 ml di acqua sterile, essenziale a garantire le giuste condizioni di umidità. All'interno della provetta posizionata in ogni microcosmo è stata inserita la soluzione di NaOH (10 ml), preparata utilizzando acqua distillata precedentemente decarbonatata tramite bollitura per circa un'ora.

Terminato l'allestimento del microcosmo, si è proceduto alla sua chiusura servendosi del tappo opportuno e il sistema è stato posto in incubatore a 25°C per periodi di tempo variabili a seconda delle prove, come successivamente specificato nella **Tabella 3.1**. La temperatura d'incubazione è stata scelta sulla base del fatto che riproduce al meglio le condizioni di conservazione casalinghe delle nocciole. Per tutta la durata delle prove la temperatura è stata mantenuta costante.

In alcuni casi, come dettagliato nel paragrafo 3.8, è stato anche allestito un microcosmo abiotico di controllo contenente all'interno nocciole che sono state sottoposte a un ciclo di sterilizzazione in autoclave.

3.6 *Analisi respirometriche*

La stima della crescita dei microrganismi si realizza considerando la loro respirazione ovvero valutando la quantità di CO₂ prodotta e/o di O₂ consumato. Nel primo caso la valutazione viene effettuata tramite cattura della CO₂ in una soluzione di NaOH e successiva titolazione acido-base, nel secondo invece viene determinato il valore di Biochemical Oxygen Demand, BOD.

3.6.1 *Valutazione della CO₂ prodotta all'interno del microcosmo*

La valutazione della CO₂ prodotta all'interno del microcosmo avviene tramite titolazione acido-base e si realizza in entrambe le tipologie di microcosmo (**Figura 3.3** e **Figura 3.4**). Nella seconda configurazione (**Figura 3.4**), è anche necessario inserire 1 g in pastiglie di NaOH all'interno del raccogliatore degli alcali, parte costituente il Respirimetric Sensor.

La titolazione acido-base è una tecnica di analisi di laboratorio che ha l'obiettivo di determinare la concentrazione di un acido o di una base presenti all'interno di una soluzione [59].

Ci si avvale della presenza di un titolante (acido - HCl) e un titolando (base - NaOH) a volume noto. Gradualmente il titolante presente in una buretta da 50 ml viene fatto gocciolare all'interno di un becker contenente il titolando. Si verifica così una reazione acido-base che porta all'ottenimento di un sale (NaCl) e acqua (H₂O) (6):



All'aggiunta progressiva dell'HCl al titolando si verifica una sua variazione del pH. Si continua ad aggiungere il titolante fino al raggiungimento del punto equivalente ovvero il punto in cui le moli di H⁺ derivanti dalla dissociazione dell'HCl equivalgono quelle di OH⁻ derivanti da NaOH [59].

In corrispondenza di questo punto si osserva il viraggio della colorazione della soluzione grazie alla presenza di un indicatore, il quale cambia colore nel momento in cui cambia il pH.

Nel caso in esame, la titolazione si realizza sfruttando la presenza di una soluzione basica di NaOH (3 M) in volume di 10 mL, situata nella provetta all'interno del microcosmo, che serve a catturare la CO₂ prodotta dal sistema. Il volume di soluzione di soda inserita all'interno del sistema è stato scelto sulla base dei precedenti esperimenti.

Si realizza la titolazione acido-base della soluzione di soda presente nella provetta interna al microcosmo servendosi di HCl (1,5 M) in presenza di fenolftaleina, indicatore utile a osservare il viraggio della soluzione, e di BaCl₂, agente precipitante che migliora la percezione visiva del viraggio. Si riesce pertanto a quantificare la CO₂ (mg) prodotta secondo la formula (7) [60]:

$$CO_2 = (V_0 - V) \cdot f \quad (7)$$

Dove:

- V_0 è il volume (mL) di HCl necessario a titolare i bianchi
- V è il volume (mL) di HCl necessario a titolare il campione
- f è un fattore di conversione ottenuto come: $f = 22 \cdot M$ in cui M è la molarità della soluzione di HCl utilizzata.

Effettuata la titolazione, operando sotto cappa a flusso laminare, si tengono aperti i microcosmi per 20 min; in questo modo la biomassa presente all'interno riceve l'ossigeno necessario alla sua crescita. In seguito, si prepara la nuova soluzione di soda da inserire nel microcosmo.

3.6.2 Valutazione dell'RO₂

La quantità di O₂ consumato viene espressa in termini di velocità specifica di consumo di O₂, RO₂, secondo la formula (8) ed è possibile valutarla solo nella seconda configurazione dei microcosmi (Figura 3.4). Infatti, la valutazione dell'RO₂ è stata realizzata grazie al Respirimetric Sensor che consente di monitorare la variazione di pressione [mbar] all'interno del sistema. Il sensore nasce per valutare la respirazione microbica in matrici come terreni e compost in cui grazie a microrganismi naturalmente presenti si realizza la degradazione aerobica delle sostanze organiche costituenti il terreno

[61]. Il Respiriometric Sensor (**Figura 3.6**) fa parte di un sistema, chiamato Respiriometric Sensor System, che comprende, oltre al sensore, il Data Box e il software RespiroSoft. Il Respiriometric Sensor registra le variazioni del BOD e della pressione all'interno del sistema. Il DataBox (**Figura 3.7**), per mezzo di una trasmissione *wireless*, riceve e memorizza i dati registrati dal sensore senza necessità che sia collegato al PC. È possibile, poi, collegare il DataBox al PC e visualizzare i valori registrati tramite l'apposito *software* RespiroSoft.



Figura 3.6: Respiriometric Sensor
– Tratto e modificato da [61]



Figura 3.7: Data Box
– Tratto e modificato da [61]

Sebbene il sensore fornisca i valori di BOD ottenuti in seguito a ogni campionamento, questi non vengono direttamente utilizzati per quantificare il consumo di ossigeno, ma servono ad avere una prima indicazione dell'attività microbica.

L'utilizzo di tale sensore presuppone un settaggio iniziale in termini di massimo valore di BOD [mg/L] misurabile, durata dell'analisi [g] e frequenza di campionamento [h]. L'O₂ consumato nel sistema è valutato in termini di velocità di consumo RO_2 secondo la formula seguente (8):

$$RO_2 = 32000 \cdot V_{fg} \cdot \frac{\Delta P}{t \cdot R \cdot T \cdot m_{sd}} \quad (8)$$

Dove:

- RO_2 è la velocità di consumo di O₂ su una base di massa (peso secco) di nocciole (mgO₂·g⁻¹·h⁻¹)
- 32000 è il peso molecolare dell'ossigeno (mg/mol)
- V_{fg} è il volume di gas libero (L)
- R è la costante dei gas (83,14 hPa·l·mol⁻¹·K⁻¹)
- T è la temperatura di misurazione (K)
- m_{sd} è la massa (peso secco) di nocciole (g)
- ΔP è la riduzione di pressione misurata (hPa)
- t è il tempo trascorso (h)

In questo caso si è assunto V_{fg} pari a 1,125 L, T pari a 298 K e m_{sd} pari a 38 g e corrispondente alla massa di nocciole inserite in ciascun microcosmo. Infine, il tempo trascorso t è stato considerato, a seconda dei casi, di 48h - 72h.

Inoltre, a partire dai valori di RO₂ sono stati calcolati i quantitativi di O₂ e, noti i valori della CO₂ prodotta, è stato possibile calcolare il quoziente respirometrico (QR) come segue (9):

$$QR = \frac{CO_2 \text{ cumulata media}}{O_2 \text{ cumulato medio}} \quad (9)$$

3.7 Valutazione delle micotossine

Nell'ambito dell'attività di ricerca svolta, si è realizzata anche la valutazione delle micotossine, probabilmente prodotte dai funghi sviluppatasi sulla superficie delle nocciole. Ai fini dello svolgimento dell'analisi ci si è serviti di campioni di nocciole derivanti da periodi di incubazione diversi oppure conservate a diversa temperatura (20°C - nocciole *vecchie* di 2 e 4 mesi, 4°C - nocciole *vecchie* di 2 mesi). Si precisa che le nocciole denominate *vecchie* di 2 mesi sono le stesse utilizzate anche per la caratterizzazione microbiologica (sezione 3.4).

3.7.1 Preparazione del campione

La preparazione del campione avviene in fasi successive e prevede in un primo momento operazioni di lavaggio, asciugatura e triturazione.

Operando sotto cappa a flusso laminare, si pesano 10±0,5 g di nocciole per ogni campione e si inseriscono all'interno di una provetta sterile a fondo conico.

Le fasi del lavaggio includono inizialmente la miscelazione delle nocciole, contenute in ogni provetta, con l'acqua sterile, in volume pari a 40 mL. In seguito, il contenuto di ogni provetta viene mantenuto in agitazione per 15 minuti. Si realizza, poi, uno step di centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti. L'operazione di centrifugazione è uno stadio fondamentale che ha come obiettivo quello di *lavare* le nocciole andando a separare la biomassa in eccesso depositata sopra di esse. Al termine dell'operazione si potrà, infatti, notare che sul fondo conico della provetta si sarà depositata la biomassa.

Le nocciole sono rimosse dalla provetta e posizionate in monostrato all'interno di un contenitore in alluminio. I contenitori in alluminio contenenti ciascuno campioni diversi di nocciole sono posti in stufa a 60°C per 24h.

Trascorse 24h, si estraggono i campioni dalla stufa e per ognuno si prelevano circa 10 g di nocciole. Essi vengono successivamente sottoposti a triturazione all'interno di un mulino da laboratorio fino all'ottenimento di una consistenza omogenea.

Terminati questi step preliminari si realizza l'estrazione delle aflatossine dalla matrice triturata. Anche in questo caso sono previste diverse operazioni da realizzare in sequenza:

1. Si prelevano 5 g di nocciole triturate e si inseriscono all'interno di una beuta (**Figura 3.8**). Si aggiungono 25 mL di metanolo al 70% e successivamente si protrae l'estrazione, effettuata su agitatore magnetico, per 10 minuti.
2. Trascorsi 10 minuti si realizza una operazione di filtrazione (**Figura 3.9**) tramite una carta da filtro di tipo qualitativo (Whatman N.1). Si otterrà così un filtrato su cui sarà effettuata la determinazione del contenuto di aflatossine totali.



Figura 3.8:
esempio di beuta
usata per
l'estrazione



Figura 3.9:
esempio di
operazione di
filtrazione

È importante ricordare che i campioni sono fotosensibili. Per questo motivo tutti i contenitori contenenti gli estratti sono stati riparati dalla luce avvolgendoli con un foglio di stagnola.

3.7.2 *Determinazione delle aflatossine*

La quantificazione delle aflatossine totali avviene con un saggio immunoenzimatico competitivo utilizzando un kit ELISA commerciale denominato RIDASCREEN Aflatoxin Total (R-BIOPHARM AG), il quale consente di valutare le aflatossine totali (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) che si sviluppano su una matrice alimentare.

All'interno dei pozzetti della piastra multipozzetto, in dotazione con il *kit*, si dispensano 50 μ L di filtrato opportunamente diluito o gli standard. Successivamente si dispensano in ogni pozzetto l'aflatoxina coniugata con l'enzima e l'anticorpo anti-aflatoxina. In questa fase si crea una competizione per i siti di legame tra l'aflatoxina libera e quella coniugata. Allo stesso tempo gli anticorpi anti-aflatoxina si legano con gli anticorpi di cattura presenti in ogni pozzetto della piastra. Tramite un buffer di lavaggio, si lavano ripetutamente i pozzetti e, in questo modo, si rimuove l'enzima coniugato non legato. In seguito, si inserisce in ogni pozzetto il cromogeno; sostanza che, una volta legata all'enzima, assume una colorazione blu. Infine, si aggiunge una soluzione di stop, la quale consente il viraggio del colore da blu a giallo [62].

A questo punto è possibile, tramite spettrofotometro, valutare l'assorbanza del contenuto di ogni pozzetto a 450 nm. In particolare, risulta che l'assorbimento e la concentrazione di aflatossine sono tra loro inversamente proporzionali. Andando a confrontare i risultati di assorbanza ottenuti con quelli degli standard a concentrazione nota, e grazie ai quali si è realizzata una retta di taratura, si riesce a quantificare la concentrazione di aflatossine nel campione.

3.8 Descrizione delle prove realizzate

Con l'obiettivo di rendere più fruibile la lettura del successivo capitolo 4, relativo alla discussione dei risultati sperimentali, si è deciso di descrivere le principali caratteristiche delle prove sperimentali realizzate. Come precedentemente riportato, dopo aver caratterizzato le nocciole dal punto di vista morfologico, chimico-fisico e microbiologico, sono state realizzate tre prove sperimentali. Dunque, sono stati allestiti microcosmi in cui è stata valutata la CO₂ prodotta, l'O₂ consumato e il quantitativo di aflatoossine totali prodotte. Di seguito si riportano gli **aspetti comuni** alle tre prove sperimentali:

- Geometria e volume dei microcosmi allestiti (bottiglie in vetro di forma tronco-conica con un volume di 1,050 L)
- Uguale quantità di nocciole, peso secco pari a 38±0,25 g.
- Incubazione dei microcosmi alla temperatura costante di 25°C
- Mantenimento delle condizioni di umidità grazie all'aggiunta di 20 mL di acqua distillata sul fondo di ogni microcosmo

A seconda delle prove sperimentali, sono stati allestiti microcosmi in numero diverso e con diverso sistema di chiusura. Ogni prova ha avuto una diversa durata e ogni microcosmo è stato *sacrificato* in seguito a periodi d'incubazione differenti. Le nocciole sacrificate da ogni microcosmo sono state sottoposte alla determinazione del quantitativo di aflatoossine totali. Di seguito vengono descritte, nel dettaglio, le peculiarità di ogni prova sperimentale.

Prima prova:

sono stati allestiti 2 microcosmi, la cui chiusura è stata assicurata dal tappo a vite a tenuta. La prova è durata 49 giorni, durante i quali si è monitorata la produzione della CO₂. I microcosmi sono stati sacrificati in seguito a 49 giorni di incubazione e sono state determinate le concentrazioni delle aflatoossine totali.

Seconda prova:

sono stati allestiti 3 microcosmi, la cui chiusura è stata assicurata dal tappo a vite a tenuta con sensore. In aggiunta, si è allestito un microcosmo adibito al controllo (C), contenente nocciole sterilizzate. La prova è durata 14 giorni, durante i quali si è monitorata la produzione della CO₂ e la velocità specifica di consumo dell'O₂, RO₂. I microcosmi sono stati sacrificati in seguito a 4, 7 e 14 giorni di incubazione e sono state determinate le concentrazioni delle aflatoossine totali.

Terza prova:

sono stati allestiti 6 microcosmi, la cui chiusura è stata assicurata dal tappo a vite a tenuta con sensore. In aggiunta, si è allestito un microcosmo adibito al controllo (C), contenente nocciole sterilizzate. La prova è durata 66 giorni, durante i quali si è monitorata la produzione della CO₂. La velocità specifica di consumo dell'O₂, RO₂, è stata monitorata per i primi 39 giorni d'incubazione. I microcosmi sono stati sacrificati in seguito a 14, 21, 28, 39 e 66 giorni d'incubazione e sono state determinate le concentrazioni delle aflatoossine totali.

Si riassumono nella tabella seguente (**Tabella 3.1**) le caratteristiche principali delle tre prove realizzate:

Tabella 3.1: caratteristiche delle prove realizzate

Prove	Sistema di chiusura dei microcosmi		Numero di microcosmi allestiti	Parametri monitorati		Durata [giorni]	Tempi dei sacrifici e delle determinazioni delle aflatossine [giorni]
	Tappo a vite a tenuta	Tappo a vite a tenuta e sensore		CO ₂ [mg]	RO ₂ [mgO ₂ ·g ⁻¹ ·h ⁻¹]		
Prima	✓		2	✓	✗	49	49
Seconda		✓	3+C	✓	✓	14	4, 7, 14
Terza		✓	6+C	✓	✓	66	14, 21, 28, 39, 66

4 Risultati e discussione

4.1 Caratterizzazione morfologica, chimico-fisica e microbiologica delle nocciole

4.1.1 Caratterizzazione morfologica

Nella seguente immagine (**Figura 4.1**), sono presentate le nocciole oggetto dell'analisi randomica effettuata. Il fatto di aver realizzato una analisi casuale ha comportato la presenza di nocciole rotte. Rispetto al totale delle nocciole esaminate, il 10% è risultato essere spezzato e non intero.



Figura 4.1: Nocciole analizzate

Si riportano i risultati (**Tabella 4.1**) ottenuti per il campione di 20 nocciole caratterizzato morfologicamente.

Tabella 4.1: valori calcolati relativi alla caratterizzazione morfologica delle nocciole

Nocciola	Massa [g]	A [cm]	B [cm]	C [cm]	I. R.	D_p [cm]	Φ [%]
1	1,08	1,3	1,3	1,15	0,942	1,247	95,99
2	0,86	1,15	1,25	1	0,978	1,128	98,14
3	0,955	1,3	1,1	1,15	0,865	1,180	90,79
4	1,012	1,2	1,2	1,1	0,958	1,166	97,14
5	0,896	1,3	1,1	1,1	0,846	1,163	89,46
6	1,103	1,25	1,2	1,3	1	1,249	99,95
7	1,057	1,35	1,25	1,3	0,944	1,299	96,25
8	0,957	1,15	1,25	1,2	1,065	1,199	104,3
9	1,286	1,55	1,4	1,4	0,903	1,448	93,44
10	0,458	1,2	1,2	0,65	0,770	0,978	81,52
11	0,938	1,25	1,25	1,2	0,980	1,233	98,65
12	0,824	1,3	1,25	1,2	0,942	1,249	96,10
13	1,041	1,1	1,25	1,25	1,136	1,198	108,9
14	0,982	1,35	1,2	1,15	0,870	1,230	91,14
15	0,976	1,15	1,3	1,2	1,087	1,215	105,6
16	1,014	1,4	1,3	1,2	0,893	1,297	92,67
17	0,875	1,3	1,2	0,9	0,807	1,119	86,13
18	0,501	1,15	1,3	0,6	0,826	0,964	83,86
19	1,095	1,4	1,15	1,25	0,857	1,262	90,18
20	1,017	1,2	1,4	1,2	1,083	1,263	105,3

Si può osservare come, dal punto di vista della massa, ci sia un certo grado di eterogeneità che si riflette anche nelle tre dimensioni (A, B, C). Di conseguenza anche i parametri calcolati ($I.R.$, D_p , Φ) assumono valori variabili. Questa variabilità nei risultati è da imputare alla casualità con cui sono state scelte le nocciole da analizzare.

