



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

**APPROCCIO MATEMATICO NELLO
STUDIO DELLA SHELF-LIFE**

**MATHEMATICAL APPROACH IN THE
STUDY OF SHELF-LIFE**

TIPO TESI: compilativa

Studente:
LUCA BERTI

Relatore:
DOTT.SSA MARIATERESA CIOMMI

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

ELENCO DELLE TABELLE.....
ELENCO DELLE FIGURE.....
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI.....
CAPITOLO 1 GENERALITÀ.....
1.1 Evoluzione shelf-life.....
1.2 TMC e data di scadenza.....
CAPITOLO 2 STUDIO DI SHELF-LIFE.....
2.1 Studio di Shelf-Life.....
2.2 Fasi dello studio di shelf-life.....
2.2.1 Caratterizzazione del prodotto e identificazione dei fattori che influenzano la shelf-life.....
2.2.2 Definizione del piano sperimentale e conduzione dello studio di shelf-life.....
2.2.3 Valutazione dei risultati e verifica della shelf-life attraverso l'analisi di ulteriori campioni e la verifica delle condizioni di conservazione reali.....
2.3 Indicatori.....
CAPITOLO 3 APPLICAZIONE DEI MODELLI MATEMATICI NELLA PREDIZIONE DELLA SHELF-LIFE.....
3.1 Panoramica.....
3.2 modello per valutare la shelf life del succo di canna da zucchero, pronto da bere.....
3.2.1 Sviluppo della ricetta.....
3.2.2 Rapporto tra tempo di conservazione e proprietà fisico-chimiche.....
3.2.3 regressione lineare.....
3.2.4 Valutazione del modello.....
3.3 Modello per valutare la perdita di freschezza del tè verde durante la conservazione (FLGT).....
3.3.1 Valutazione sensoriale.....
3.3.2 Q10.....
3.3.3 Analisi di sopravvivenza come metodo di valutazione alternativo.....
3.4 Utilizzo di un modello predittivo per migliorare la conservazione dei prodotti da forno: il caso di <i>Aspergillus candidus</i>
3.4.1 Modello primario e valutazione dell'effetto delle temperature e attività dell'acqua.....

3.4.2	Dalla teoria esponenziale al modello trifasico.....
3.4.3	Evoluzione concettuale.....
3.4.4	Modello secondario.....
3.4.5	Concetto Gamma.....
3.4.6	Il tempo di comparsa e tempo di adattamento.....
3.4.7	Precisione e accuratezza.....
3.5	Predizione della stabilità di cereali per la colazione confezionati in pacchi flessibili.....
3.5.1	Panoramica.....
3.5.2	Sorbimento di acqua da parte degli alimenti.....
3.5.3	Condensazione capillare e Isteresi.....
3.5.4	Adattamento della curva dell'isoterma.....
3.5.5	Permeabilità della confezione.....
3.5.6	Contenuto critico di umidità.....
3.5.7	Predizione della shelf-life.....
	CONCLUSIONI.....
	BIBLIOGRAFIA.....

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1: Esempio a 30° per 70 giorni di valutazione sensoriale mediante metodo della somma ponderata.....

ELENCO DELLE FIGURE

- Figura 1: teoria degli ostacoli, i microrganismi presenti in un prodotto alimentare finito, non devono essere in grado di superare gli ostacoli presenti, altrimenti l'alimento non sarà più accettabile. Si può dunque intervenire, dapprima andando a inserire questi ostacoli e poi "regolare l'altezza" per renderli invalicabili da parte dei m.o. Fonte: Adattamento da Tapia de Daza et al. (1996). Figura 10, pag. 645. ^[28].....
- Figura 2: Illustrazione di un processo decisionale nello studio di shelf-life di un alimento. Rielaborazione immagine Guidance on date marking and related food information: part 1 (date marking). EFSA Journal, 18(12), doi:10.2903/j.efsa.2020.6306. ^[9].....
- Figura 3: figura che mostra la distanza tra i valori osservati e i valori previsti.....
- Figura 4: esempi di coefficienti di correlazione. Fonte: Webinar, 2020.....
- Figura 5: da sinistra verso destra prima un R^2 basso e poi a destra un R^2 alto. Fonte : Webinar www.spss.it , 2020.....
- Figura 6: Curva a vasca da bagno. Fonte: immagine modificata da Fragassa, Cristiano. (2007). QUALITÀ E CERTIFICAZIONE. ^[6].....
- Figura 7: Fonte : Moore, D., Robson, et. Al (2011).^[21].....
- Figura 8: Immagine che rappresenta le tre fasi.Fonte:<https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0125>.^[24].....
- Figura 9: tLAG definito come T_a+T_m . T_a = periodo in cui il microrganismo si adatta al nuovo substrato. T_m ,periodo richiesto dopo l'adattamento durante il quale il m.o. si prepara per la prima divisione. Fonte: Fonte:<https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0125>. ^[24].....
- Figura 10: Correlazione tra il tempo osservato e il tempo previsto per la visibilità del micelio (tv) sulle torte Madeleine (è stata applicata la trasformazione radice quadrata per ridurre la varianza). (A) Il tv previsto è stato calcolato utilizzando l'attività dell'acqua iniziale delle torte (compresa tra 0,75 e 0,91); (B) il tv previsto è stato calcolato utilizzando l'attività dell'acqua misurata dopo 14 giorni di conservazione (equilibrio di attività dell'acqua) a 15, 20 o 25 °C. Fonte: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.004>. ^[11].....
- Figura 11: Ciclo di isteresi dell'assorbimento dell'umidità. Fonte: Kapsalis. ^[13].....

Figura 12: Rappresentazione di un poro a forma di beuta (o bottiglia d'inchiostro ink-bottle).
Fonte: 0-8247-4063-7. ^[5].....

Figura 13: Retta rappresentante l'equazione di Langmuir.....

Figura 14: Grafico del monostrato BET, fonte: Rielaborazione immagine DeMan, J. M.
(1999) ^[5].....

Figura 15: Linearizzazione isosterma Fonte : Barbosa-Cánovas, Fontana, et al. 2007 ^[3].....

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Questa tesi si propone di esplorare l'approccio matematico alla previsione della shelf-life degli alimenti. La shelf-life è un parametro critico per garantire la sicurezza e la qualità, ed è determinata da una complessa interazione di fattori chimici, fisici e microbiologici. Nel corso degli anni, numerosi studi scientifici hanno cercato di sviluppare modelli matematici per prevedere la shelf-life, sfruttando la logica e il rigore della matematica per comprendere e predire i processi di deterioramento degli alimenti.