Di seguito si riportano (**Tabella 4.2**) i valori medi per ogni parametro valutato con le corrispondenti deviazioni standard σ .

Tabella 4.2: Valori medi di massa, A, B, C, I.R., D_p , Φ con le corrispondenti deviazioni standard σ

Massa $\pm \sigma$ [g]	A $\pm \sigma$ [cm]	B $\pm \sigma$ [cm]	C $\pm \sigma$ [cm]	I. R. $\pm \sigma$	$D_p \pm \sigma$ [cm]	$\Phi \pm \sigma$ [%]
0,9463 \pm 0,189	1,2675 \pm 0,11	1,2425 \pm 0,0799	1,125 \pm 0,202	0,9379 \pm 0,1	1,205 \pm 0,107	95,28 \pm 7,369

Si osserva come l'indice di rotondità sia in media prossimo a 1, valore che fa presupporre che le nocciole analizzate siano di alta qualità. La sfericità, infatti, rappresenta un indice di qualità della nocciola poiché quanto più una nocciola è sferica, tanto più risulta facilmente sottoponibile a rottura, rimozione del perisperma e tostatura [2].

I valori ottenuti sperimentalmente sono stati confrontati con quelli presenti in letteratura e relativi a due tipologie di nocciole: la nocciola “Tonda Gentile delle Langhe”, coltivata in Italia, e la nocciola “Tombul”, coltivata in Turchia. Nella tabella seguente (**Tabella 4.3**), nella seconda e terza colonna, si riportano i valori di riferimento; nella quarta colonna si riportano i valori ottenuti sperimentalmente [2] [63] [64]:

Tabella 4.3: confronto tra i valori trovati in letteratura (dati tratti da [63] [64]) e quelli ottenuti sperimentalmente

	Tombul	Tonda Gentile delle Langhe	Nocciole del presente lavoro
Massa [g]	0,813	1,07	0,946
D_p [cm]	1,204	1,39	1,205
Φ [%]	104,1	101	95,28

Si può notare come le nocciole analizzate nel presente lavoro abbiano una massa che risulta maggiore (0,946 g) rispetto a quella delle nocciole Tombul (0,813 g), ma minore di quella tipica della nocciola Tonda Gentile delle Langhe (1,07 g). Analizzando il diametro medio D_p , si osserva che la tipologia Tombul (1,204 cm) è quella che ha dimensioni più simili alle nocciole in esame (1,205 cm). Infine, per quanto riguarda la percentuale di sfericità Φ , si ha che le nocciole Tombul e le Tonda Gentile delle Langhe superano il 100%. Questo è una indicazione della elevata sfericità che caratterizza queste due tipologie. Tuttavia, anche le nocciole analizzate, hanno una percentuale di sfericità elevata. Quindi, a seconda dei parametri considerati, le nocciole analizzate possono essere ipoteticamente assimilabili a nocciole di provenienza turca o italiana.

4.1.2 Caratterizzazione chimico-fisica: determinazione di pH e contenuto di umidità

È stato valutato il pH delle nocciole secondo la metodologia esposta nel paragrafo 3.3.1. Si è ottenuto un pH pari a 6,2; valore che risulta confrontabile con il valore di pH di riferimento per le nocciole pari a 6,86 [25].

Considerando ora l'umidità, sono state allestite cinque repliche, ognuna con una massa di $16 \pm 0,33$ g. Di seguito si riporta la **Tabella 4.4** riportante i risultati ottenuti.

Tabella 4.4: umidità percentuale

Campioni	Peso umido [g]	Peso secco [g]	Umidità [%]
1	16,29	16,11	1,111
2	16,18	15,99	1,106
3	15,55	15,39	1,048
4	15,78	15,61	1,071
5	15,63	15,46	1,068

Si osserva che per tutti i campioni è stata registrata un'umidità percentuale simile, prossima all'1,1%; valore corrispondente a quello medio mostrato nella successiva **Tabella 4.5**.

Tabella 4.5: umidità media con relativa deviazione standard

Umidità media [%] $\pm \sigma$	1,081 \pm 0,02697
--	---------------------------------------

Nel *Regolamento Europeo N. 1284 del 2002* è stabilito che il seme della nocciola, ovvero il frutto sgusciato, può avere al massimo un tenore di umidità pari al 7%. Andando a confrontare il valore di umidità percentuale ottenuto sperimentalmente (**Tabella 4.5**), pari a 1,1%, con quello massimo consentito, si desume che le nocciole utilizzate nell'attività sperimentale rientrano ampiamente nei limiti consentiti dal *Regolamento Europeo N. 1284 del 2002*. [65]

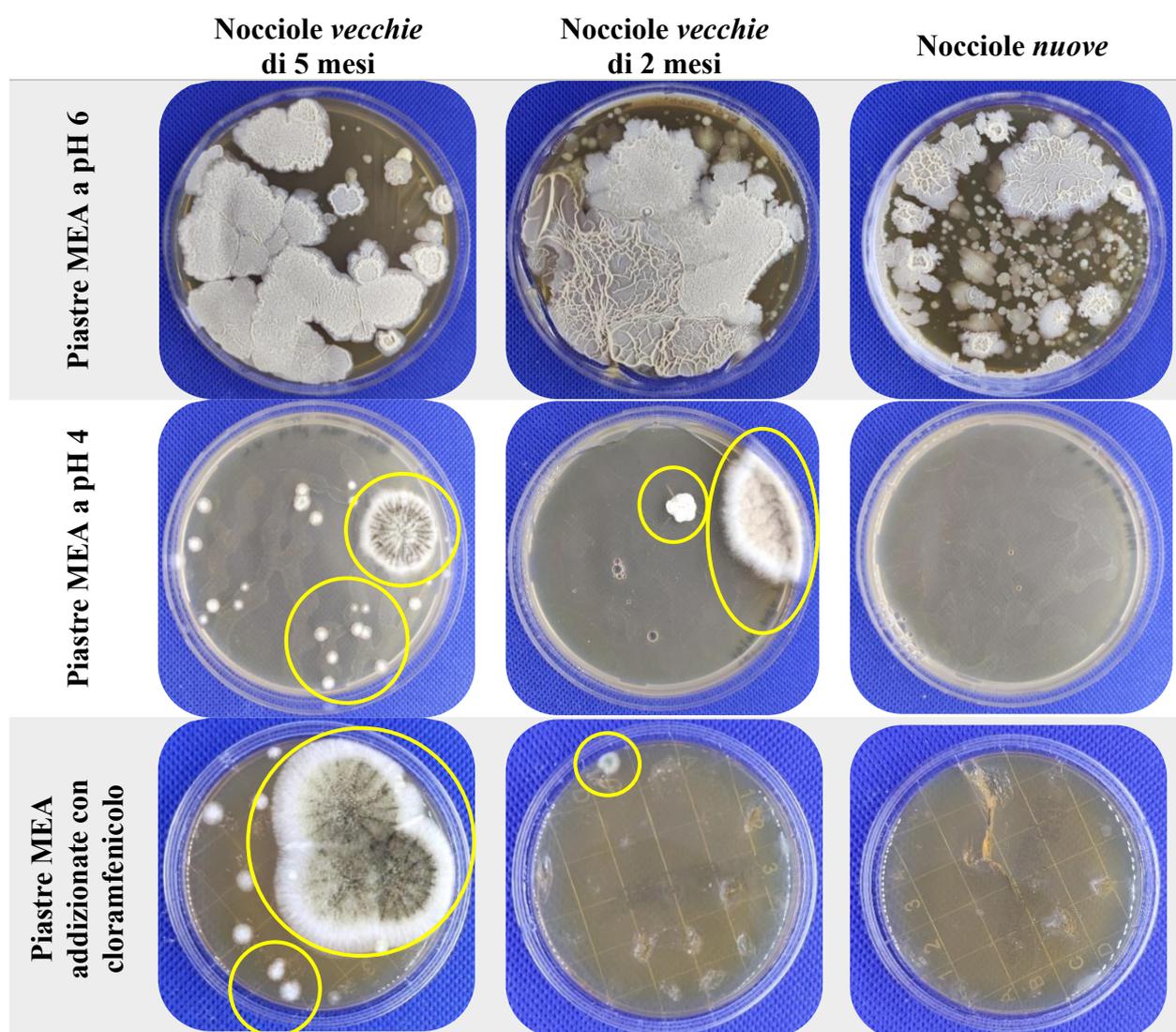
4.1.3 Caratterizzazione microbiologica

Le prove di caratterizzazione microbiologica hanno permesso di individuare la tipologia di microrganismi presenti sulla superficie delle nocciole all'istante iniziale ovvero prima dell'allestimento dei microcosmi. Si riportano di seguito le immagini scattate alle piastre di Petri dopo sette giorni d'incubazione alla temperatura di 25°C. Si realizzano confronti tra le immagini in base alla tipologia di nocciola e in base al pH (pH 4 o pH 6) del terreno MEA costituente la piastra, come descritto in "Materiali e Metodi".

4.1.3.1 Confronto tra piastre

Come esposto in "Materiali e Metodi", sono state realizzate due prove di caratterizzazione microbiologica, diverse tra loro per le condizioni di estrazione applicate. Nel caso della prima prova, in cui il rapporto nocciole/acqua fisiologica sterile era di 1g/9 ml, non è stato possibile osservare alcuna crescita microbica nei successivi 7 giorni. Per tale ragione, le immagini riportate (**Tabella 4.6**) sono relative alla seconda prova realizzata in cui, avendo cambiato il rapporto nocciole/acqua fisiologica sterile in 1g/2 ml, è stato possibile osservare lo sviluppo di microrganismi sulle piastre.

Tabella 4.6: confronto tra piastre incubate a 25°C per 7 giorni



Se si considerano le piastre con terreno MEA a pH 6, si nota che la crescita risulta essere estesa fino a ricoprire la quasi totalità della superficie della piastra, indipendentemente dal tipo di nocciola. La tipologia di biomassa sviluppata sembra essere la stessa e potrebbe essere riconducibile a organismi unicellulari (batteri). Nelle piastre ottenute a partire da nocciole *nuove* sono presenti più colonie di unicellulari rispetto a quelle presenti nelle piastre ottenute da nocciole *vecchie* di 2 e 5 mesi.

Nelle piastre con terreno MEA a pH 4, la biomassa è diversa poiché sono presenti organismi pluricellulari (funghi filamentosi), come si osserva, evidenziato in giallo, nelle piastre realizzate a partire da nocciole *vecchie* di 5 e 2 mesi. Nella piastra ottenuta a partire da nocciole *nuove* non si osservano colonie. L'assenza di microrganismi unicellulari (batteri) è dovuta al fatto che il pH 4 ha un'azione inibente nei loro confronti. Inoltre, le piastre ottenute da nocciole aperte da 2 mesi mostrano un minor numero di colonie rispetto a quelle aperte da 5 mesi. Questo è potenzialmente correlabile al fatto che le nocciole derivanti da confezioni aperte da più tempo hanno subito maggiormente l'esposizione all'ossigeno atmosferico rispetto a quelle ottenute da una confezione più recente e il quantitativo di microrganismi, presenti sulla superficie di nocciole derivanti da una confezione più vecchia, è maggiore.

Allo stesso modo nelle piastre MEA addizionate con cloramfenicolo, ottenute a partire da nocciole risalenti a 5 mesi prima, si osserva che sono presenti microrganismi fungini, la cui quantità decresce considerando nocciole più recenti. Infatti, nella piastra ottenuta a partire da nocciole *vecchie* di 2 mesi la presenza di funghi filamentosi risulta minore rispetto alla piastra realizzata con nocciole di 5 mesi ma maggiore alle piastre ottenute da nocciole *nuove*, in cui non si osservano colonie. Anche in questo caso, similmente a quanto osservato in piastre con terreno MEA a pH 4, l'assenza di microrganismi batterici è dovuta all'azione inibitoria che esercita l'antibiotico (cloramfenicolo) costituente il terreno MEA.

4.2 *Prima prova sperimentale*

Nella prima prova sperimentale, della durata di 49 giorni, sono stati allestiti 2 microcosmi dotati di tappo a vite a tenuta. Le analisi respirometriche effettuate hanno previsto la valutazione della CO₂ prodotta, catturata dalla soluzione di NaOH presente nella provetta all'interno del microcosmo e successivamente quantificata tramite titolazione acido-base. Per tutta la durata della prova i microcosmi sono stati mantenuti in termostato alla temperatura costante di 25°C.

4.2.1 *Analisi quantitativa della CO₂ prodotta*

Si riportano nella **Tabella 4.7** i valori della CO₂ cumulata media prodotta [mg] ottenuti nella prima prova sperimentale con l'avanzare del tempo di incubazione, indicato nella prima colonna, in seguito a titolazione acido-base. Grazie ai valori cumulati medi si ha un'idea complessiva dell'attività respiratoria del sistema a partire dal primo giorno d'incubazione.

Tabella 4.7: CO₂ cumulata media prodotta – Prima prova

Prima prova	
Tempo [giorni]	CO₂ cumulata media [mg]
4	459 ± 23,33
7	970 ± 70,00
10	1469 ± 116,7
14	1994 ± 35,35
16	2497 ± 152,0
18	3111 ± 4,24
21	3548 ± 12,73
23	3957 ± 46,67
25	4469 ± 46,67
28	4898
30	5368 ± 58,34
32	5855 ± 58,34
35	6260 ± 35,0
37	6664 ± 35,0
39	7084 ± 35,9
42	7480 ± 23,3
49	7819 ± 11,6

Nella seguente **Figura 4.2**, si rappresenta l'andamento dei valori presenti in **Tabella 4.7**.

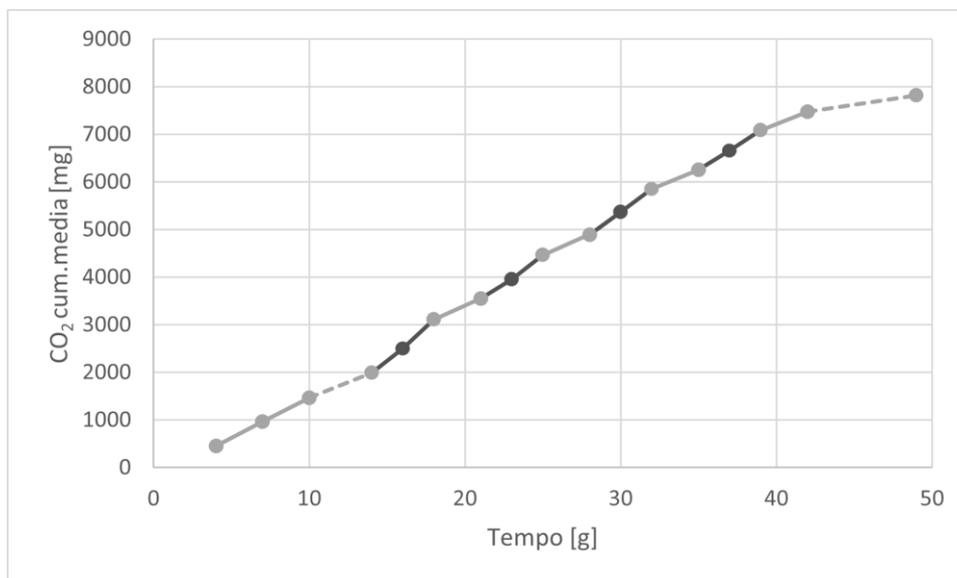


Figura 4.2: andamento della CO₂ cumulata media prodotta – Prima prova

Si osserva che i valori di CO₂ cumulati risultano costantemente crescenti per tutta la durata della prova, ma con pendenze variabili tra i vari tratti.

Osservando l'andamento della **Figura 4.2**, si nota che le pendenze dei vari tratti cambiano a seconda dell'intervallo temporale che intercorre tra una misurazione e la successiva. Questo aspetto può essere confermato considerando i valori delle velocità di produzione della CO₂ ottenuti in ogni tratto. Infatti, i tratti corrispondenti a intervalli temporali di 2 giorni, indicati nella figura con il colore grigio più scuro, mostrano velocità di produzione tra loro simili; allo stesso modo anche i tratti corrispondenti a intervalli temporali di 3 giorni, indicati nella figura con il colore grigio chiaro e la linea continua.

Nella seguente **Tabella 4.8**, si osserva quanto appena esposto in corrispondenza di intervalli temporali tra una misurazione e la successiva di 2 giorni (visibili in tabella con il colore grigio scuro) e di 3 giorni (visibili in tabella con il colore grigio chiaro). Data la confrontabilità dei valori, è stata calcolata una velocità di produzione media della CO₂ di 239 mg/g nel caso di intervalli di 2 giorni e di 149 mg/g in caso di intervalli di 3 giorni.