Lo scopo di questa tesi è quello di analizzare e descrivere l'approccio matematico utilizzato in alcuni studi scientifici, che trattano la previsione della shelf-life con l'approccio matematico. Saranno esaminati alcuni aspetti dei modelli matematici adottati, le assunzioni di base e i metodi utilizzati per ottenere le previsioni. Verranno esaminati i diversi fattori che influenzano la shelf-life degli alimenti, i processi di deterioramento e i risultati ottenuti.

CAPITOLO 1

GENERALITÀ

Gli alimenti sono per natura deperibili a scadenza. Le condizioni presenti (come temperatura, umidità...) in ogni fase di manipolazione e conservazione dell'alimento possono accelerare o diminuire il fenomeno del deperimento.

Il deperimento avviene per una serie di cambiamenti (chimico- fisici e microbiologici) che porteranno ad un certo punto alla non accettabilità del prodotto da parte del consumatore poiché non tollera ovviamente né un prodotto non sicuro, che potrebbe quindi danneggiare la salute, né un alimento non appetibile, non estetico (es. passata di pomodoro con un colore non molto rosso). In ogni caso ad un certo punto gli alimenti raggiungono la non tollerabilità da parte del consumatore e quindi la fine della commerciabilità (Wilbey, R Andrew, 1997 et al.)^[31]

1.1 Evoluzione shelf-life

L'uomo fin dall'antichità ha cercato di conservare gli alimenti per evitarne lo spreco e garantirne la disponibilità in periodi di scarsità. L'interesse per la valutazione degli alimenti conservati è cresciuto con l'avvento della microbiologia attraverso metodi sempre più scientifici. Nel 1809, Appert inventò il metodo dell'appertizzazione, che diede una svolta alla conservazione degli alimenti. In seguito, seguirono importanti scoperte da parte di Bigelow, e nel 1906 furono introdotte le prime leggi a tutela della salute pubblica negli Stati Uniti. Anche in Europa furono introdotte leggi simili, e ad oggi esiste il Codex Alimentarius che fornisce linee guida per la sicurezza alimentare internazionale. Lo studio di conservazione su basi scientifiche inizialmente si concentrava su criteri microbiologici perché responsabili di malattie alimentari ma via via è aumentato anche l'interesse organolettico, in cui si considerano aspetti relativi al gusto, all'aspetto e all'odore dell'alimento.

La definizione di shelf-life che letteralmente significa "vita del prodotto sullo scaffale", in Italia viene tradotta in "vita commerciale" dalla norma UNI 10534/1995 dell'ente italiano di

normazione come il periodo di tempo che corrisponde in determinate condizioni di conservazione, ad una tollerabile diminuzione della qualità dell'alimento confezionato. . L'aggettivo "tollerabile" rimane un pò ambiguo sul lato pratico mentre le linee guida dell'IFST (1993) ^[12] forniscono una definizione più precisa riferendosi alla durata di conservazione come il tempo durante il quale il prodotto alimentare:

- (i) rimarrà sicuro;
- (ii) sarà certo di mantenere le caratteristiche sensoriali, chimiche, fisiche e microbiologiche desiderate;
- (iii) sarà conforme a qualsiasi dichiarazione di dati nutrizionali sull'etichetta, quando conservato nelle condizioni consigliate .

Mentre la sicurezza degli alimenti è un requisito legale, la qualità degli alimenti è una scelta del produttore per rispondere alle esigenze dei consumatori. Per questo motivo il Reg. UE 1169/2011 relativo all'etichettatura obbliga le aziende a fornire informazioni sulla vita di scaffale dei prodotti, distinguendo tra "data di scadenza" e "termine minimo di conservazione" (TMC).

1.2 TMC e data di scadenza

"Il "termine minimo di conservazione" (TMC) è la data entro cui l'alimento mantiene le sue proprietà sensoriali (texture, consistenza, aroma, sapore, colore, aspetto) in adeguate condizioni di conservazione" ¹. Non si parla di sicurezza nella definizione perché il consumo oltre il TMC non è immediatamente pericoloso per il consumatore. Ed è infatti designato con la dicitura "consumarsi preferibilmente entro ..." seguita dalla data. Il TMC si applica infatti su alimenti stabili dal punto di vista microbiologico, sicuri in virtù delle loro caratteristiche (ad esempio molto acidi o secchi) o grazie ai trattamenti tecnologici che hanno subito durante la produzione (es. sterilizzazione, essiccazione, aggiunta di conservanti) e perciò risultano stabili per mesi o anche anni e vengono definiti poco deperibili. In questi casi il rischio maggiore non è quello sulla sicurezza al consumo costituito da una pericolosa crescita microbica, ma la durabilità è limitata in genere da una perdita delle caratteristiche qualitative o nutrizionali che non dà luogo a "un pericolo immediato per la salute umana".²

Nel caso di alimenti molto deperibili (formaggi freschi, carne ed alcuni prodotti a base di carne, pasta fresca, piatti pronti refrigerati, frutta e verdura IV gamma) che dal punto di vista

¹ Fonte: <https://foodsafetylab.it/blog/item/101-la-conservazione-degli-alimenti.html>

² Fonte: articolo 24, paragrafo 1, del regolamento (UE) n. 1169/2011.

microbiologico, dopo un breve periodo, potrebbero costituire un pericolo immediato per la salute umana, il termine minimo di conservazione è sostituito dalla data di scadenza.

La data di scadenza è la data oltre la quale non è garantita la sicurezza dell'alimento dall'OSA (operatore del settore alimentare) che se consumato dopo tale data potrebbe nuocere alla salute per via dello sviluppo di microrganismi principalmente. Ed è infatti designato nella confezione con la dicitura "da consumarsi entro e non oltre..." seguita dalla data.

In generale, i cambiamenti microbiologici sono di primaria importanza per i prodotti a breve conservazione, mentre i cambiamenti chimici e sensoriali lo sono per i prodotti a conservazione media o lunga. Quindi a meno che la sicurezza microbiologica non sia un problema, la definizione di durata di conservazione è legata alla posizione del prodotto sul mercato in termini di qualità e di percezione del cliente di quella qualità. (Kilcast, D., & Subramaniam, P. (2000) ^[15]

Va ricordato inoltre che l'indicazione sulla shelf-life è valida fintanto che l'alimento è mantenuto nella propria confezione originaria e nelle condizioni indicate in etichetta. Quando questa viene aperta, si parla di shelf-life secondaria ed è nella maggior parte dei casi completamente diversa da quella primaria. Per esempio, un latte a lunga conservazione, può essere conservato per mesi, a temperatura ambiente, rispettando la data indicata sull'etichetta o stampata direttamente sulla confezione, ma volta aperto le indicazioni in etichetta indicano di conservarlo in frigorifero e di consumarlo entro al massimo 3 giorni. Lo stesso discorso vale per il latte UHT). ³

Dal punto di vista del produttore la shelf-life è il periodo di tempo in cui l'azienda produttrice deve garantire il mantenimento di tutte le caratteristiche di sicurezza, salubrità e qualità organolettica proprie di quell'alimento ⁴. Quindi ne consegue una responsabilità da parte dell'operatore sia in termini legali, che in termini qualitativi a scopo commerciale verso la clientela. È importante che l'industria conosca bene gli eventi che incidono sulla shelf-life durante tutta la filiera dalle materie prime, ingredienti e semilavorati industriali al prodotto su scaffale. È quindi facile capire come la determinazione della shelf-life sia di fondamentale importanza per un'azienda.

³ Fonte : <https://www.parmalat.it/magazine/dieta-sana/dieta-e-latte/come-conservare-correttamente-il-latte>.

⁴ Fonte:<https://www.linkedin.com/pulse/come-prolungare-la-shelf-life-di-un-alimento-ilaria-trento/?originalSubdomain=it>

CAPITOLO 2

STUDIO DI SHELF-LIFE

2.1 Studio di Shelf-Life

Per determinare la conservabilità di un alimento è richiesto uno studio di shelf-life malgrado l'inesistenza di una procedura standard definita dalla legge. L'EFSA, l'Autorità europea per la sicurezza alimentare, ha pubblicato delle linee guida per la valutazione della shelf-life degli alimenti che forniscono un quadro completo dei fattori da considerare. (Guidance on date marking and related food information: part 1 (date marking). EFSA ^[9]). Il principio di come deve essere effettuato lo studio è descritto nelle linee guida e si possono trovare almeno 3 step fondamentali:

1. Caratterizzazione del prodotto e identificazione dei fattori che influenzano la shelf-life.
2. Definizione del piano sperimentale e conduzione dello studio di shelf-life.
3. Valutazione dei risultati e verifica della shelf-life attraverso l'analisi di ulteriori campioni e la verifica delle condizioni di conservazione reali.

Vengono coinvolti laboratori certificati, si eseguono panel-test e si documentano gli esiti di questi test nel sistema di gestione della sicurezza alimentare, come il manuale HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point). La documentazione fornita comprende anche materiale bibliografico, relazioni tecniche e analisi di laboratorio. In sintesi, vengono riportati i ragionamenti svolti per ottenere la shelf-life.

2.2 Fasi dello studio di shelf-life

2.2.1 *Caratterizzazione del prodotto e identificazione dei fattori che influenzano la shelf-life.*

Questa è una fase ideativa dove si idealizza il prodotto e si considerano tutti gli aspetti che possono influire sulla sua conservazione. Si devono raccogliere informazioni per stimare i pericoli e i fenomeni degradativi che potrebbero verificarsi nel tempo. È necessario

considerare la tipologia di prodotto e gli ingredienti utilizzati, i processi di lavorazione e conservazione, il profilo microbiologico e chimico-fisico, la tipologia di confezionamento, le temperature e le condizioni di conservazione, le ricerche scientifiche, i dati storici, le informazioni aziendali e l'identificazione di eventuali limiti microbiologici o chimici previsti da norme specifiche.

2.2.2 Definizione del piano sperimentale e conduzione dello studio di shelf-life.

Una volta identificati i fattori che possono influenzare la conservazione del prodotto, si procede alla creazione di un progetto di simulazione al fine di testare la sua durata e determinare la shelf-life. Questo processo coinvolge l'osservazione di vari parametri e indicatori, tra cui la presenza di batteri, la composizione chimica e i cambiamenti nel sapore, nell'odore e nel valore nutrizionale del prodotto nel corso del tempo. In pratica, si tratta di condurre una sorta di test su un prototipo del prodotto per valutare quanto tempo può resistere prima di deteriorarsi e diventare inadatto al consumo.

In questa fase si eseguono anche test sensoriali, condotti in condizioni normali o estreme di conservazione (molto spesso si conducono in condizioni di abuso di temperatura). Una delle modalità è quella di simulare tutta la filiera fino al punto di immissione del prodotto sugli scaffali poi prelevare il prodotto dal "punto vendita" simulato e testarlo, altre volte invece si simulano situazioni particolarmente sfavorevoli per testare la tollerabilità del prodotto: ad esempio, se si sta testando un prodotto refrigerato che deve essere conservato a una temperatura tra 0-4°C, si potrebbe testarlo a 6/8°C per tutta la durata delle prove per verificare la tollerabilità del prodotto a temperature leggermente superiori.

Tuttavia accelerare i processi di degradazione del prodotto può comportare un aumento dei costi, quindi è preferibile concentrarsi inizialmente sui fattori più importanti e aumentare il livello di dettaglio man mano che si procede con lo sviluppo del prodotto. I test sensoriali possono essere descrittivi, per monitorare le modificazioni del prodotto e la comparsa di difetti, oppure possono essere utilizzati per valutare l'accettabilità del prodotto in termini estetici e gustativi da parte dei consumatori.

I test sensoriali sono delle prove che vengono fatte per valutare la qualità organolettiche degli alimenti, come il sapore, l'odore e la consistenza. Questi test devono essere condotti in condizioni controllate, (es. in stanze insonorizzate e con luminosità controllata) in modo da evitare di influenzare il giudizio degli assaggiatori con fattori esterni. I risultati dei test possono valutare l'accettabilità complessiva del prodotto o dei singoli aspetti sensoriali.

Tra i test più comuni ci sono quelli di classificazione degli alimenti, dove si valuta l'intensità degli aspetti sensoriali come il gusto e l'odore. Ci sono anche test come quelli triangolari e duo-trio, che vengono utilizzati per confrontare due campioni e valutare la preferenza tra di essi.