Inoltre, il tratto compreso tra i giorni 16 e 18 risulta essere quello a maggiore pendenza e dunque quello in cui la velocità di produzione della CO₂ risulta massima e pari a 307 mg/g. In corrispondenza del periodo 16-18 giorni anche la quantità di CO₂ cumulata media subisce un incremento significativo (614 mg) (**Tabella 4.7**).

Tabella 4.8: velocità di produzione della CO₂ associata a intervalli temporali di 2-3 giorni

Intervalli temporali considerati	Velocità di produzione
[g]	[mg/g]
4-7	171
7-10	166
14-16	252
16-18	307
18-21	146
21-23	205
23-25	256
25-28	143
28-30	235
30-32	243
32-35	135
35-37	202
37-39	210
39-42	132

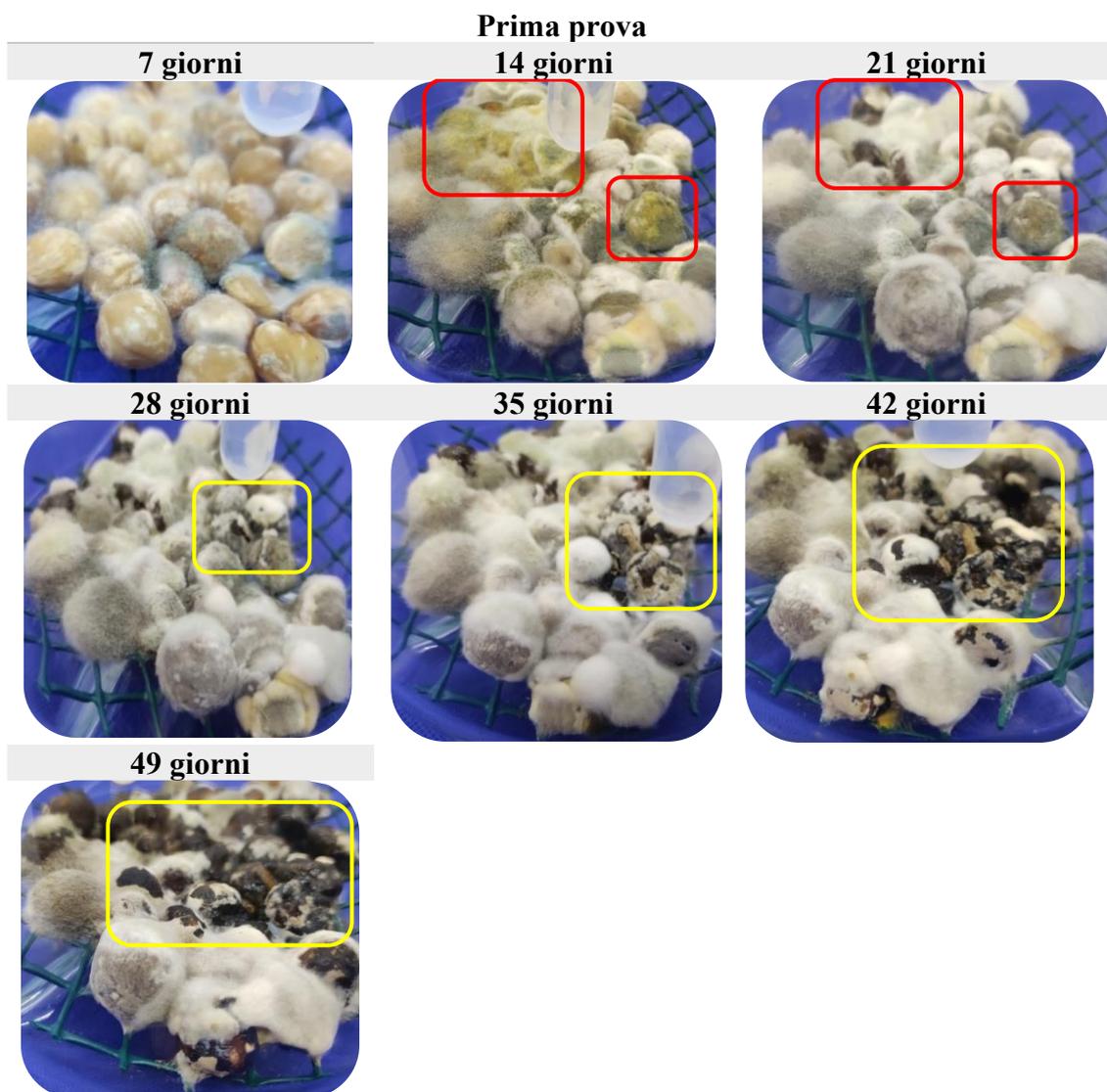
Dalla **Figura 4.2** si osserva che sono presenti anche tratti della curva in colore grigio chiaro con linea tratteggiata. Questi sono gli unici tratti che si differenziano dagli altri per la durata dell'intervallo temporale. Infatti, questi tratti corrispondono a periodi in cui l'intervallo temporale tra una misurazione e la successiva non è né di 2 né di 3 giorni. Nel tratto 10-14 giorni l'intervallo è di 4 giorni e la velocità di produzione della CO₂ è di 131 mg/g, mentre nel tratto finale 42-49 giorni si ha un intervallo di 7 giorni con una velocità di produzione di 48 mg/g.

Da quanto esposto, si desume che la velocità di produzione della CO₂ decresce in modo inversamente proporzionale all'intervallo temporale considerato. Infatti, quando l'intervallo è di 2 giorni in media la velocità vale **239 mg/g**, valore che si riduce a **149 mg/g** con un intervallo di 3 giorni. Se i giorni intercorsi tra una misurazione e la successiva aumentano a 4 la velocità di produzione si riduce a **131 mg/g** e se si arriva a 7 giorni si ha un valore pari a **48 mg/g**. Questo aspetto è ipotizzabile che sia dovuto agli intervalli temporali che intercorrono tra una apertura del microcosmo e la successiva, in corrispondenza delle quali si realizzano le titolazioni acido-base. Nel caso in cui l'intervallo temporale è minore, come nel caso di 2-3 giorni, la velocità è maggiore poiché l'aria contenuta nello spazio di testa del microcosmo contiene un quantitativo di ossigeno sufficiente a garantire l'attività microbica e come conseguenza si ha una velocità di produzione della CO₂ maggiore. Al contrario, quando trascorrono 7 giorni (periodo temporale 42-49 giorni) tra una misurazione e la successiva, il microcosmo rimane chiuso per più tempo senza possibilità di avere un ricambio dell'aria presente nello spazio di testa. Con l'avanzare del tempo, dunque, a causa della crescita dei microrganismi aerobi presenti nel microcosmo, l'ossigeno si consuma gradualmente e, dal momento che non ne viene fornito altro, anche la velocità di produzione della CO₂ subisce un rallentamento.

4.2.2 Evoluzione della biomassa nel tempo

Si riportano di seguito (**Tabella 4.9**) le immagini relative alla crescita della biomassa fungina nei microcosmi in funzione del tempo di incubazione nel caso della prima prova.

Tabella 4.9: evoluzione della biomassa in funzione del tempo d'incubazione – Prima prova



Le immagini riportate in **Tabella 4.9** sono state ottenute settimanalmente. Si osserva come già nei primi 7 giorni ci sia un iniziale sviluppo di micelio principalmente di colorazione bianca e verde. Si nota in particolare il fatto che non tutte le nocchie sono interessate allo stesso modo dalla crescita di biomassa in quanto sulla superficie di alcune si osserva uno sviluppo maggiore rispetto a quello osservabile su altre. Pertanto, tale sviluppo risulta piuttosto eterogeneo in termini di quantità e tipologia di micelio.

Dopo 14 giorni, l'aspetto della biomassa ha subito un cambiamento in quanto, oltre al micelio bianco e verde, è comparso anche quello giallo, evidenziato in rosso nell'immagine. Tuttavia, questo non significa che nei primi 7 giorni il micelio giallo non fosse presente, ma probabilmente non era ancora sufficientemente sviluppato e dunque visibile. Un'ulteriore ipotesi plausibile è che i microrganismi fungini non avessero ancora iniziato a sintetizzare il pigmento di colore giallo. È possibile trovare conferma di tale

sviluppo andando a osservare i valori numerici riportati in **Tabella 4.7**: in corrispondenza dei primi 7 giorni il valore cumulato medio della CO₂ era di 970 mg, nei successivi 14 giorni sono stati riscontrati valori crescenti con il raggiungimento di 3548 mg al giorno 21. In aggiunta, anche le produzioni medie giornaliere confermano il fatto che a 21 giorni dall'inizio dell'incubazione l'attività microbica è risultata maggiore rispetto a quella valutata nei primi 14 giorni. Infatti, nel periodo compreso tra 4 e 7 giorni la produzione media giornaliera di CO₂ è pari a 170 mg, nel successivo intervallo 7-14 giorni la produzione risulta di 146 mg e, infine, nel periodo 14-21 giorni la produzione risulta aumentata e rispettivamente pari a 222 mg. Ciò risulta in accordo con lo sviluppo del micelio che al giorno 21 ricopre in modo omogeneo tutte le nocciole.

Inoltre, è possibile osservare come, all'aumentare del periodo di incubazione, ci sia un cambiamento nell'aspetto della biomassa. Infatti, in corrispondenza del giorno 21 d'incubazione, si nota che il micelio giallo risulta non più visibile in quanto probabilmente coperto da quello bianco e quello verde. Nell'immagine riportata in **Tabella 4.9** è possibile apprezzare quanto appena descritto: la zona evidenziata in rosso, corrispondente a quella che a 14 giorni risultava di colore giallo, a 21 giorni risulta verde e bianca.

Si può anche notare come, dal 21° giorno in poi, alcune nocciole inizino a presentare sulla superficie delle zone, evidenziate in giallo, più scure tendenti al marrone. Il fatto che l'estensione di tali zone aumenti gradualmente nelle settimane successive fa ipotizzare che esse siano aree in cui il micelio si è via via degradato. L'ipotesi deriva dal fatto che, all'aumentare dello spessore del *layer* di biomassa che ricopre le nocciole, si ha che il primo strato di biomassa, adeso alla superficie delle nocciole e non a diretto contatto con l'ossigeno presente nell'aria dello spazio di testa del microcosmo, non riceve più l'ossigeno necessario alla crescita. Tuttavia, sebbene questa supposizione necessiti di conferme sperimentali, i valori di produzione media giornaliera della CO₂ sembrerebbero confermare quanto appena esposto poiché, superato il picco di produzione in prossimità di 21 giorni di incubazione, nelle settimane successive i valori tendono a decrescere e si arriva a una produzione media di CO₂ pari a 111 mg negli ultimi 14 giorni (periodo 35-49 giorni).

4.3 Seconda prova sperimentale

La seconda prova sperimentale realizzata ha previsto l'allestimento di 3 microcosmi dotati di tappo a vite a tenuta e sensore. I microcosmi allestiti sono stati mantenuti alla temperatura costante di 25°C. Grazie alla soluzione di NaOH presente nella provetta interna al microcosmo è stata catturata la CO₂ prodotta, in seguito quantificata tramite titolazione acido-base. La presenza del *Respirometric Sensor* ha consentito la valutazione della velocità specifica di consumo dell'O₂ (RO₂). La prova è stata protratta per 14 giorni.

4.3.1 Analisi quantitativa della CO₂ prodotta

È stata effettuata una seconda prova in cui la valutazione della CO₂ prodotta è stata realizzata tramite titolazione acido-base, similmente alla prima prova, in modo discontinuo ogni 2-3 giorni, come si nota dalla prima colonna della **Tabella 4.10** indicante il tempo d'incubazione. Nella seconda colonna è possibile osservare i valori di CO₂ cumulata media.

Tabella 4.10: CO₂ cumulata media prodotta - Seconda prova

Seconda prova	
Tempo [g]	CO ₂ cumulata media [mg]
2	312 ± 12,58
4	617 ± 8,66
7	1038 ± 35,35
9	1454 ± 4,39
11	1900 ± 4,23
14	2362 ± 4,08

Nel grafico seguente (**Figura 4.3**) si rappresenta l'andamento della CO₂ cumulata media ottenuta nella seconda prova.

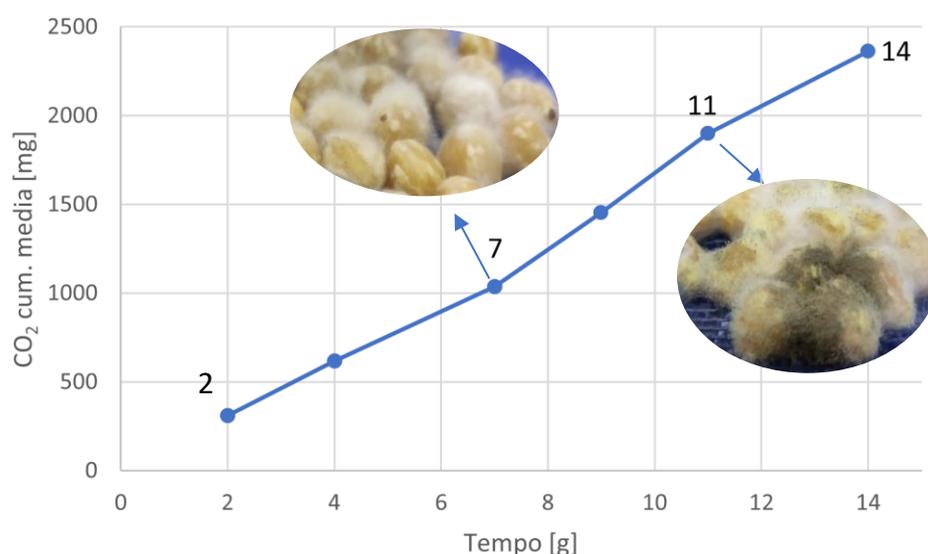


Figura 4.3: andamento della CO₂ cumulata media prodotta – Seconda prova

Si osservano tratti di curva a pendenze diverse corrispondenti a diverse velocità di produzione della CO₂. Per chiarezza si riportano sulla curva i giorni grazie ai quali si individuano i diversi tratti. È possibile suddividere la curva in tre tratti principali. Nel primo tratto, compreso tra il giorno 2 e il giorno 7, la velocità media di produzione della CO₂ è pari a 147 mg/g, valore che aumenta e raggiunge il massimo (216 mg/g) nel periodo compreso tra i giorni 7 e 11. Il periodo finale compreso tra i giorni 11 e 14 presenta una minore velocità di produzione della CO₂ (154 mg/g). Il secondo tratto, avente la massima pendenza, corrisponde anche al periodo di tempo in cui si osserva un maggiore sviluppo di biomassa, come è visibile dai dettagli delle immagini riportate in **Figura 4.3** in cui si nota che a 7 giorni non tutte le nocciole sono interessate dalla presenza di biomassa fungina; al contrario a 14 giorni tutte le nocciole sono similmente coperte da biomassa fungina. Nella **Tabella 4.10** sono evidenziati in rosso i valori in corrispondenza dei giorni citati e si possono osservare gli incrementi della CO₂ prodotta all'aumentare del tempo d'incubazione.

4.3.2 Analisi quantitativa della velocità specifica di consumo dell'O₂ (RO₂)

La quantità di O₂ consumato viene espressa in una prima fase in termini di velocità di consumo RO₂ secondo la formula (8). La valutazione della velocità specifica di consumo dell'O₂ è realizzata grazie al *Respirometric Sensor*. Si effettua la misurazione a intervalli temporali di 2-3 giorni.

Nella seguente **Tabella 4.11** sono stati riportati i valori cumulati medi di RO₂.

Tabella 4.11: RO₂ cumulata media - Seconda prova

Seconda prova		
Tempo [g]	RO ₂ cumulato medio [mgO ₂ /(g·h)]	QR
2	0,01593	10,7
4	0,02531 ± 0,0020	13,3
7	0,06488 ± 0,0206	5,84
9	0,1984 ± 0,1474	4,02
11	0,3482 ± 0,1497	2,99
14	0,4395 ± 0,0913	1,96

Nella **Figura 4.4**, si rappresenta l'andamento dell'RO₂. È possibile suddividere la curva in 4 tratti a pendenza diversa, individuabili grazie ai numeri riportati accanto alla curva. Ogni tratto corrisponde a diverse velocità di consumo dell'O₂.

Il primo tratto, compreso tra i giorni 2 e 4, è quello che visivamente ha pendenza minore e corrisponde di conseguenza al tratto con la minore velocità di consumo dell'O₂, pari a 0,0047 mgO₂/(g·h). Nel tratto successivo, ovvero quello compreso tra i giorni 4 e 7, la velocità di consumo dell'O₂ aumenta ed è pari a 0,013 mgO₂/(g·h). Il tratto compreso tra i giorni 7 e 11 è quello a pendenza maggiore e, dunque, corrisponde al tratto con maggiore velocità di consumo di O₂ (0,072 mgO₂/(g·h)). Infine, nell'ultimo tratto compreso tra i giorni 11 e 14 la pendenza diminuisce nuovamente e la velocità di consumo di O₂ assume un valore di 0,031 mgO₂/(g·h).

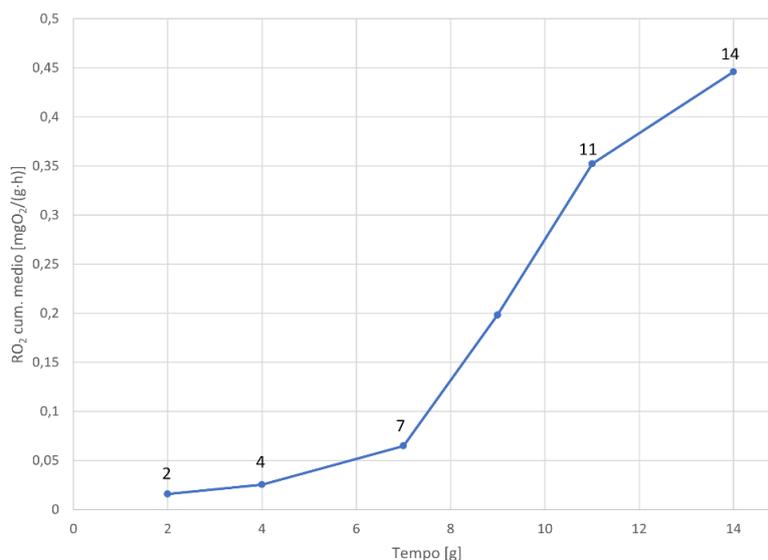


Figura 4.4: RO₂ cumulata media - Seconda prova

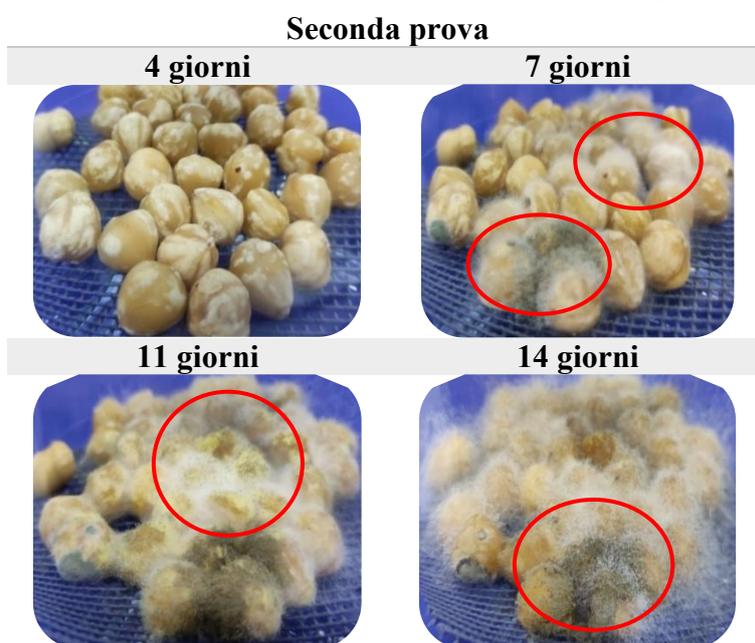
Quanto esposto finora trova conferma osservando i valori di RO₂ presenti nella **Tabella 4.11** in corrispondenza dei giorni citati come riferimento dei diversi tratti. Si osserva come il tratto 7-11 giorni, corrispondente a quello a pendenza massima, coincida anche con il tratto in cui l'RO₂ prodotta subisce il massimo incremento (il valore di RO₂ calcolato aumenta di circa 5,4 volte).

Osservando in **Tabella 4.11** i valori del quoziente respirometrico, QR, si osserva che risultano elevati e crescenti fino al giorno 4, superato il quale si assiste a una decrescita dei valori fino al raggiungimento al giorno 14 di un valore prossimo al 2. Tali valori sono giustificabili considerando la definizione stessa di QR **(9)**. Valori crescenti ed elevati di QR, come nel caso dei primi 4 giorni, sono dovuti al fatto che il quantitativo di CO₂ prodotta aumenta maggiormente rispetto al quantitativo di O₂ consumato (nel periodo 2-4 giorni la CO₂ aumenta di 2 volte mentre l'RO₂ di 1,6 volte). Al contrario, a partire dal 7° giorno il QR decresce come conseguenza del fatto che gli incrementi dell'O₂ consumato sono maggiori rispetto a quelli della CO₂ prodotta. Ad esempio, nel periodo 7-11 giorni, in cui il QR decresce da 5,84 fino a 2,99, l'RO₂ aumenta di 5,4 volte mentre la produzione di CO₂ aumenta di 1,8 volte.

4.3.3 Evoluzione della biomassa nel tempo

Si riportano di seguito (**Tabella 4.12**) le immagini relative allo sviluppo della biomassa nella seconda prova.

Tabella 4.12: evoluzione della biomassa – Seconda prova



In corrispondenza di 4 giorni d'incubazione non si osserva biomassa sulle nocciole, sebbene il valore respirometrico calcolato relativo alla CO₂ prodotta sia pari a 617 mg (**Tabella 4.10**).

Dopo i primi 7 giorni d'incubazione la biomassa è chiaramente osservabile e si presenta eterogenea in termini di tipologia di micelio. La presenza di un micelio ben visibile trova conferma nel fatto che la quantità di CO₂ prodotta è superiore (1038 mg) rispetto alla precedente misurazione (617 mg) (**Tabella 4.10**). È possibile notare zone con micelio bianco e altre con micelio verde, entrambe evidenziate in rosso nell'immagine; inoltre, alcune nocciole sembrano meno ricoperte dal fungo rispetto ad altre. A conferma di ciò, si ha il fatto che la produzione giornaliera di CO₂, nell'intervallo 4-7 giorni, corrisponde al minimo valore calcolato (140 mg).

Al contrario, dall'11° giorno d'incubazione si osserva anche un micelio giallo e tutte le nocciole sembrano similmente ricoperte da biomassa. Questo aspetto risulta coerente con il fatto che, nel periodo compreso tra i giorni 7 e 11, si ha anche la massima produzione giornaliera di CO₂ (216 mg).

Infine, all'ultimo giorno, il 14°, la biomassa è ormai molto sviluppata e questo aspetto trova conferma nel dato respirometrico di 2362 mg di CO₂ (**Tabella 4.10**), corrispondente al massimo valore rilevato. I miceli prevalenti risultano quello bianco e quello verde; il micelio bianco ha uno sviluppo molto più aereo rispetto a quello verde che invece risulta maggiormente aderente alla superficie della nocciaola. La produzione giornaliera di CO₂ valutata nell'intervallo di tempo 11-14 giorni è pari a 154 mg.

4.4 Terza prova sperimentale

Nella terza prova sperimentale, della durata di 66 giorni, sono stati allestiti 6 microcosmi dotati di tappo a vite a tenuta e sensore, mantenuti per tutta la durata della prova a 25°C. La CO₂ prodotta dai microrganismi presenti sulle nocciole è stata catturata dalla soluzione di NaOH e successivamente quantificata tramite titolazione acido-base. Il *Respirometric Sensor* ha permesso la valutazione della velocità specifica di consumo dell'O₂ (RO₂).

4.4.1 Analisi quantitativa della CO₂ prodotta

Si riportano di seguito (**Tabella 4.13**) i valori relativi alla CO₂ cumulata media prodotta. Nel periodo di tempo compreso tra i giorni 4 e 39, evidenziato in giallo in tabella, la valutazione della CO₂ è stata realizzata a intervalli regolari di 2-3 giorni. Nella prima colonna della **Tabella 4.13** si può notare che dal giorno 39 in poi si hanno anche intervalli temporali di 1 giorno (giorni 59-60 e 63-64). È inoltre presente un intervallo temporale molto lungo pari a 17 giorni e compreso tra i giorni 39 e 56.

Tabella 4.13: CO₂ cumulata media prodotta - Terza prova

Terza prova	
Tempo [g]	CO ₂ cumulata media [mg]
4	594 ± 14,76
7	1158 ± 12,42
9	1631 ± 17,04
11	2057 ± 12,42
14	2505 ± 12,42
16	2911 ± 16,5
18	3376 ± 18,07
21	3878 ± 9,04
24	4348 ± 24,75
28	4793 ± 19,05
30	5264 ± 25,2
32	5742 ± 16,5
35	6160 ± 25,2
37	6559 ± 23,33
39	6988 ± 23,33
56	7557 ± 3,64
59	7854 ± 6,06
60	8366 ± 3,52
63	8630 ± 6,82
64	9141 ± 3,52
66	9570 ± 4,2

Nella successiva **Figura 4.5** sono rappresentati graficamente i valori cumulati medi relativi alla CO₂ prodotta.

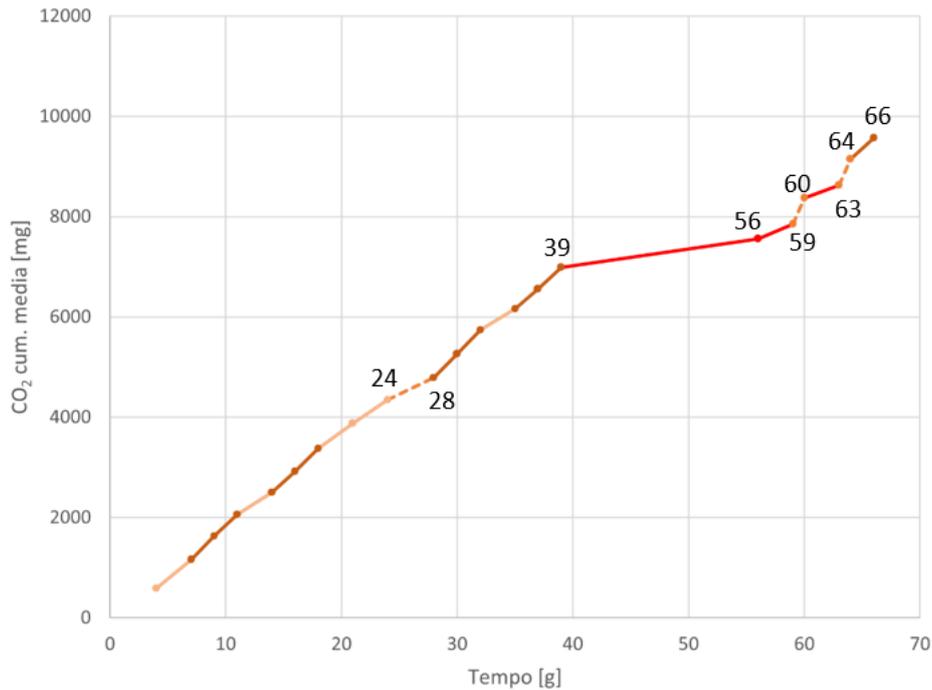


Figura 4.5: andamento della CO₂ cumulata media prodotta – Terza prova

Si osserva che i valori risultano crescenti per tutta la durata della prova, ma con pendenze variabili tra i vari tratti. Similmente a quanto osservato nella prima prova sperimentale, si può notare, dall'andamento della **Figura 4.5**, che le pendenze dei vari tratti cambiano a seconda dell'intervallo temporale che intercorre tra una misurazione e la successiva. Questo aspetto è confermato dai valori delle velocità di produzione della CO₂ ottenuti in ogni tratto. Infatti, i tratti corrispondenti a intervalli temporali di 2 giorni, indicati nella figura con il colore arancio più scuro, mostrano velocità di produzione tra loro simili; allo stesso modo anche i tratti corrispondenti a intervalli temporali di 3 giorni, indicati nella figura con il colore arancio chiaro.

Nella seguente **Tabella 4.14**, si osserva quanto appena esposto circa la confrontabilità dei valori ottenuti in corrispondenza di intervalli temporali tra una misurazione e la successiva di 2 giorni (visibili in tabella con il colore arancio scuro) e di 3 giorni (visibili in tabella con il colore arancio chiaro). In rosso sono indicati gli unici due intervalli (56-59 e 60-63 giorni) per i quali la velocità di produzione ottenuta non è confrontabile con quella degli intervalli di pari durata (3 giorni). È stata calcolata una velocità di produzione media di CO₂ pari a 221 mg/g nel caso di intervalli di 2 giorni e di 160 mg/g per intervalli di 3 giorni (esclusi gli intervalli 56-59 e 60-63 giorni).

Il tratto indicato dalla linea tratteggiata compreso tra i giorni 24 e 28, è l'unico che corrisponde a un intervallo temporale di 4 giorni. Esso presenta una velocità di produzione della CO₂ pari a 111 mg/g.

Allo stesso modo, i tratti con linea tratteggiata (59-60 e 63-64 giorni) sono gli unici in cui l'intervallo temporale è di un solo giorno e la velocità di produzione della CO₂ è pari a 512 mg/g.

Tabella 4.14: velocità di produzione della CO₂ associata a intervalli temporali di 2-3 giorni

Intervalli temporali considerati	Velocità di produzione
[g]	[mg/g]
4-7	188
7-9	237
9-11	213
11-14	149
14-16	203
16-18	233
18-21	167
21-24	157
28-30	235
30-32	239
32-35	139
35-37	200
37-39	215
56-59	99
60-63	88
64-66	215

Nella **Figura 4.5** si osserva come dal giorno 39 fino al giorno 59 e dal giorno 60 al 63 la curva sia rappresentata con una linea rossa per distinguerla dai tratti precedenti. Infatti, l'intervallo 39-56 si distingue dagli altri poiché è intercorso un periodo di 17 giorni tra le misurazioni. In questo intervallo la velocità di produzione della CO₂ è di 33 mg/g. I tratti 56-59 e 60-63, indicati in rosso in **Tabella 4.14**, presentano in media una velocità di produzione della CO₂ di 94 mg/g. Dunque, dalla **Tabella 4.14**, si nota che, a parità di intervallo temporale di 3 giorni, questi ultimi valori delle velocità di produzione della CO₂, indicati in rosso, non risultano confrontabili con quelli indicati in arancio chiaro.

Come commentato nel caso della prima prova, si nota che la velocità di produzione della CO₂ decresce in modo inversamente proporzionale all'intervallo temporale che intercorre tra una apertura dei microcosmi e la successiva. Infatti, quando l'intervallo è di 1 giorno in media si ha una velocità di produzione di **512 mg/g**, se l'intervallo temporale è di 2 giorni in media la velocità vale **221 mg/g**, valore che si riduce a **160 mg/g** con un intervallo di 3 giorni. Se i giorni intercorsi tra una misurazione e la successiva aumentano a 4 la velocità di produzione si riduce a **111 mg/g** e se si arriva a 17 giorni si ha un valore pari a **33 mg/g**. Si ipotizza che questo andamento sia giustificabile allo stesso modo della prima prova: nel caso in cui l'intervallo temporale è minore come nel caso di 1-2-3-4 giorni la velocità è maggiore poiché l'aria contenuta nello spazio di testa del microcosmo contiene un quantitativo di ossigeno maggiore della concentrazione critica e come conseguenza si ha una velocità di produzione della CO₂ maggiore. Al contrario quando trascorrono 17 giorni tra una misurazione e la successiva, il microcosmo rimane chiuso per più tempo senza possibilità di avere un ricambio dell'aria presente nello spazio di testa. Pertanto, con l'aumentare dell'intervallo di tempo tra una apertura del microcosmo e la successiva e a causa della crescita dei microrganismi aerobi, l'ossigeno si consuma gradualmente raggiungendo un valore di concentrazione critica che comporta una riduzione della velocità di produzione della CO₂.

4.4.2 Analisi quantitativa della velocità specifica di consumo dell'O₂ (RO₂)

Nella **Tabella 4.15** sono riportati i risultati della velocità specifica di consumo di ossigeno RO₂ ottenuti nella terza prova sperimentale con le corrispondenti deviazioni standard. Come anticipato in “Materiali e metodi” (Sezione 3.8), le misurazioni dell'RO₂ sono state protrate per i primi 39 giorni d'incubazione.

Tabella 4.15: RO₂ cumulata media - Terza prova

Terza prova		
Tempo [g]	RO ₂ cumulato medio [mgO ₂ /(g·h)]	QR
4	0,007833 ± 0,00198	41,6
7	0,05112 ± 0,01569	8,28
9	0,1901 ± 0,02335	4,70
11	0,3313 ± 0,01965	3,40
14	0,4296 ± 0,01091	2,13
16	0,5743 ± 0,00739	2,33
18	0,7338 ± 0,00272	2,52
21	0,8408 ± 0,0051	1,68
24	0,9324 ± 0,01649	1,70
28	1,001 ± 0,00797	1,57
30	1,137 ± 0,0069	1,61
32	1,283 ± 0,00687	1,67
35	1,368 ± 0,01366	1,64
37	1,455 ± 0,00056	1,70
39	1,599 ± 0,00394	1,77

Si riporta di seguito la **Figura 4.6** in cui si rappresenta l'andamento dell'RO₂ cumulato medio in funzione del tempo d'incubazione.