Va detto che l'approccio utilizzato per la valutazione degli aspetti sensoriali è scientifico e si utilizza una terminologia specifica, simile a quella utilizzata per l'assaggio dei vini. Tuttavia, è importante capire che questi test non valutano la salubrità del prodotto, ma solo la sua accettabilità sensoriale.

2.2.3 Valutazione dei risultati

Nella terza fase si utilizzano le informazioni estrapolate dai parametri/indicatori raccolte nella seconda fase (indicatori chimici, sensoriali e microbiologici), per valutare il grado di deterioramento del prodotto nel tempo.

L'obiettivo è verificare che i valori dei parametri/indicatori rimangano entro i limiti accettabili per tutta la durata di conservazione del prodotto. Questi valori sono stabiliti sulla base di norme specifiche o di ricerche scientifiche o su test di accettabilità. I parametri/indicatori rappresentano le prove di conservazione che sono necessarie per dimostrare che un prodotto rimane stabile e sicuro per il consumo nel tempo previsto.

2.3 Indicatori

Un indicatore è un qualche cosa che fornisce indicazioni, su qualcos'altro. In questo caso in modo semplicistico indicano se l'alimento è sicuro o meno per il consumo umano, (es. indicatori biologici) o anche se è di qualità accettabile o meno (es. indicatori sensoriali). Gli indicatori sono come le sentinelle che monitorano costantemente la "salute del prodotto" e danno una rappresentazione dell'andamento delle sue caratteristiche nel tempo.

Gli indicatori di tipo chimico/fisico sono misurabili attraverso analisi specifiche che permettono di monitorare i processi di degradazione in atto. Il valore del pH e dell'attività dell'acqua (a_w) sono esempi di parametri/indicatori strettamente correlati alla possibilità di crescita dei microrganismi, ed infatti questi indicatori diventano poi alcuni degli "ostacoli" alla crescita del microrganismo e più in particolare nella "teoria degli ostacoli" vengono rappresentati graficamente come ostacoli più o meno alti che impediscono al microrganismo di avanzare lungo il cammino della moltiplicazione. L'ossidazione lipidica è un altro

parametro importante da considerare, in quanto la degradazione dei grassi può portare alla formazione di composti rancidi che influenzano negativamente la qualità dell'alimento. La valutazione del contenuto di umidità è invece di elevata importanza per quei prodotti in cui la croccantezza è un fattore importante, in quanto il contenuto di acqua influisce sulla struttura e sulla consistenza del prodotto.

Gli indicatori di tipo microbiologico sono invece legati alla presenza e alla crescita di microrganismi nell'alimento. L'analisi del numero di muffe, lieviti e batteri presenti nel prodotto alimentare è fondamentale per garantire la sicurezza microbiologica degli alimenti, e il regolamento CE 2073/2005 impone dei limiti nel numero di microrganismi accettabili nei vari prodotti alimentari.

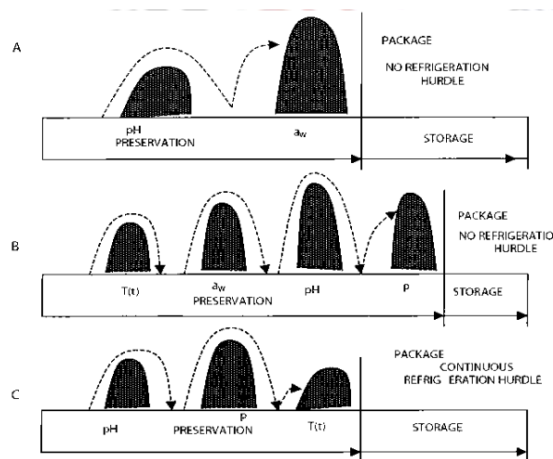


Figura 1: teoria degli ostacoli, i microrganismi presenti in un prodotto alimentare finito, non devono essere in grado di superare gli ostacoli presenti, altrimenti l'alimento non sarà più accettabile. Si può dunque intervenire, dapprima andando a inserire questi ostacoli e poi "regolare l'altezza" per renderli invalicabili da parte dei m.o. Fonte: Adattamento da Tapia de Daza et al. (1996). Figura 10, pag. 645. [28]

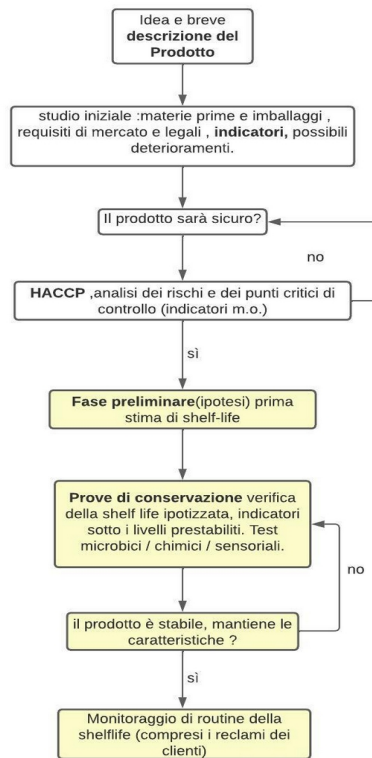


Figura 2: Illustrazione di un processo decisionale nello studio di shelf-life di un alimento. Rielaborazione immagine Guidance on date marking and related food information: part 1 (date marking). EFSA Journal, 18(12), doi:10.2903/j.efsa.2020.6306. [9]

CAPITOLO 3

APPLICAZIONE DEI MODELLI MATEMATICI NELLA PREDIZIONE DELLA SHELF-LIFE

3.1 Panoramica

I modelli matematici rappresentano uno strumento importante per lo studio di shelf-life degli alimenti. Essi consentono di analizzare l'evoluzione dei prodotti nel tempo e di valutare l'impatto di vari fattori, come la temperatura e l'umidità, sulla loro conservazione. Inoltre, questi modelli permettono di effettuare previsioni sulla durata di conservazione degli alimenti e di valutare l'efficacia di eventuali interventi di miglioramento delle condizioni di conservazione. Tuttavia, è importante sottolineare che i modelli matematici rappresentano uno strumento ausiliario per la valutazione della shelf-life degli alimenti e che i risultati ottenuti devono essere sempre confermati da dati sperimentali. L'utilizzo di esempi di applicazioni ripresi dalla letteratura scientifica per trattare l'argomento dei modelli matematici nello studio di shelf-life degli alimenti è motivato dalla necessità di rendere l'argomento più accessibile e concreto, evidenziando l'utilizzo dei modelli matematici per simulare l'evoluzione dei prodotti nel tempo e valutare l'effetto di vari fattori sulla loro conservazione, l'uso di esempi consente inoltre di evitare il rischio di cadere in generalizzazioni troppo teoriche e astratte.