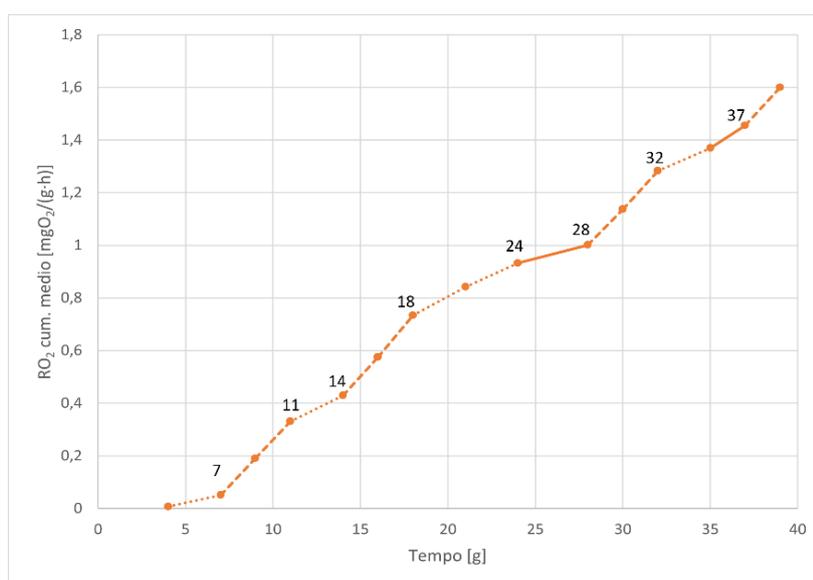


Figura 4.6: RO₂ cumulata media - Terza prova

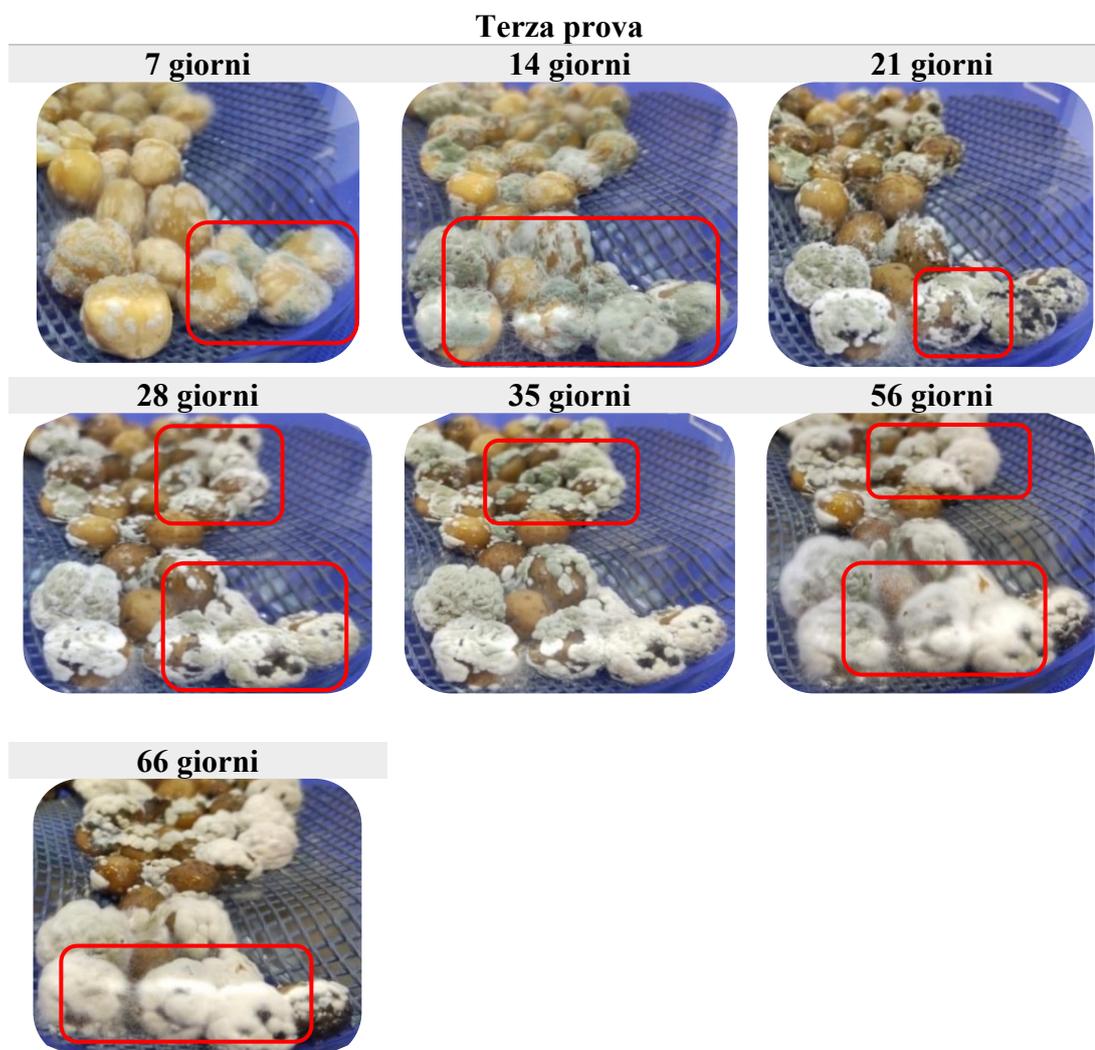
Considerando l'andamento in figura, si osserva che sono individuabili tratti a pendenza simile che si ripetono lungo l'arco temporale e corrispondenti a diversi valori di velocità di consumo dell'O₂. In particolare, i tratti indicati con una linea tratteggiata compresi tra i giorni 7-11, 14-18, 28-32 e 37-39, mostrano una velocità di consumo di O₂ in media pari a 0,072 mgO₂/(g·h). Invece, i tratti indicati con una linea a puntini e compresi tra i giorni 4-7, 11-14, 18-24 e 32-35, hanno una pendenza minore e di conseguenza una velocità di consumo di O₂ minore, pari in media a 0,027 mgO₂/(g·h). Infine, i tratti 24-28 e 35-37 giorni rappresentati da una linea continua, mostrano i seguenti valori di velocità di consumo di O₂: 0,017 mgO₂/(g·h) per il tratto 24-28 giorni e 0,043 mgO₂/(g·h) per il tratto 35-37 giorni. Nella **Tabella 4.15**, sono evidenziati i valori di RO₂ cumulata media in corrispondenza degli stessi intervalli temporali commentati.

Considerando, invece, il QR (**Tabella 4.15**), si osserva che nei primi 7 giorni assume valori molto elevati. Nei giorni successivi i valori tendono gradualmente a decrescere e, data la confrontabilità dei valori ottenuti a partire dal giorno 21, è ragionevole assumere il valore medio di 1,67 come valore di riferimento. Similmente a quanto detto per la seconda prova, l'andamento decrescente del QR all'aumentare del tempo d'incubazione è legato al fatto che gradualmente il quantitativo di O₂ consumato tende a superare il quantitativo di CO₂ prodotta. Infatti, nel periodo 4-7 giorni in cui il QR decresce da 41,6 a 8,28, l'O₂ consumato aumenta maggiormente rispetto alla CO₂ prodotta (l'RO₂ aumenta di 6,5 volte mentre la CO₂ aumenta di 1,95 volte). Quanto esposto trova conferma anche dei successivi periodi d'incubazione: in corrispondenza dell'intervallo 21-39 giorni l'RO₂ raddoppia il suo valore mentre la CO₂ aumenta di 1,8 volte.

4.4.3 Evoluzione della biomassa nel tempo

Nella **Tabella 4.16** sono mostrate le immagini che consentono di visualizzare lo sviluppo della biomassa a intervalli temporali di 7 giorni fino al giorno 35 e, infine, nei giorni 56 e 66.

Tabella 4.16: evoluzione della biomassa - Terza prova



Osservando le immagini, si nota come nei primi 7 giorni d'incubazione non tutte le nocciole siano interessate dallo sviluppo di biomassa. Inoltre, anche le nocciole sulla cui superficie è presente la biomassa, non sono interamente ricoperte. Il micelio si presenta per lo più di colore verde.

In prossimità del giorno 14, invece, tutte le nocciole presentano sulla superficie una biomassa fungina di colore verde. L'incremento del quantitativo di biomassa presente sulle nocciole trova conferma nel valore relativo alla produzione giornaliera di CO₂ che risulta essere elevato e pari a 192 mg.

Giunti al giorno 21, si vede che sulle nocciole in primo piano, che all'inizio erano ricoperte da una biomassa fungina di colore verde, è ora presente anche un micelio di colore bianco. La continua crescita di biomassa è confermata dal valore giornaliero di 196 mg di

CO₂ per il periodo 14-21 giorni. Tale valore risulta confrontabile con quello relativo ai 7 giorni precedenti (192 mg).

Al giorno 28, la biomassa di colore bianco sembra aumentata sia sulle nocciole in primo piano sia su quelle in secondo piano. Si osserva, infatti, come la biomassa fungina risulti piuttosto omogenea in termini sia di tipologia di micelio sia di quantità. La produzione giornaliera di CO₂ è risultata leggermente inferiore rispetto a quella dei periodi precedenti essendo pari a 130 mg.

Nei successivi 7 giorni, ovvero al giorno 35, si osserva un cambiamento della tipologia di biomassa presente sulle nocciole in secondo piano in quanto la biomassa non appare più bianca ma verde. Sebbene a una osservazione macroscopica sembri che la biomassa non si sia accresciuta rispetto al giorno 35, si registrano 195 mg di CO₂ prodotta giornalmente, valore confrontabile con quelli valutati ai giorni 14 e 21.

Al giorno 56, la biomassa presente su alcune nocciole sembra aumentata e si osserva, sulle nocciole evidenziate in primo piano, la presenza di micelio aereo, assente nelle precedenti immagini. Considerando le nocciole in secondo piano, si osserva che, rispetto al giorno 35, risultano maggiormente coperte dalla biomassa fungina. Inoltre, si osserva un micelio di colore bianco che, avendo probabilmente coperto il micelio verde, ha reso quest'ultimo non più visibile. Il valore di produzione giornaliera di CO₂, in accordo con il fatto che il periodo di tempo considerato è maggiore, è risultato più basso e pari a 66 mg.

Infine, al giorno 66 non si osservano particolari cambiamenti rispetto al giorno 56 anche se il quantitativo di biomassa presente sulle nocciole in primo piano sembra aumentato. Questo è concorde con il valore di produzione giornaliera di CO₂ pari a 201 mg.

4.5 Confronto quantitativi di CO₂ prodotta - Prima, seconda e terza prova

Di seguito si riporta un grafico (**Figura 4.7**), in cui sono rappresentati gli andamenti della CO₂ cumulata media prodotta nelle tre prove di durata differente. In questo modo è possibile realizzare dei confronti a parità di tempi d'incubazione.

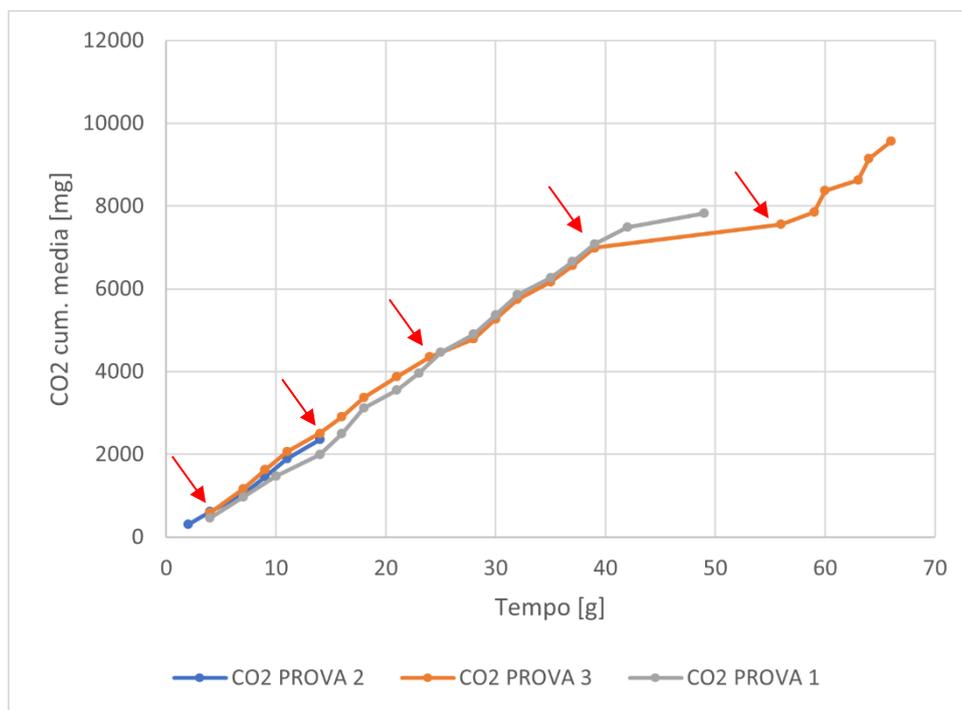


Figura 4.7: confronto andamenti della CO₂ cumulata media prodotta nelle tre prove realizzate

Dalla **Figura 4.7**, è possibile osservare come gli andamenti delle curve relativi alle tre prove siano confrontabili. Nella seguente sezione, i confronti vengono realizzati considerando le varie curve presenti in figura e analizzandole procedendo in ordine cronologico. Le frecce rosse indicano i periodi temporali a cui ci si riferisce nei commenti seguenti.

Si osserva che, in corrispondenza dell'intervallo 4-10 giorni, tutte e tre le curve presentano un andamento simile. Nella **Tabella 4.17**, si riportano i valori della CO₂ cumulata media prodotta nell'intervallo 4-14 giorni.

Tabella 4.17: confronto CO₂ cumulata media prodotta nel periodo 4-14 giorni

CO ₂ cumulata media [mg]			
Tempo [g]	Prima prova	Seconda prova	Terza prova
4	459 ± 23,33	617 ± 8,66	594 ± 14,76
7	970 ± 70,00	1038 ± 35,35	1158 ± 12,42
9	-	1454 ± 4,39	1631 ± 17,04
10	1469 ± 116,7	-	-
11	-	1900 ± 4,23	2057 ± 12,42
14	1994 ± 35,35	2362 ± 4,08	2505 ± 12,42

Considerando ora la curva blu relativa alla seconda prova, si nota che questa ha un andamento totalmente sovrapponibile con quello della terza prova (curva arancione). Si osserva che, a meno del valore ottenuto a 4 giorni in cui il dato registrato nella terza prova risulta minore rispetto a quello registrato nella seconda con una differenza percentuale tra i valori di circa il 4%, i valori ottenuti nella terza prova risultano sempre maggiori rispetto ai corrispondenti ottenuti nella seconda. Nel successivo periodo 7-14 giorni, i valori della terza prova sono in media superiori a quelli ottenuti nella seconda del 9%. Essendo tali variazioni percentuali minime, si può confermare la confrontabilità dei due andamenti.

Prendendo in esame, invece, i dati della terza e della prima prova si osserva che le variazioni percentuali tra i valori risultano maggiori rispetto a quelle ottenute confrontando terza e seconda prova. Infatti, nel periodo 4-14 giorni la variazione media percentuale è del 17%. Pertanto, si ha conferma di ciò che si osserva visivamente nella **Figura 4.7** ossia che nel periodo 4-14 giorni la curva arancione della terza prova ha un andamento più simile a quello della seconda prova (curva blu).

A partire dal 14° giorno, si nota che la curva grigia della prima prova ha un andamento assimilabile a quello della curva arancione relativa alla terza prova.

Tabella 4.18: confronto CO₂ cumulata media prodotta nel periodo 14-24 giorni

CO ₂ cumulata media [mg]		
Tempo [g]	Prima prova	Terza prova
14	1994 ± 35,35	2505 ± 12,42
16	2497 ± 152,0	2911 ± 16,5
18	3111 ± 4,24	3376 ± 18,07
21	3548 ± 12,73	3878 ± 9,04
23	3957 ± 46,67	-
24	-	4348 ± 24,75

Si osserva dalla **Tabella 4.18** come i valori della terza prova siano maggiori di quelli della prima. A 14 giorni il valore della terza prova risulta del 20% superiore a quello della prima prova. La variazione percentuale tende a ridursi nei giorni successivi e, a 24 giorni, il valore della terza prova eccede del 9% rispetto a quello ottenuto a 23 giorni nella prima prova.

La totale confrontabilità dell'andamento della prima prova (curva grigia) con quello della terza prova (curva arancione) si ha a partire dal giorno 25 fino al giorno 39, superato il quale le due curve non risultano più totalmente sovrapponibili. Questo potrebbe essere dovuto alla diversa durata degli intervalli temporali nella prima e terza prova, nel periodo 39-56 giorni. Infatti, nella prima prova sono presenti intervalli di 3 e 7 giorni (periodo 39-42 e 42-49 giorni), mentre nella terza è presente un unico intervallo di 17 giorni (39-56 giorni). Tuttavia, dai dati presenti in **Tabella 4.19** (periodo 24-56 giorni), si ottiene una variazione percentuale media del 2% tra i valori della prima e terza prova.

Infine, il valore della CO₂ calcolato nella prima prova a 49 giorni si discosta solamente del 3,35% rispetto al valore calcolato a 56 giorni nella terza prova.

Tabella 4.19: confronto CO₂ cumulata media prodotta nel periodo 24-56 giorni

CO ₂ cumulata media [mg]		
Tempo [g]	Prima prova	Terza prova
24	-	4348 ± 24,75
25	4469 ± 46,67	-
28	4898 ± 0	4793 ± 19,05
30	5368 ± 58,34	5264 ± 25,2
32	5855 ± 58,34	5742 ± 16,5
35	6260 ± 35,0	6160 ± 25,2
37	6664 ± 35,0	6559 ± 23,33
39	7084 ± 35,9	6988 ± 23,33
42	7480 ± 23,3	-
49	7819 ± 11,6	-
56	-	7557 ± 3,64

Inoltre, si osserva dalla **Figura 4.7** che, a partire dal giorno 39, la curva della prima prova subisce una riduzione della pendenza che raggiunge il minimo in corrispondenza dell'ultimo periodo 42-49 giorni in cui la velocità di produzione della CO₂ vale 48 mg/g. Similmente, anche la curva della terza prova a partire dal giorno 39 e fino al giorno 56 è interessata da una riduzione della pendenza, consistente in un valore di velocità di produzione di CO₂ estremamente ridotto pari a 33 mg/g.

4.6 Confronto della velocità specifica di consumo dell'O₂ (RO₂) - Seconda e terza prova

Nella seguente sezione si confrontano i valori della velocità specifica di consumo dell'O₂ (RO₂) e il quoziente respirometrico (QR) ottenuti nella seconda e terza prova. Dalla seguente **Figura 4.8** si osservano gli andamenti dell'RO₂ nelle due prove.

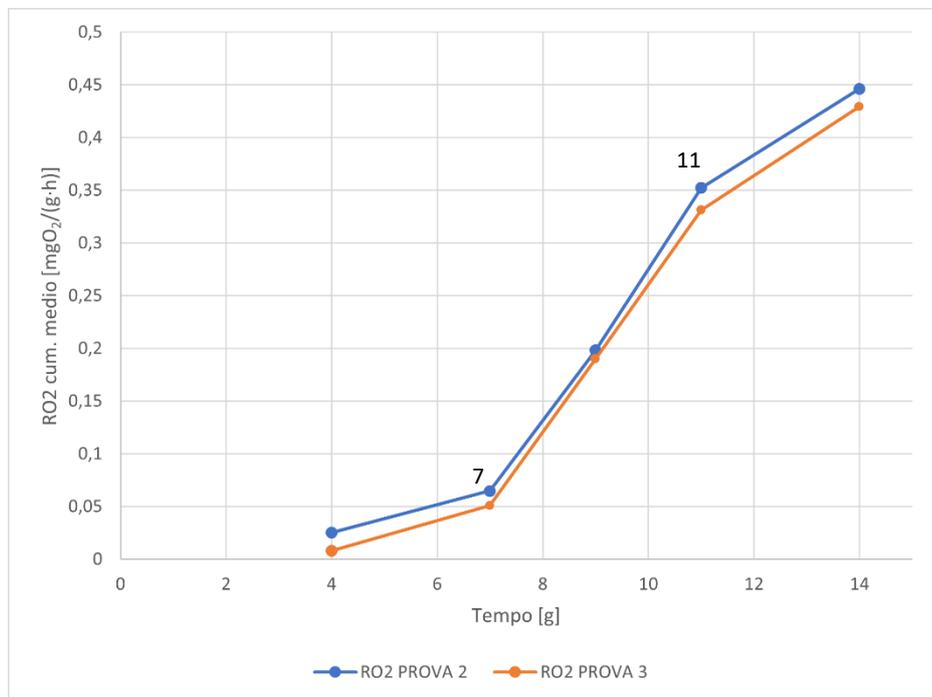


Figura 4.8: RO₂ cumulata media - Seconda e terza prova

È possibile osservare come l'andamento dell'RO₂ nella seconda prova (curva blu) sia molto confrontabile con quello ottenuto nel caso della terza prova (curva arancione). Si osserva che è possibile individuare tre tratti a diversa pendenza in corrispondenza dei periodi 4-7, 7-11 e 11-14 e si nota che entrambe le curve mostrano le stesse pendenze in corrispondenza degli intervalli indicati. Nella **Tabella 4.20** sono presenti i valori delle pendenze corrispondenti ai tratti menzionati, consistenti nelle velocità di consumo dell'O₂, e dai quali si ha conferma di quanto esposto.

Tabella 4.20: confronto pendenze curve - Seconda e terza prova

Intervallo temporale [g]	Velocità di consumo [mgO ₂ /(g·h)]	
	Seconda prova	Terza prova
4-7	0,013	0,014
7-11	0,072	0,070
11-14	0,031	0,033

Si prosegue confrontando i valori numerici del QR, calcolato secondo la formula (8). Tali valori sono presentanti nella seguente **Tabella 4.21**.

Tabella 4.21: QR - Seconda e terza prova

QR		
Tempo [g]	Seconda prova	Terza prova
4	13,3	41,6
7	5,84	8,28
9	4,02	4,70
11	2,99	3,40
14	1,96	2,13

Analizzando l'andamento del QR, si nota che, in entrambi i casi, nei primi giorni esso risulta molto elevato e a 4 giorni si registra il valore massimo sia nel caso della seconda prova sia nel caso della terza. Tuttavia, il massimo valore ottenuto nella seconda prova (13,3) è pari a circa un terzo del valore ottenuto nella terza prova (41,6). I valori ottenuti nei giorni successivi decrescono per entrambe le prove fino al raggiungimento di valori confrontabili al giorno 14, in media pari a 2.

In uno studio [66] presente in letteratura è stata realizzata l'analisi di estratti citoplasmatici di alcuni ceppi di *Aspergillus parasiticus*; essi sono stati mantenuti in provette a becco di clarino di Potato Dextrose Agar (PDA) al 2% e coltivati su un terreno chimicamente definito avente la composizione presentata in [67] in cui la fonte di C è il glucosio $C_6H_{12}O_6$ e quella di N è il solfato di ammonio $(NH_4)_2SO_4$. La valutazione del QR è stata realizzata per mezzo del manometro di Warburg ed è stato riscontrato per un ceppo aflatossigeno un QR pari a 1,28 in seguito a 48 h di crescita e 3,1 in seguito a 72 h di crescita [66]. In questa attività sperimentale si è ottenuto un QR medio delle due prove pari a circa 2, valore intermedio rispetto a quello ritrovato in letteratura e ciò conferma l'attendibilità del valore ottenuto sperimentalmente.

4.7 Confronto tra O₂ consumato e CO₂ prodotta - Seconda e terza prova

Si considerano la seconda e la terza prova realizzate e si confrontano di seguito gli andamenti relativi alla produzione di CO₂ con quelli relativi al consumo di O₂.

Nel grafico successivo (**Figura 4.9**) sull'asse delle ascisse è presente il tempo d'incubazione (g), sull'asse delle ordinate principale a sinistra la CO₂ cumulata media prodotta (mg) e su quello delle ordinate secondario a destra l'O₂ cumulato medio consumato (mg).

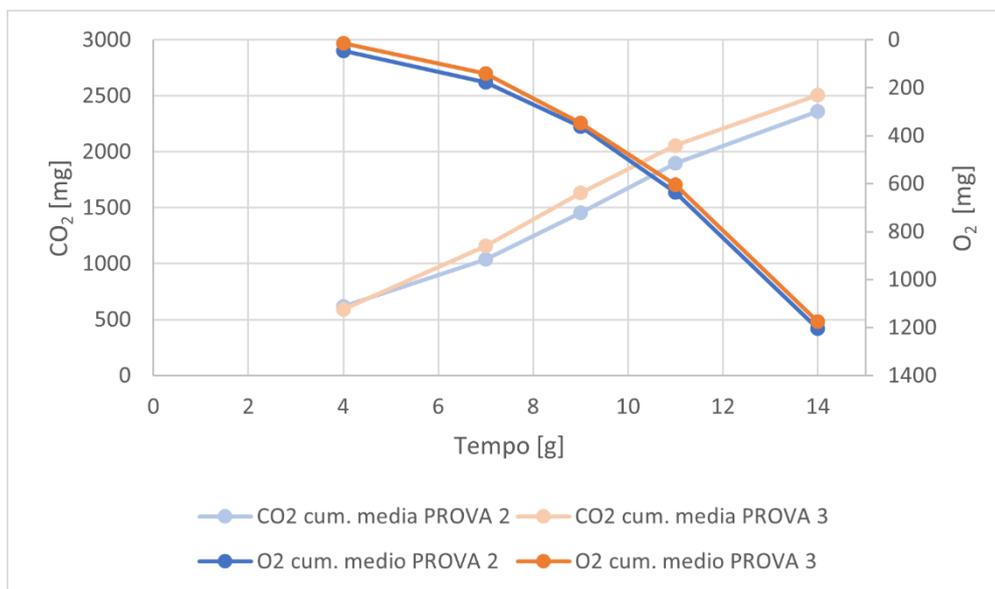


Figura 4.9: Confronto andamenti CO₂ prodotta e O₂ consumato- Seconda e terza prova

Sono rappresentati in blu e blu chiaro gli andamenti relativi alla seconda prova, mentre in arancione e arancione chiaro quelli relativi alla terza prova. Si osserva che le curve più chiare relative alla produzione di CO₂ nella seconda e terza prova sono sovrapponibili. Allo stesso modo lo sono anche le curve più scure rappresentanti il consumo di O₂ nella seconda e terza prova.

Nella seguente **Tabella 4.22** sono riportati i valori numerici a cui ci si riferisce e si precisa che, per agevolare la lettura, sono stati mantenuti gli stessi colori con cui sono stati presentati gli andamenti nella figura. Dall'analisi dei valori riportati in tabella si ha conferma della confrontabilità dei dati ottenuti nella seconda prova con quelli della terza. A conferma di ciò, si osserva che gli ordini di grandezza dei valori di O₂ consumato nella seconda e terza prova sono gli stessi; allo stesso modo anche quelli della CO₂ prodotta.

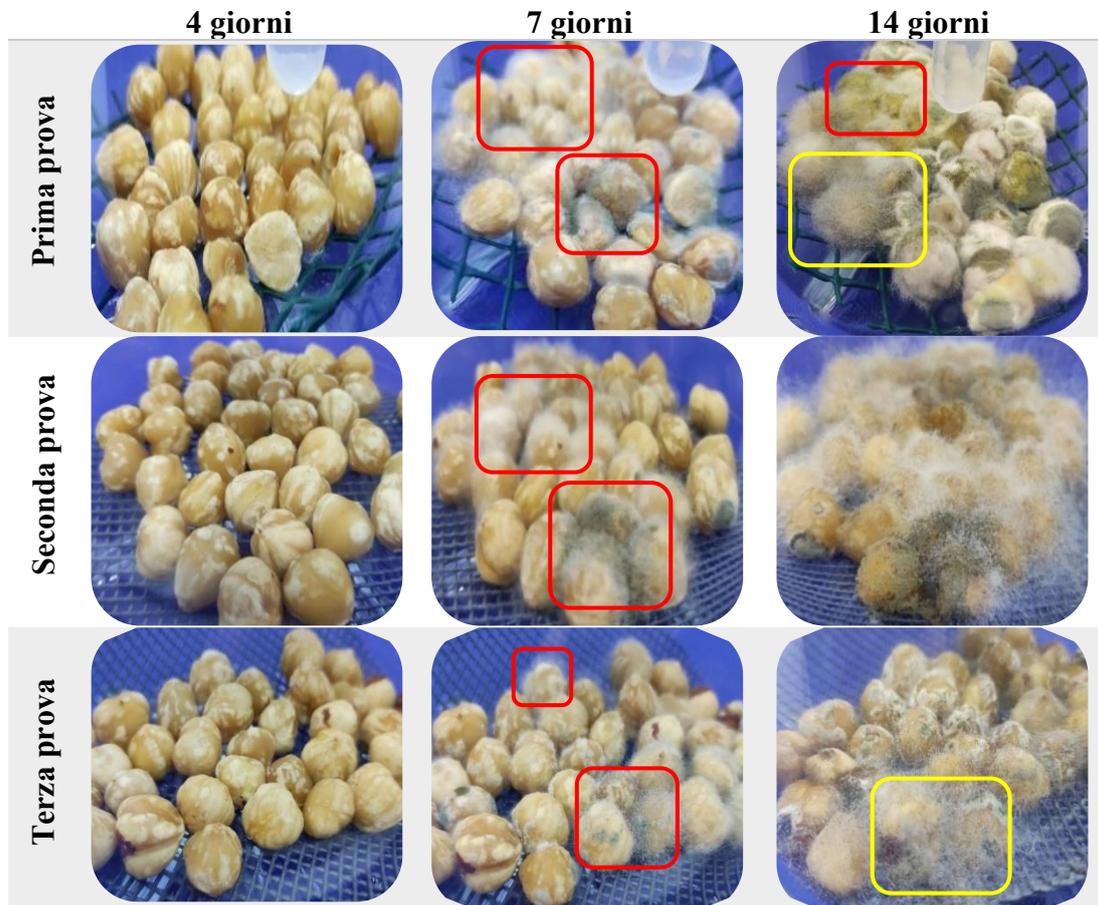
Tabella 4.22: CO₂ prodotta e O₂ consumato - Seconda e terza prova

Tempo [g]	Seconda prova		Terza prova	
	CO ₂ cumulata media [mg]	O ₂ cumulato medio [mg]	CO ₂ cumulata media [mg]	O ₂ cumulato medio [mg]
4	617	46	594	14
7	1038	178	1158	140
9	1454	362	1631	347
11	1900	635	2057	604
14	2362	1203	2505	1175

4.8 Confronto visualizzazione biomassa - Prima, seconda e terza prova

Si riportano le immagini ottenute nelle tre prove realizzate, a parità di tempi d'incubazione (**Tabella 4.23**).

Tabella 4.23: confronto evoluzione biomassa nelle tre prove



Dalle immagini sopra riportate (**Tabella 4.23**) è possibile osservare come, in tutte e tre le prove considerate, la biomassa abbia uno sviluppo confrontabile, a parità di tempi d'incubazione.

Dopo 4 giorni d'incubazione, lo sviluppo di biomassa non risulta ancora ben visibile, nonostante i valori di CO₂ ottenuti e riportati in **Tabella 4.7-4.10-4.13** dimostrino un'attività respirometrica delle nocciole (459 mg di CO₂ nel caso della prima prova, 617 mg nella seconda prova, 594 mg nella terza prova).

Le immagini ottenute a 7 giorni d'incubazione mostrano invece uno sviluppo di micelio ben visibile e caratterizzato da una colorazione bianco-verde in tutti e tre i microcosmi.

Infine, a 14 giorni d'incubazione si osserva un micelio che ricopre in modo sempre più omogeneo tutte le nocciole. Nella prima prova, le tre tipologie di micelio (giallo, bianco, verde) coinvolgono le nocciole in modo eterogeneo e molte di esse sono interessate dallo sviluppo di tutte e tre le tipologie fungine. La presenza di micelio aereo, evidenziata in giallo nelle immagini, è limitata a poche nocciole. Al contrario, nella seconda e terza prova, il micelio è per lo più aereo.

4.9 Determinazione delle aflatossine totali

La determinazione del quantitativo di aflatossine totali presenti in ciascun campione è stata realizzata mediante il *kit* ELISA Ridascreen Alatoxins Total. Come spiegato nella sezione 3.7, la valutazione del grado di contaminazione da aflatossine è stata realizzata su campioni di nocciole derivanti da tutte le prove realizzate. Inoltre, sono stati analizzati anche campioni tal quali di nocciole non incubate.

Nella seguente tabella (**Tabella 4.24**) sono presentati i valori ottenuti nel caso di nocciole tal quali, analizzate senza essere state precedentemente incubate. Si osserva come, nel caso del campione conservato a 4°C, il quantitativo di aflatossine ottenuto (0,0912 µg/kg) sia superiore rispetto a quello dei campioni tal quali conservati a 20°C (0,0268 µg/kg - nocciole della confezione aperta da 2 mesi e 0,0341 µg/kg - nocciole della confezione aperta da 4 mesi). Questo aspetto potrebbe essere dovuto alla presenza di microrganismi psicrofili che, avendo una temperatura ottimale di crescita bassa (0-10°C) compatibile con la refrigerazione, riescono a moltiplicarsi a una maggiore velocità nelle nocciole conservate in frigorifero rispetto a quelle conservate a 20°C. Di conseguenza, il quantitativo di aflatossine risulta maggiore rispetto a quello presente nei campioni conservati a 20 °C.

Considerando invece le nocciole tal quali conservate a 20 °C, si nota che quelle della confezione aperta da 2 mesi hanno un quantitativo di aflatossine inferiore rispetto a quelle derivanti da una confezione aperta da 4 mesi (0,0268 µg/kg - 2 mesi e 0,0341 µg/kg - 4 mesi). Tali valori sono giustificabili pensando che le nocciole derivanti da una confezione aperta da 4 mesi sono state esposte all'ossigeno presente in ambiente per più tempo rispetto a quelle aperte successivamente. Di conseguenza, il quantitativo di aflatossine sviluppatosi risulta maggiore poiché i microrganismi aerobi presenti sulle nocciole hanno avuto più tempo per moltiplicarsi.

Nella **Tabella 4.24** sono anche presentati i valori dei quantitativi di aflatossine ottenuti nel caso di campioni derivanti da periodi d'incubazione diversi realizzati per ogni prova.

Dai valori ottenuti, è possibile osservare che i quantitativi di aflatossine ottenuti risultano crescenti con l'aumentare del tempo d'incubazione. Come mostrato nei paragrafi 4.2.2, 4.3.3 e 4.4.3, le nocciole sottoposte a un periodo di incubazione più lungo sono interessate da un maggiore sviluppo di biomassa. Similmente a quanto esposto nel caso dei campioni tal quali, questo si traduce in un quantitativo di aflatossine superiore.

Tabella 4.24: $\mu\text{g}/\text{kg}$ di aflatossine prodotte in funzione del tempo d'incubazione (campioni tal quali e incubati)

Prova	Tempo [g]	$\mu\text{g}/\text{kg}$ medi
Campioni tal quali	2 mesi (4°C)	0,0912±0,00503
	2 mesi (20°C)	0,0268±0,00361
	4 mesi (20°C)	0,0341±0,00515
Seconda	4	0,0193 ± 0,00327
Seconda	7	0,0236 ± 0,00361
Seconda	14	0,238 ± 0,0586
Terza	14	0,242 ± 0,0149
Terza	21	0,311 ± 0,00208
Terza	28	0,330 ± 0,00615
Terza	39	0,354 ± 0,0181
Prima	49	0,406 ± 0,0183
Terza	66	0,513 ± 0,023

Il valore ottenuto a 4 giorni d'incubazione (0,0193 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (**Tabella 4.24**) risulta essere minore rispetto a quello ottenuto nel caso di nocciole tal quali conservate a 20°C derivanti da una confezione aperta da 2 mesi (0,0268 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Quest'ultimo risulta, invece, essere confrontabile con quello ottenuto a 7 giorni d'incubazione (0,0236 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

A partire dal giorno 14 in poi, il quantitativo di aflatossine prodotte aumenta di un ordine di grandezza. In particolare, si osserva che, in corrispondenza del giorno 14 evidenziati in rosso in tabella, sono presenti due valori di concentrazione di aflatossine, ottenuti da nocciole incubate sia nella seconda sia nella terza prova. Questi valori, come si vede dalla **Figura 4.10** nel punto indicato in rosso, sono totalmente sovrapponibili e per tale motivo è ragionevole assumere il valore medio di 0,24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ come buona approssimazione.