3.2 Modello per valutare la shelf life del succo di canna da zucchero , pronto da bere.

Lo scopo di uno studio condotto da R. Rajalakshmi, G. Sujatha et al. (2022)^[23] era creare un succo di canna da zucchero con aggiunta di succo di limone e amla evitando di doverlo trattare termicamente con pastorizzazione per evitare danni da calore. Sono state valutate infatti tre alternative: PEF campo elettrico pulsato, trattamento ultravioletto C (UV-C) e riscaldamento ohmico (OH). Per determinare la shelf-life del succo trattato con ciascuna di queste alternative, sono stati scelti gli indicatori di pH, solidi solubili totali (TSS), vitamina C, attività antiossidante e conteggio totale delle piastre (TPC) come variabili indipendenti (o

predittive o esplicative). Queste variabili sono utilizzate per formulare un'equazione di regressione multipla in cui il peso di ciascuna variabile contribuisce al risultato finale della shelf-life del succo per le tre alternative selezionate.

3.2.1 *Sviluppo della ricetta*

Il metodo D-optimal Mixture Design rappresenta un approccio statistico utilizzato per determinare la combinazione ottimale⁵ di ingredienti in una miscela o formulazione.

Normalmente sarebbe sconveniente testare le risposte sensoriali di tutte le possibili combinazioni di ingredienti per trovare la ricetta ottimale.

Questo approccio infatti sfrutta un algoritmo che calcola prima tutte le combinazioni di ingredienti tra degli intervalli di minimo e massimo impostati per i singoli ingredienti. Poi cerca di selezionare un insieme di combinazioni rappresentative tra tutte le possibili opzioni, evitando l'inclusione di combinazioni troppo simili per evitare informazioni ridondanti o superflue. L'algoritmo può combinare due ingredienti alla volta e/o tre e/o quattro. Il risultato dell'algoritmo sono una serie di ricette sperimentali con diverse combinazioni di ingredienti, da testare.

Queste ricette vengono quindi testate da un panel di giudici che ne valuteranno il colore, l'aroma, e il sapore. I risultati dei test vengono utilizzati per trovare la relazione matematica tra la risposta sensoriale e la quantità di ingredienti utilizzata in ogni ricetta sperimentale. L'equazione che descrive questa relazione può essere una funzione polinomiale di grado variabile o può utilizzare altre forme di modelli matematici, come modelli lineari, quadratici o cubici. Queste equazioni vengono elaborate per creare un grafico tridimensionale o polidimensionale (metodologia della superficie di risposta, RSM). I picchi di questa superficie rappresentano l'ottimizzazione degli ingredienti in funzione delle proprietà sensoriali. Usando l'RSM, è possibile ottenere l'ottimizzazione delle quantità di succo di canna da zucchero, amla e limone in relazione all'accettabilità generale, sapore, gusto e colore. Alla fine, è stato trovato il mix di ingredienti ottimale, 91.998 ml di succo di canna da zucchero, 4.720 ml di amla e 3.282 ml di limone. La relazione tra le variabili indipendenti e la risposta potrebbe essere rappresentata come nell'eq. (1)

$$y = f(\beta_1 x_1, \beta_2 x_2, \beta_3 x_3, \dots, \beta_n x_n) + \varepsilon \quad (1)$$

⁵ L'aggettivo "ottimale" si riferisce alla combinazione di ingredienti che meglio di tutte, permette di sviluppare il profilo sensoriale desiderabile del assaggiatore.

dove y rappresenta la risposta, f è la funzione incognita che dipende da, x_1, x_2, \dots, x_n indicano le variabili indipendenti, ε è l'errore casuale che rappresenta altre fonti di variabilità non spiegate dalla relazione matematica (dalla funzione, f). (Myers, Montgomery, et. al, 2009).^[20]

Una volta ottenuto il succo standardizzato, è stato sottoposto a trattamenti di processo innovativi, come l'elettroporazione pulsata (PEF)⁶, il trattamento con luce ultravioletta (UV-C) e l'irraggiamento ohmico (OH)⁷. Questi trattamenti sono stati scelti perché sono in grado di preservare la qualità del succo (evitano il danno termico), riducendo al contempo la carica microbica. I campioni di succo così trattati sono stati raccolti in contenitori di vetro sterili e conservati a 5 °C durante questo tempo di conservazione sono state condotte delle analisi per verificare quanto tempo ci mettevano per diventare inaccettabili e come cambiavano le proprietà del succo nel contempo i campioni di succo trattati sono stati confrontati con i campioni di controllo (pastorizzati). Un'analisi della varianza (ANOVA) a una via, è stata utilizzata per confrontare l'efficacia in ognuna delle nuove tecnologie rispetto al succo trattato termicamente.

3.2.2 Rapporto tra tempo di conservazione e proprietà fisico-chimiche.

Per modellare il rapporto tra la shelf-life (succo di canna da zucchero) e le sue proprietà fisico-chimiche, nutrizionali e microbiologiche, è stato utilizzato un modello di regressione lineare multipla. Sono stati considerati come parametri indipendenti il pH, i solidi solubili totali, la vitamina C, l'attività antiossidante e il conteggio totale delle piastre, mentre la shelf life (in giorni) è stata considerata come parametro dipendente. Quindi gli autori dello studio hanno ottenuto tre funzioni del tipo descritto sotto, ognuna dedicata al tipo di intervento tecnologico alternativo.

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \alpha + \mu \quad (2)$$

La variabile dipendente è Y , che rappresenta l'età del prodotto in giorni.