I valori successivi (21-66 giorni) risultano crescenti e al giorno 66 si osserva il valore massimo registrato (0,513 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

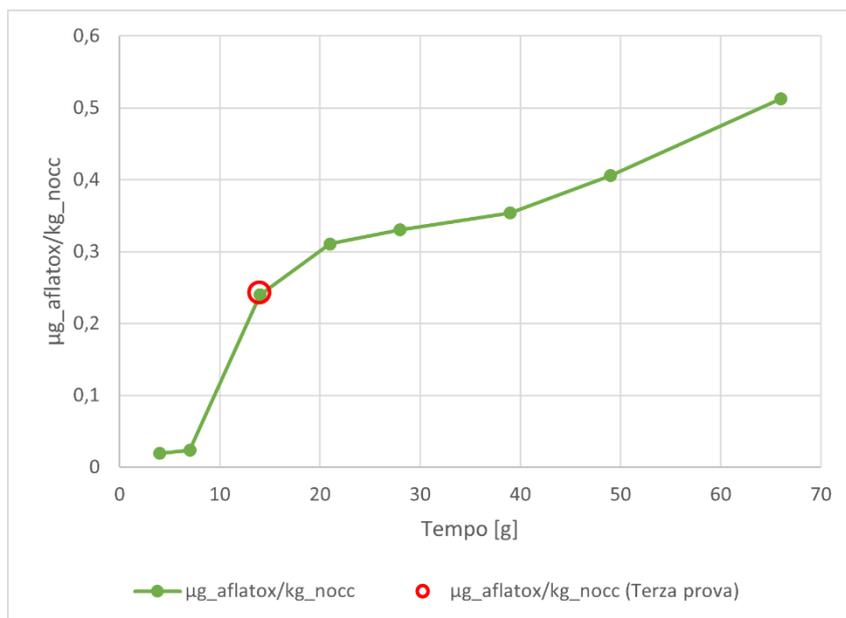


Figura 4.10: $\mu\text{g}_{\text{aflatox}}/\text{kg}_{\text{nocc}}$ prodotte in funzione del tempo d'incubazione

Osservando la **Figura 4.10** si nota che sono presenti tratti della curva a pendenza diversa corrispondenti a periodi temporali in cui la velocità di produzione delle aflatoxine cambia. Il primo tratto compreso tra i giorni 4-7 risulta essere quello con la minore velocità di produzione delle aflatoxine ($0,0014 \mu\text{g}/\text{kg}$). Il tratto successivo, compreso tra i giorni 7 e 14, risulta essere quello con la massima velocità di produzione delle aflatoxine pari a $0,031 \mu\text{g}/\text{kg}$. Il tratto 14-21 giorni è interessato da una velocità di $0,0098 \mu\text{g}/\text{kg}$, valore che decresce nei successivi tratti 21-28 e 28-39 giorni e in media è pari a $0,0025 \mu\text{g}/\text{kg}$. Infine, nei tratti finali, 39-49 giorni e 49-66 giorni, la velocità è maggiore e in media pari a $0,0057 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Tutti i valori ottenuti sperimentalmente sono risultati essere inferiori ai limiti legislativi imposti dal Regolamento (CE) n. 1881/2006 secondo il quale il massimo quantitativo di aflatoxine totali (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) consentito in nocciole destinate al consumo diretto o utilizzate come ingrediente in alimenti derivati è pari a $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ [52].

Uno studio [13] condotto su nocciole di diversa provenienza e avente l'obiettivo di determinare il quantitativo totale di aflatoxine presenti (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) ha evidenziato che su un totale di 93 campioni analizzati, il 37,6% è risultato essere contaminato. Tra le nocciole analizzate, quelle turche sono risultate essere quelle con il maggior quantitativo di aflatoxine rilevate ($0,33 \mu\text{g}/\text{kg}$). Tale valore risulta concorde con quello valutato sperimentalmente a 28 giorni d'incubazione (**Tabella 4.24**). Nelle nocciole italiane, invece, il grado di contaminazione da aflatoxine è risultato minore ($0,14 \mu\text{g}/\text{kg}$). Tale valore risulta essere intermedio rispetto ai valori di contaminazione valutati sperimentalmente a 7 e 14 giorni ($0,0236 \mu\text{g}/\text{kg}$ e $0,24 \mu\text{g}/\text{kg}$ medi) (**Tabella 4.24**).

4.9.1 Confronto tra la quantità di CO₂, O₂ e le aflatossine prodotte

Al fine di caratterizzare al meglio lo sviluppo delle aflatossine si è deciso di metterle in relazione le quantità prodotte con le quantità di CO₂ cumulata media in corrispondenza di uno stesso tempo d'incubazione e considerando la stessa prova. Pertanto, di seguito è mostrata la tabella (**Tabella 4.25**) in cui sono presentati i valori ottenuti. In corrispondenza del giorno 14, sono presentati due valori ottenuti dalla seconda e dalla terza prova. I valori presenti in tabella relativi all'ossigeno prodotto e al QR saranno commentati successivamente (**Figura 4.12-4.13**).

Tabella 4.25: valori di CO₂ prodotta (mgCO₂/kg), O₂ consumato (mgO₂/kg), QR e aflatossine prodotte (µg/kg)

Prova	Tempo [g]	mgCO ₂ /kg _{nocc} cumulata media	mgO ₂ /kg _{nocc} cumulata media	QR	µg/kg medi
Seconda	4	16228	1215	13,3	0,0193 ± 0,00327
Seconda	7	27303	4671	5,84	0,0236 ± 0,00361
Seconda	14	64037	32117	2	0,238 ± 0,0586
Terza	14	65928	30931	2,13	0,242 ± 0,0149
Terza	21	102039	60542	1,68	0,311 ± 0,00208
Terza	28	126138	80296	1,57	0,330 ± 0,00615
Terza	39	183888	104091	1,77	0,354 ± 0,0181
Prima	49	205750	-	-	0,406 ± 0,0183
Terza	66	251842	-	-	0,513 ± 0,023

Nella figura seguente (**Figura 4.11**), sono diagrammati i valori della CO₂ e delle aflatossine prodotte; sull'asse delle ascisse è presente il tempo d'incubazione (giorni), sull'asse delle ordinate principale a sinistra sono indicate le quantità di CO₂ cumulata media prodotta (mg) rapportate alla massa delle nocciole (kg) e sull'asse delle ordinate secondario a destra sono indicati i valori di aflatossine totali prodotte (µg) rapportate alla massa di nocciole (kg).

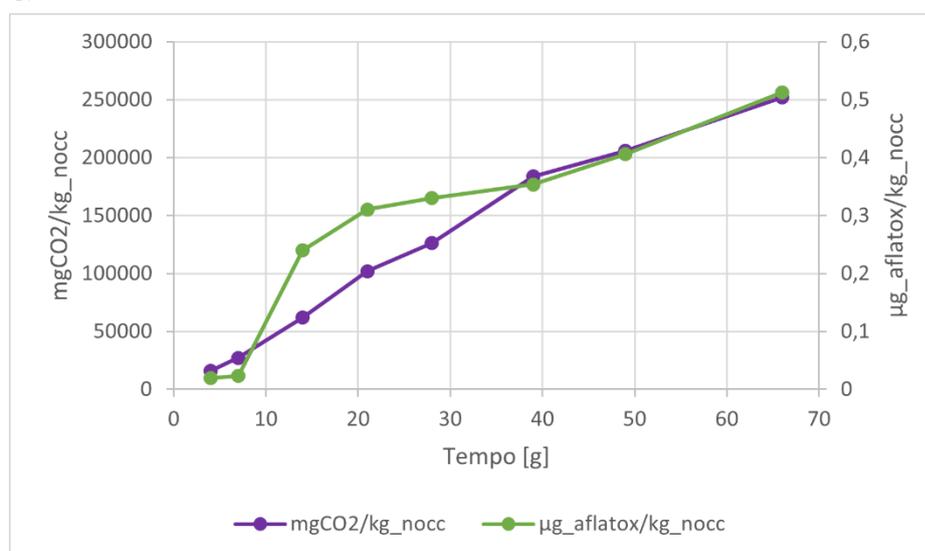


Figura 4.11: valori di CO₂ e aflatossine prodotte

Si osserva che, in corrispondenza dei primi 14 giorni si registra un incremento notevole delle quantità di aflatoxine totali prodotte (da 0,0193 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 4 giorni a 0,24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ medi a 14 giorni), come visibile in **Tabella 4.25**. Questo aspetto è confermato dal fatto che il tratto 7-14 giorni è quello con la massima pendenza e la massima velocità di produzione di aflatoxine. La quantità di CO_2 media cumulata prodotta, invece, in corrispondenza dello stesso periodo temporale, aumenta ma con una pendenza circa costante. Dunque, dai dati ottenuti, si osserva che il tratto 7-14 giorni, corrispondente alla fase di crescita esponenziale della biomassa fungina, coincide con il periodo in cui si ha la massima produzione di aflatoxine. Tuttavia, come riportato in letteratura [4], le aflatoxine sono metaboliti secondari dei funghi filamentosi e, in quanto tali, ci si aspetterebbe la loro produzione in fase stazionaria di crescita e non in fase esponenziale, come invece si è verificato. Ciò sottolinea l'importanza del monitoraggio della crescita fungina soprattutto nei primi giorni d'incubazione e la valutazione dell'attività respirometrica risulta essere un metodo efficace per individuare i giorni in cui ci si aspetta la produzione di aflatoxine.

Nei tratti successivi, le aflatoxine prodotte continuano ad aumentare ma con velocità minori e, nel tratto 39-66 giorni, le velocità risultano confrontabili con quelle relative alla CO_2 . Si ha conferma di questo aspetto poiché, nel periodo temporale citato, le curve presenti in **Figura 4.11** risultano sovrapponibili.

Per chiarire meglio quanto appena esposto, si è realizzato il seguente grafico (**Figura 4.12**) in cui la quantità di CO_2 cumulata media prodotta (mg) rapportata alla massa di nocciole (kg) viene rappresentata in funzione della quantità di aflatoxine totali prodotte (μg), anch'esse rapportate alla massa delle nocciole (kg). In aggiunta è stata rappresentata anche la curva relativa all'andamento dell' O_2 cumulato medio consumato (mg) rapportato alla massa di nocciole (kg).

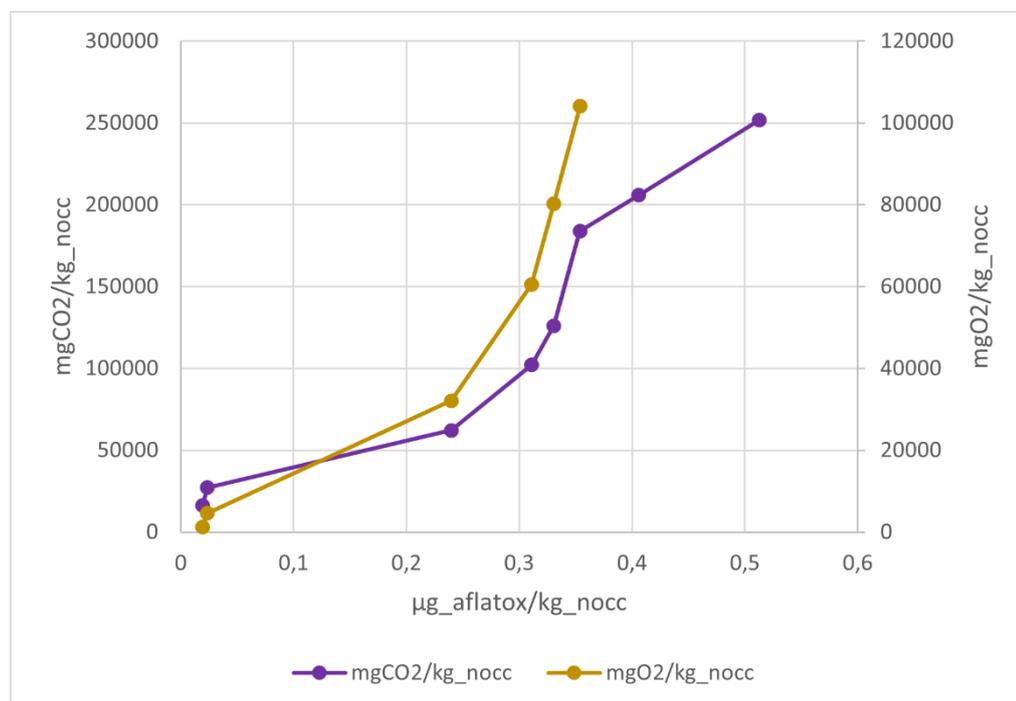


Figura 4.12: CO_2 prodotta e O_2 consumato in funzione delle aflatoxine prodotte

Dall'osservazione dell'andamento si ha conferma di quanto esposto in precedenza in relazione alla produzione delle aflatoxine. Nei primi 4 e 7 giorni il quantitativo di CO_2 prodotta (16228 mg/kg a 4 giorni, 27303 mg/kg a 7 giorni) risulta nettamente superiore al quantitativo

di O₂ consumato (1215 mg/kg a 4 giorni, 4671 mg/kg a 7 giorni). Questo trova conferma nel QR che assume valori elevati e pari a 13,3 a 4 giorni e a 5,84 a 7 giorni (**Tabella 4.25**). Il quantitativo di aflatoxine aumenta da 0,0193 µg/kg a 4 giorni fino a 0,0236 µg/kg a 7 giorni. Avanzando fino al giorno 14 si osserva una riduzione del rapporto tra la CO₂ prodotta (64037 mg/kg) e l'O₂ consumato (31290 mg/kg) e, infatti, il QR diminuisce fino a un valore pari a 2.

Si può confermare che, come detto in relazione alla **Figura 4.11**, nei primi 14 giorni, corrispondenti alla fase esponenziale di crescita, in cui il quantitativo di ossigeno consumato risulta inferiore all'anidride carbonica prodotta e il QR assume valori elevati, si ha una produzione importante di aflatoxine il cui valore aumenta del 92% passando da 0,0193 µg/kg (4 giorni) a 0,24 µg/kg (14 giorni).

Dal giorno 14 fino al giorno 39 il QR tende a diminuire ulteriormente ma in generale si stabilizza all'incirca a un valore prossimo al 2 (1,7) (**Tabella 4.25**). Allo stesso tempo le aflatoxine continuano gradualmente ad aumentare fino al valore di 0,354 µg/kg al giorno 39.

Nel periodo 14-39 giorni si ha che l'incremento del quantitativo di O₂, pari al 70%, risulta maggiore dell'incremento della CO₂ prodotta (65%) (**Figura 4.12**). Data la definizione di QR secondo la formula (9), si giustifica il motivo per il quale esso decresce. Allo stesso tempo, le concentrazioni di aflatoxine totali aumentano da 0,24 µg/kg a 0,354 µg/kg.

Dal seguente grafico (**Figura 4.13**) si riesce a comprendere meglio la relazione descritta tra l'andamento del QR e delle aflatoxine prodotte all'avanzare del tempo d'incubazione.

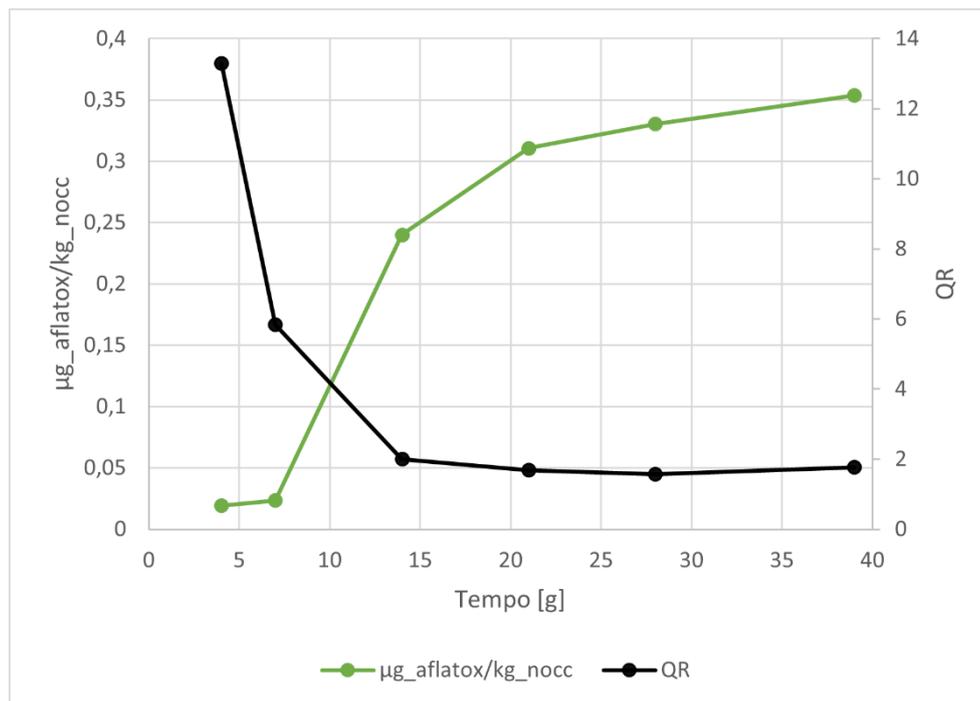


Figura 4.13: aflatoxine prodotte e QR in funzione del tempo d'incubazione

All'avanzare del tempo d'incubazione, le aflatoxine prodotte e il QR assumono andamenti inversamente proporzionali: a una diminuzione del QR corrisponde un aumento delle aflatoxine totali prodotte. Inoltre, come precedentemente descritto, nel periodo 14-39 giorni, si osserva che, anche se il QR si stabilizza a valore prossimi a 2, le aflatoxine prodotte continuano ad aumentare.