Le variabili indipendenti (o esplicative) sono X_1, X_2, X_3, X_4 e X_5 , che rappresentano rispettivamente il pH, i solidi solubili totali (TSS), la vitamina C, l'attività antiossidante e la conta totale delle piastre (TPC), β_i sono i coefficienti di regressione da stimare, che indicano

⁶ PEF (Pulsed Electric Field) per il trattamento alimentare è una tecnologia che applica impulsi di campo elettrico di breve durata (microsecondi) e alta intensità (kV/cm) agli alimenti attraverso elettrodi. Questi impulsi generano un'elevata tensione elettrica all'interno delle cellule batteriche o fungine, causando la formazione di pori nelle membrane cellulari e compromettendo la loro integrità. Ciò porta alla inattivazione dei microrganismi e all'estensione della durata di conservazione degli alimenti, riducendo così la necessità di trattamenti termici più intensi

⁷ Il riscaldamento ohmico è una tecnologia di riscaldamento che sfrutta il passaggio di corrente elettrica attraverso un materiale conduttivo per generare calore. In questo processo, un campo elettrico viene applicato direttamente al materiale alimentare, che funge da resistore. La resistenza del materiale produce calore attraverso l'effetto Joule, riscaldando uniformemente l'alimento. Il riscaldamento ohmico consente un controllo preciso della temperatura e un'efficace trasmissione di calore, consentendo una rapida e uniforme cottura o riscaldamento degli alimenti senza l'uso di fonti di calore esterne. Questa tecnologia può preservare la qualità sensoriale e nutrizionale degli alimenti, riducendo al contempo i tempi di lavorazione.

l'effetto delle variabili indipendenti sulla variabile dipendente, α è il coefficiente di intercetta che rappresenta il valore di Y quando tutte le variabili indipendenti sono pari a zero, infine μ rappresenta l'errore residuo, ovvero la differenza tra il valore effettivo di Y e quello stimato dal modello.

3.2.3 regressione lineare

La regressione è un metodo per analizzare la relazione tra due o più variabili. In particolare, la regressione lineare semplice (RLS) è un metodo che consente di formulare ipotesi riguardo le relazioni tra una variabile risposta (Y) e una variabile esplicativa (X). Utilizzando i dati raccolti tramite un'osservazione o un esperimento, il modello RLS consente di rappresentare in modo compatto i valori osservati, descrivendo così la relazione tra la variabile X (ad es. il livello di pH) e la variabile Y (ad es. il tempo di shelf-life del prodotto). In un modello RLS, i valori della variabile X sono riportati sull'asse delle ascisse e quelli della variabile Y sull'asse delle ordinate, a formare un grafico di dispersione (scatter-plot), (fig.3) da cui cercare di tracciare, con l'ausilio di una funzione lineare, una retta il cui andamento descriva nel miglior modo possibile la relazione tra le due variabili. Questo modello è adatto quando i dati si distribuiscono vicini a una linea retta.

La retta avrà la tipica funzione di una retta:

$$y = q + mx + (\epsilon) \quad (3)$$

Dove y rappresenta la shelf-life, x è la variabile indipendente, m il coefficiente angolare (che descrive come varia la shelf-life al variare di un'unità di X) e q è l'intercetta (ove X=0, non ha effetto sulla shelf-life) e epsilon descrive l'errore casuale, che si suppone essere costante e avere una media intorno allo zero. La retta di regressione viene ricavata usando il metodo dei quadrati minimi, riducendo al minimo le distanze tra i valori osservati e valori stimati (punti sulla retta), (figura 3) dopo averle elevate al quadrato.

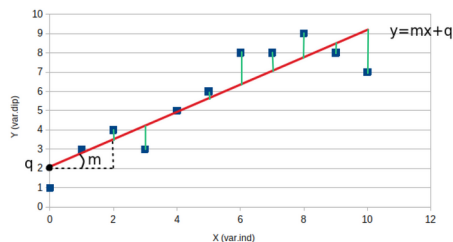


Figura 3: figura che mostra la distanza tra i valori osservati e i valori previsti

Il metodo dei minimi quadrati è un metodo utilizzato per permettere di calcolare i coefficienti q ed m della retta.

$$q = Ym - m * Xm \quad (4)$$

$$m = \frac{\sum (Xi - Xm) * (Yi - Ym)}{\sum (Xi - Xm)^2} \quad (5)$$

dove X_i è un valore di x , Y_i è un valore di y , X_m è il valore medio di x e Y_m è il valore medio di y . Nella formula il numeratore rappresenta la covarianza, (moltiplicata per il numero di osservazioni) tra le variabili X e Y , ovvero la misura di quanto le coppie di valori (X, Y) variano insieme rispetto alle loro medie. Il denominatore, invece, rappresenta la varianza (moltiplicata per il numero di osservazioni) di X , ovvero la misura di quanto i valori di X si discostano dalla loro media. Nella RLS il valore di X può rappresentare al massimo una variabile esplicativa per volta. Mentre la regressione lineare multipla (RLM) permette di prendere in considerazione più variabili indipendenti contemporaneamente e quindi stimare più coefficienti angolari. Nella RLM quindi, si valuta l'effetto complessivo di tutte le variabili esplicative che influenzano contemporaneamente la shelf-life. Così con un solo modello la variabile Y può essere prevista dall'interazione di più variabili X . (Anderson, David, et al. 2014).^[2]

3.2.4 Valutazione del modello

La regressione multipla viene utilizzata per analizzare la relazione tra due o più variabili. Questa regressione viene costruita sulla base di campioni casuali, che solitamente sono abbastanza rappresentativi della situazione reale, ma c'è sempre il rischio che non lo siano completamente (es. se sfortunatamente si selezionano casualmente solo campioni marginali, quelli meno frequenti e questi campioni vengono utilizzati per costruire una retta di regressione multipla, si rischia di ottenere una relazione tra le variabili che non è rappresentativa della situazione media o comune della popolazione di riferimento).

In particolare, quello che viene stimato nella regressione sono i coefficienti angolari β o m , che indicano appunto la relazione tra le variabili.

Se tutti i coefficienti angolari fossero uguali a 0, sarebbe palese che non ci sia alcuna relazione tra le variabili. Ma se almeno un coefficiente angolare fosse diverso da 0 allora sarebbe necessario capire se il coefficiente angolare è diverso da 0 per via di questi eventi fortuiti o se è frutto di una relazione significativa tra le variabili.

Per capire quanto ci possiamo fidare dei singoli coefficienti stimati, è necessario stabilire un livello di fiducia in anticipo, ad esempio del 95% (e il complementare valore di alpha 5%). Questo significa che si desidera che il valore ottenuto dal campione rappresenti con il 95% di probabilità la situazione reale della popolazione. Per verificare la correttezza dei coefficienti angolari stimati e delle deduzioni ricavate dai campioni, si calcolano le t statistiche per ogni coefficiente angolare:

$$t \text{ statistica} = \frac{\beta}{SE(\beta)} \quad (6)$$

dove:

β è il coefficiente angolare stimato dalla regressione;

$SE(\beta)$ è l'errore standard del coefficiente angolare stimato dalla regressione.

Il valore di t ottenuto si confronta con la t critica tabulata (ovvero il valore della t statistica delle tabelle di t). La t critica⁸ rappresenta il massimo valore di t che ci si aspetta di ottenere in condizioni di casualità. Se il valore di t calcolato dal coefficiente angolare è maggiore della t critica o minore della t critica, allora si può ritenere che il risultato non sia frutto del caso, ma che ci sia una relazione significativa tra la variabile considerata e y. In altre parole, la t critica rappresenta il valore soglia oltre il quale si può rifiutare l'ipotesi nulla di non significatività del coefficiente angolare. Se il valore di t ottenuto è maggiore della t critica o minore di -t critica, si può affermare che la probabilità di trovare un errore di non significatività è minore del 5% quindi il p-value risulta <0,05.

In sostanza ciò significa che il risultato probabilmente (al 95%) è dovuto ad una vera relazione tra le variabili e non al caso.

Se invece la t di Student delle tabelle viene moltiplicata per il sigma (deviazione standard) del campione diviso per la radice di n meno uno, il risultato fornisce metà dell'intervallo di fiducia, cioè la zona entro la quale si può essere sicuri, con la percentuale scelta, che ci sia la media vera. In altre parole, se abbiamo un intervallo di confidenza del 95% per il coefficiente angolare, possiamo dire con una probabilità del 95% che il vero valore del coefficiente angolare per la popolazione si trova in quell'intervallo.

All'aumentare del livello di fiducia, aumenta anche l'ampiezza dell'intervallo di fiducia. Ad esempio, con un livello di fiducia del 99%, l'intervallo di fiducia sarà più ampio rispetto a quello di un livello di fiducia del 95%. Tuttavia, presentare un intervallo di fiducia troppo

⁸ t critica = $t_{\left(\frac{\alpha}{2}, n-k-1\right)}$, dove k è il numero di variabili indipendenti.

ampio può compromettere la precisione delle deduzioni. Pertanto se i dati sono abbastanza incerti è meglio avere un livello di fiducia non altissimo ma presentare un intervallo di fiducia più piccolo. Nel caso dello studio citato i coefficienti angolari delle regressioni lineari multipli sono risultati altamente significativi, con un livello di fiducia del 95% o superiore.

Oltre alla significatività è utile anche un'altra valutazione che ci permetta di stabilire quanto la retta interpreta bene la relazione tra le due variabili solitamente si esegue quindi la valutazione della bontà di adattamento, per sapere se e quanto sia utile questa retta di regressione a rappresentare il fenomeno osservato. Tanto più la retta riduce l'errore di predizione, tanto più è il potere predittivo e quindi tanto migliore è la bontà di adattamento. A tale scopo è utile il coefficiente di correlazione di Pearson (r) è un indice utilizzato per misurare la forza e la direzione della relazione lineare tra due variabili. Questo coefficiente assume valori compresi tra -1 e +1 (fig.4). Quando r assume valore +1, le due variabili hanno una perfetta correlazione positiva, ovvero quando il valore di una variabile aumenta, anche il valore dell'altra variabile aumenta. Al contrario, quando r assume valore -1, le due variabili hanno una perfetta correlazione negativa, ovvero quando il valore di una variabile aumenta, il valore dell'altra variabile diminuisce. Quando r assume valore 0, le due variabili non hanno correlazione lineare. La formula del coefficiente di correlazione di Pearson è la seguente:

$$r = \frac{\sum((X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y}))}{\sqrt{[\sum(X_i - \bar{X})^2 \sum(Y_i - \bar{Y})^2]}} \quad (7)$$

dove X_i e Y_i rappresentano i valori osservati delle due variabili, \bar{X} e \bar{Y} rappresentano le loro medie.

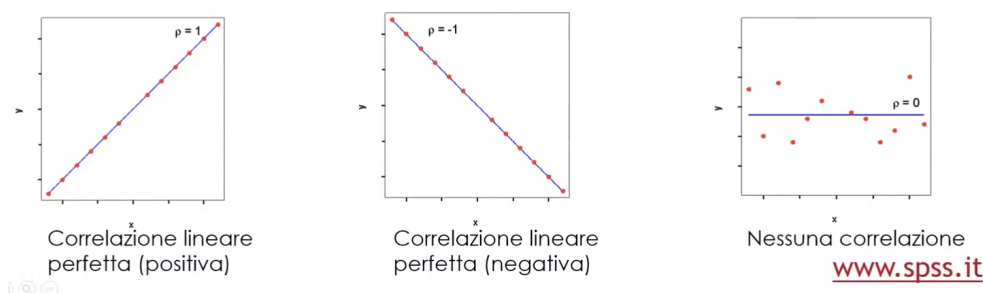


Figura 4: esempi di coefficienti di correlazione. Fonte: Webinar, 2020

Il coefficiente di correlazione di Pearson è spesso utilizzato in combinazione con l'indice di determinazione R^2 (figura 5) che è uguale al quadrato del coefficiente di Pearson (r). È utile per valutare la bontà dell'adattamento di una retta di regressione lineare (sia semplice che multipla). Questo indice ci dice quanto la variabile indipendente (X) che abbiamo scelto spiega la variabile dipendente (Y), ovvero quanto è forte la loro relazione. R^2 è un numero compreso tra 0 e 1: se è vicino a 1, significa che la retta di regressione è molto utile per spiegare la relazione tra le variabili, mentre se è vicino a 0 significa che la retta di regressione lineare non è molto utile. Ad esempio, se R^2 è 0,61 vuol dire che la variabile X spiega il 61% della variabilità della variabile Y, mentre il 39% è spiegato da altri fattori che non abbiamo considerato. In generale, più R^2 è alto, più la retta di regressione lineare è utile per spiegare la relazione tra le due variabili.