5 Conclusioni

L'obiettivo, in funzione del quale si è svolta l'attività sperimentale, è stato analizzare se nocciole commerciali, mantenute in condizioni ottimali di crescita microbica (temperatura a 25°C e umidità costante), fossero effettivamente interessate dallo sviluppo di biomassa. A tal fine, si è svolta l'attività sperimentale in cui, grazie al monitoraggio respirometrico (CO₂ prodotta e O₂ consumato), si è valutata la crescita microbica, in seguito correlata alla produzione di aflatossine.

In un primo momento, dalle analisi di caratterizzazione chimico-fisica e morfologica sono stati valutati il pH, l'umidità e alcuni parametri dimensionali delle nocciole. I valori ottenuti sono risultati concordi con quelli presenti in letteratura. Grazie alla caratterizzazione microbiologica si è osservata la prevalenza di funghi filamentosi sulla superficie delle nocciole. In seguito, sono state realizzate tre prove sperimentali in cui un *monolayer* di nocciole è stato incubato all'interno di microcosmi e sono stati monitorati, in maniera discontinua, i quantitativi di CO₂ e aflatossine prodotte e di O₂ consumato. Le valutazioni della CO₂ prodotta e dell'O₂ consumato sono risultate efficaci nel monitoraggio della respirazione correlabile alla crescita microbica.

Inoltre, dall'analisi delle aflatossine totali prodotte è stato riscontrato che, sebbene esse siano metaboliti secondari [4], la massima produzione si verifica durante la fase esponenziale di crescita microbica, nel caso in esame compresa tra i giorni 7 e 14. Questo consente di sottolineare l'importanza delle valutazioni respirometriche, in base alle quali si può avere una indicazione del momento in cui si ha la massima produzione di aflatossine. Nella presente attività sperimentale, la maggiore produzione di aflatossine è risultata correlabile a valori di QR compresi tra 13,3 e 2,13.

Infine, le concentrazioni delle aflatossine misurate sperimentalmente (valore massimo ottenuto pari a 0,513 µg/kg) sono risultate rientranti nei limiti legislativi imposti dal Regolamento (CE) n. 1881/2006 secondo il quale il massimo quantitativo di aflatossine totali (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) consentito in nocciole destinate al consumo diretto o utilizzate come ingrediente in alimenti derivati è pari a 10 µg/kg [52].

L'interesse nei confronti delle micotossine deriva dal fatto che diversi studi hanno comprovato la loro pericolosità per la salute umana e animale, in quanto potenziali cause di patologie acute o croniche. Inoltre, un aspetto non trascurabile è anche il fatto che nel mondo ogni anno circa il 25% dei raccolti è contaminato da micotossine [36]. Questo comporta ingenti perdite economiche a causa del fatto che i prodotti contaminati devono essere spesso scartati e non risultano vendibili. Infatti, sebbene esistano metodi di decontaminazione di diversa natura (fisici, chimici e biologici), non sempre è possibile applicarli per ridurre le concentrazioni di micotossine presenti, poiché spesso si rischia di provocare un danneggiamento dell'alimento trattato dal punto vista organolettico e la formazione di ulteriori composti tossici.

Bibliografia

- [1] V. Cristofori, *Fattori di qualità della nocciola*, Università degli studi della Tuscia di Viterbo, 2005.
- [2] K. Krol e M. Gantner, «Morphological Traits and Chemical Composition of Hazelnut from Different Geographical Origins: A Review,» *Agriculture*, 2020.
- [3] FAOSTAT, «Value of Agricultural Production,» 2022. [Online]. Available: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QV>. [Consultato il giorno Gennaio 2024].
- [4] R. Daou, K. Joubrane, R. G. Maroun, L. Rabbaa Khabbaz, A. Ismail e A. El Khoury, «Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies,» *AIMS Agriculture and Food*, pp. 416-447, 2021.
- [5] C. Alasalvar e F. Shahidi, *Tree Nuts Composition, Phytochemicals and Health Effects*, CRC Press, 2009.
- [6] Nutalia, «Nutalia: il ciclo produttivo,» [Online]. Available: <https://www.nutalia.it/il-ciclo-produttivo/>.
- [7] N. Chiewchan, A. S. Mujumdar e S. Devahastin, «Application of Drying Technology to Control Aflatoxins in Foods and Feeds: A Review,» *Drying Technology: An International Journal*, 2015.
- [8] N. Göncüoğlu Taş e V. Gökmen, «Effect of Roasting and Storage on the Formation of Maillard Reaction and Sugar Degradation Products in Hazelnuts (*Corylus avellana* L.),» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 415-424, 10 Dicembre 2018.
- [9] A. Fardelli, *Effetto dei sistemi di conservazione sulla qualità delle nocciole (*Corylus avellana* L.)*, Università degli Studi della Tuscia di Viterbo, 2008.
- [10] R. P. F. Guiné, C. F. F. Almeida e P. M. R. Correia, «Influence of packaging and storage on some properties of hazelnuts,» *Food Measure*, pp. 11-19, 2015.
- [11] F. Bosco, «Appunti del corso di "Fondamenti di biologia molecolare e microbiologia",» 2020.
- [12] C. Baltaci, H. Ilyasoglu e S. Cavrar, «Aflatoxin levels in raw and processed hazelnuts in Turkey,» *Food Additives and Contaminants: Part B*, pp. 83-86, 2012.
- [13] A. Prella, D. Spadaro, A. Garibaldi e M. L. Gullino, «Aflatoxin monitoring in Italian hazelnut products by LC-MS,» *Food Additives and Contaminants: Part B*, vol. 5, pp. 279-285, 2012.
- [14] M. Reverberi, A. Ricelli, S. F. A. A. Zjalic e C. Fanelli, «Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 899-911, 2010.
- [15] M. Salvatore, A. Andolfi e R. Nicoletti, «Mycotoxin Contamination in Hazelnut: Current Status, Analytical Strategies, and Future Prospects,» *Toxins*, 2023.

- [16] P. A. Murphy, S. Hendrich, C. Landgren e C. M. Bryant, «Food Mycotoxins: An Update,» *Journal of food science*, vol. 71, n. 5, pp. 51-65, 2006.
- [17] G. Perrone e A. Susca, «Penicillium Species and Their Associated Mycotoxins,» in *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols*, Springer Science, 2017, pp. 107-119.
- [18] G. Perrone e A. Gallo, «Aspergillus Species and Their Associated Mycotoxins,» in *Mycootoxigenic Fungi: Methods and Protocols*, Springer Science, 2017, pp. 33-49.
- [19] S. Baniya, «Aspergillus: Morphology, Clinical Features and Lab Diagnosis,» 30 Dicembre 2023. [Online]. Available: <https://microbeonline.com/aspergillus-morphology-clinical-features-and-lab-diagnosis/>. [Consultato il giorno Febbraio 2024].
- [20] D. Picková, V. Ostry, J. Toman e F. Malir, «Aflatoxins: History, Significant Milestones, Recent Data on Their Toxicity and Ways to Mitigation,» *Toxins*, 2021.
- [21] IARC Publications, «Fungi producing significant mycotoxins,» [Online]. [Consultato il giorno Febbraio 2024].
- [22] T. Ross e D. S. Nichols, «ECOLOGY OF BACTERIA AND FUNGI IN FOODS: Influence of Temperature,» in *Encyclopedia of Food Microbiology*, Elsevier, 2014, pp. 602-609.
- [23] E. Coton e I. Leguerinel, «ECOLOGY OF BACTERIA AND FUNGI IN FOODS: Effects of pH,» in *Encyclopedia of Food Microbiology*, Elsevier, 2014, pp. 577-586.
- [24] K. A. Wheeler, B. F. Hurdman e J. Pitt, «Influence of pH on the growth of some toxigenic species of Aspergillus, Penicillium and Fusarium,» *International Journal of Food Microbiology*, pp. 141-150, 1991.
- [25] V. Bruno, *Sicurezza alimentare. Analisi dei rischi*, Politecnico di Torino: Tesi di Laurea Magistrale, 2023.
- [26] S. Dagnas e J.-M. Membré, «Predicting and Preventing Mold Spoilage of Food Products,» *Journal of Food Protection*, vol. 76, pp. 538-551, 2013.
- [27] C. L. Gerez, M. I. Torino, G. Rollan e G. Font de Valdez, «Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties,» *Food Control*, n. 20, pp. 144-148, 2009.
- [28] K. C. Ehrlich, B. G. Montalbano e P. J. Cotty, «Divergent regulation of aflatoxin production at acidic pH by two Aspergillus strains,» *Mycopathologia*, vol. 159, pp. 579-581, 2005.
- [29] S. Ozcelik e N. Ozcelik, «Interacting effects of time, temperature, pH and simple sugars on biomass and toxic metabolite production by three Alternaria spp.,» *Mycopathologia*, pp. 171-175, 1990.
- [30] J. Liu, L. Sun, N. Zhang, J. Zhang, J. Guo, C. Li, S. A. Rajput e D. Qi, «Effects of Nutrients in Substrates of Different Grains on Aflatoxin B1 Production by Aspergillus flavus,» *BioMed Research International*, 2016.

- [31] A. Medina, A. Rodrigueaz e N. Magan, «Climate change and mycotoxigenic fungi: impacts on mycotoxin production,» *Food Science*, 2015.
- [32] H. J. Van der Fels-Klerx, C. Lu e P. Battilani, «Modelling climate change impacts on mycotoxin contamination,» *World Mycotoxin Journal*, vol. 9, pp. 717-726, 2016.
- [33] J. Pleadin, J. Frece e K. Markov, «Mycotoxins in food and feed,» *Advances in Food and Nutrition Research*, 2019.
- [34] P. S. Steyn, «Mycotoxins, general view, chemistry and structure,» *Toxicology Letters*, pp. 843-851, 1995.
- [35] EFSA, «Risk assessment of ochratoxin A in food,» *EFSA Journal*, 2020.
- [36] R. A. El-Sayed, A. B. Jebur, W. Kang e F. M. El-Demerdash, «An overview on the major mycotoxins in food products: characteristics, toxicity, and analysis,» *Journal of Future Foods*, pp. 91-102, 2022.
- [37] B. Kabak, A. D. W. Dobson e I. Var, «Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: a Review,» *Food Science and Nutrition*, pp. 593-619, 2006.
- [38] J. P. F. D'Mello, A. M. C. Macdonald, D. Postel, W. T. P. Dujksma, A. Dujardin e C. M. Placinta, «Pesticide use and mycotoxin production in Fusarium and Aspergillus phytopathogens,» *European Journal of Plant Pathology*, vol. 104, pp. 741-751, 1998.
- [39] European Commission, «OPINION ON THE RELATIONSHIP BETWEEN THE USE OF PLANT PROTECTION PRODUCTS ON FOOD PLANTS AND THE OCCURRENCE OF MYCOTOXINS IN FOODS,» 30 Novembre 1999. [Online]. Available: https://food.ec.europa.eu/system/files/2020-12/sci-com_scp_out56_en.pdf. [Consultato il giorno 2024].
- [40] V. Kagot, S. Okoth, M. De Boevre e S. De Saeger, «Biocontrol of Aspergillus and Fusarium Mycotoxins in Africa: Benefits and Limitations,» *Toxins*, vol. 11, n. 109, 2019.
- [41] G. Ozay, F. Seyhan, C. Pembeci, S. Saklar e A. Yilmaz, «Factors influencing fungal and aflatoxin levels in Turkish hazelnuts (*Corylus avellana* L.) during growth, harvest, drying and storage: A 3-year study,» *Food Additives and Contaminants*, vol. 25, pp. 209-218, 2008.
- [42] M. Fontana, M. Somenzi e A. Tesio, «Cultivation, Harvest and Postharvest Aspects that Influence Quality and Organoleptic Properties of Hazelnut Production and Related Final Products,» *Acta Horticulturae*, pp. 311-314, 2014.
- [43] S. Cenkowski, C. Pronyk, D. Zmidzinska e W. E. Muir, «Decontamination of food products with superheated steam,» *Journal of Food Engineering*, vol. 83, pp. 68-75, 2007.
- [44] O. S,ims,ek, M. Arici e C. Demir, «Mycoflora of hazelnut (*Corylus avellana* L.) and aflatoxin content in hazelnut kernels artificially infected with *Aspergillus parasiticus*,» *Food/Nahrung*, vol. 46, pp. 194-196, 2002.

- [45] D. Ghirardello, C. Contessa, N. Valentini, G. Zeppa, L. Rolle, V. Gerbi e R. Botta, «Effect of storage conditions on chemical and physical characteristics of hazelnut (*Corylus avellana* L.),» *Postharvest Biology and Technology*, vol. 81, pp. 37-43, 2013.
- [46] L.-Z. Deng, Y. Tao, A. S. Mujumdar, Z. Pan, C. Chen, X.-H. Yang, Z.-L. Liu, H. Wang e H.-W. Xiao, «Recent advances in non-thermal decontamination technologies for microorganisms and mycotoxins in low-moisture foods,» *Trends in Food Science & Technology*, pp. 104-112, 2020.
- [47] M. Piotrowska e A. Masek, «*Saccharomyces Cerevisiae* Cell Wall Components as Tools for Ochratoxin A Decontamination,» *Toxins*, pp. 1151-1162, 2015.
- [48] C. Wolf e F. J. Schweigert, *Mycotoxin analysis: a focus on rapid methods*, 2018.
- [49] R. Pisano, *Appunti del corso di "Principi di Biotecnologie Farmaceutiche"*, 2023.
- [50] R-Biopharm AG, «Lateral flow assays,» [Online]. Available: <https://food.r-biopharm.com/technologies/lateral-flow-assays/>. [Consultato il giorno Febbraio 2024].
- [51] Ministero della Salute, «Contaminanti e tossine vegetali naturali,» 10 Ottobre 2008. [Online]. Available: https://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=1172&area=sicurezzaAlimentare&menu=chimica. [Consultato il giorno Dicembre 2023].
- [52] Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, «Regolamento (CE) N. 1881/2006,» 19 Dicembre 2006. [Online]. [Consultato il giorno Dicembre 2023].
- [53] EFSA, «Presenza di aflatossine negli alimenti: l'EFSA valuta la proposta di nuovi livelli massimi per mandorle, nocciole e pistacchi e fornisce un parere alla Commissione europea.,» 2 Marzo 2007. [Online]. Available: <https://www.efsa.europa.eu/it/news/aflatoxins-food-efsa-assesses-new-proposed-maximum-levels-almonds-hazelnuts-and>. [Consultato il giorno Dicembre 2023].
- [54] FDA, «Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed,» Agosto 2000. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-action-levels-poisonous-or-deleterious-substances-human-food-and-animal-feed>. [Consultato il giorno dicembre 2023].
- [55] Petruzalek, «Safe-T-Fresh la sicurezza brevettata,» [Online]. Available: <https://www.petruszalek.com/it/cold-ready-meals/contentitori-per-packaging-di-gastronomia-fredda/safe-t-fresh/>. [Consultato il giorno Gennaio 2024].
- [56] E. Bonisoli, C. Delprete, R. Sesana, A. Tamburro e S. Tornincasa, «Testing and simulation of three point bending anisotropic behaviour of hazelnut shells,» *Byosystems Engineering*, pp. 134-141, 2015.
- [57] F. Bosco, «Appunti del corso "Principi di Biotecnologie Farmaceutiche",» 2023.
- [58] S. J. Lombardi, G. Pannella, P. Tremonte, I. Mercurio, F. Vergalito, C. Caturano, L. Maiuro, M. Iorizzo, M. Succi, E. Sorrentino e R. Coppola, «Fungi Occurrence in

- Ready-to-Eat Hazelnuts (*Corylus avellana*) From Different Boreal Hemisphere Areas,» *Frontiers in Microbiology*, vol. 13, n. 900876, 2022.
- [59] Università degli Studi di Napoli Federico II, «Titolazioni,» [Online]. Available: <https://www.docenti.unina.it/webdocenti-be/allegati/materiale-didattico/34009840>.
- [60] C. Mollea, Simulazione e monitoraggio in microcosmo della degradazione di un composto tossico volatile ad opera di microrganismi fungini. Tesi di Dottorato di Ricerca, Politecnico di Torino, 2003.
- [61] VELP scientifica, «Download: Application notes,» 2022. [Online]. Available: <https://www.velp.com/it-it/respirometric-sensor-system-per-analisi-dei-terreni.aspx>.
- [62] R-Biopharm AG, *RIDASCREEN Aflatoxin Total*, 2022.
- [63] F. Ozdemir e I. Akinci, «Physical and nutritional properties of four major commercial Turkish hazelnut varieties,» *Journal of Food Engineering*, pp. 341-347, 2004.
- [64] N. Valentini, G. Zeppa e L. Rolle, «Applicazione della colorimetria, della "Texture Analysis" e dell'analisi sensoriale nella caratterizzazione delle nocciole italiane,» 2003. [Online]. Available: <http://www.giuseppezeppa.com/files/134.pdf>. [Consultato il giorno Gennaio 2024].
- [65] Gazzetta ufficiale delle Comunità Europee, «REGOLAMENTO (CE) N. 1284/2002 DELLA COMMISSIONE,» 15 Luglio 2002. [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:187:0014:0020:IT:PDF>. [Consultato il giorno Dicembre 2024].
- [66] K. V. Narasaiah, R. B. Sashidhar e C. Subramanyam, «Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediates,» *Mycopathologia*, n. 162, pp. 179-189, 2006.
- [67] J. Adye e R. Mateles, «Incorporation of labelled compounds into aflatoxins,» *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA*, vol. 86, pp. 418-420, 1964.