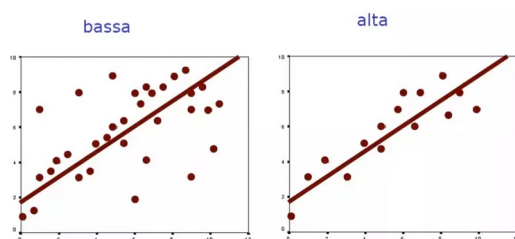


Figura 5: da sinistra verso destra prima un R^2 basso e poi a destra un R^2 alto. Fonte : Webinar www.spss.it, 2020

Come nella regressione lineare semplice, anche nella regressione lineare multipla si stima una intercetta e i coefficienti di regressione per ciascuna variabile indipendente e i relativi valori per valutarne l'efficacia predittiva. Tuttavia, in questo caso, il modello è più complesso, in quanto si tiene conto dell'effetto combinato di più variabili indipendenti sulla variabile dipendente.

In sintesi, la regressione lineare multipla rappresenta uno strumento prezioso per valutare le proprietà fisico-chimiche, nutrizionali e microbiologiche dei prodotti alimentari e valutare l'efficacia di trattamenti alternativi. I valori di R^2 e il p-value sono indici di valutazione essenziali per comprendere la relazione tra le variabili e la durata di conservazione del prodotto.

In questo studio, le variabili indipendenti sono risultate altamente correlate con la shelf-life, con R^2 corretto che varia dal 92,1% al 99,7%. Inoltre, le proprietà pH, TSS, vitamina C, attività antiossidante e TPC sono risultate statisticamente significative con l'età del prodotto, fornendo informazioni preziose per la previsione della shelf-life del prodotto. In sintesi, l'analisi di regressione lineare multipla ha mostrato che tutte le variabili testate hanno un

impatto significativo sulla durata del succo, e che il modello di previsione ottenuto è statisticamente significativo. Ciò significa che le proprietà fisico-chimiche del succo (come il pH, il contenuto di zuccheri, la quantità di vitamina C e antiossidanti, e il totale dei composti fenolici) possono essere utilizzate per prevedere quanto tempo il prodotto rimarrà in buono stato. Hayat, et.al, (2010).^[10]

3.3 Modello per valutare la perdita di freschezza del tè verde durante la conservazione (FLGT).

Uno studio recente condotto da Xiao, Liu, et al. (2022) ^[19], ha analizzato la perdita di freschezza del tè verde durante la conservazione, utilizzando una serie di metodi matematici di previsione della shelf-life come il metodo Q10 e la Weibull Hazard Analysis. Questi metodi hanno permesso di valutare la shelf-life del tè verde e prevedere il periodo di consumo adeguato durante la conservazione. Lo studio si è concentrato sulla perdita di freschezza del tè verde durante la conservazione, poiché la freschezza è una qualità importante per questo tipo di prodotto. Tuttavia, durante la conservazione, temperature elevate, luce, ossigeno e umidità possono ridurre la freschezza del tè verde. Per studiare la perdita di freschezza, è stato condotto un test di durata di conservazione accelerata (ASLT), che ha valutato la shelf-life del tè verde mediante valutazione sensoriale e test di accettabilità.

I risultati del test hanno mostrato che la freschezza del tè verde conservato a temperature di 20°C, 30°C e 40°C è diminuita significativamente rispettivamente dopo 67 giorni, 55 giorni e 45 giorni, utilizzando il metodo Q10. Inoltre, utilizzando il metodo Weibull Hazard Analysis (WHA), la freschezza del tè verde è stata determinata rispettivamente a 67 giorni, 57 giorni e 42 giorni. La correttezza dei risultati è stata confermata mediante analisi a 2 scelte alternative e analisi chimiche.

Inoltre, il metodo Q10 è stato utilizzato per predire la shelf-life del tè verde conservato a temperature di 4°C e -20°C, che sono state rispettivamente valutate in 93 giorni e 150 giorni. Questi risultati sono stati confermati mediante analisi a 2 alternative di scelta e analisi chimica.

In sintesi, lo studio ha dimostrato che è possibile prevedere il periodo di consumo adeguato di tè verde durante la conservazione utilizzando il metodo Q10 e il metodo Weibull Hazard Analysis. Questi metodi matematici consentono di valutare e controllare la qualità degli

alimenti e garantire la sicurezza dei consumatori. Il metodo Q10 si basa sulla relazione tra la temperatura e la velocità di reazione chimica, mentre il metodo Weibull Hazard Analysis si basa sulla probabilità di fallimento del prodotto nel tempo.

3.3.1 *Valutazione sensoriale*

La valutazione sensoriale cerca di rendere quanto più oggettive possibile, le percezioni sensoriali del prodotto. Viene utilizzato per analizzare le caratteristiche organolettiche di un prodotto alimentare percepibili dai nostri sensi, come il colore, l'odore, il sapore e la consistenza.

In questo caso, lo scopo è capire come cambia la qualità del tè verde conservato a diverse temperature nel tempo fino a diventare inaccettabile, quindi è un confronto con il tè fresco. Generalmente ci si aspetta che ad una temperatura più alta le reazioni di degradazione del prodotto avvengano più velocemente e quindi che si arrivi più velocemente alla inaccettabilità sensoriale rispetto ad una temperatura inferiore.

Per eseguire la valutazione sensoriale del tè, i panelisti descrivono le differenze sensoriali rispetto al tè di controllo fresco. Successivamente, questa descrizione "narrativa" deve essere tradotta in valori numerici. Si sceglie un intervallo con due estremi: l'estremo positivo (+4) indica che il senso in esame non è cambiato rispetto al tè fresco, mentre man mano che le differenze aumentano in negativo, il valore decresce fino a raggiungere -4, che rappresenta la totale inaccettabilità sensoriale.

Successivamente, si moltiplica per un "peso", in percentuale, ogni valore numerico in base alla sua importanza. Ad esempio, l'odore potrebbe essere considerato più importante del colore e quindi avrebbe un peso maggiore, ad esempio del 50% così che il restante 50% è da suddividere per gli altri sensi.

Infine, si sommano i punteggi ponderati per ottenere un punteggio sensoriale complessivo che riflette il grado di accettabilità del tè nel tempo. Tuttavia, nello studio citato il punteggio sensoriale complessivo dato dalla ponderazione si troverà sempre nell'intervallo da -4 a +4.

Si stabilisce una soglia di accettabilità sensoriale complessiva nell'intervallo (esempio la soglia è il primo valore negativo), al di sotto della quale la qualità del prodotto è considerata inaccettabile. Questo metodo è chiamato "metodo della somma ponderata" e un esempio dei risultati è riportato nella tabella 1.

		giorni	aspetto delle foglie di tè	il colore dell'infuso	l'aroma dell'infuso	gusto dell'infuso	punteggio somma ponderata
	Peso		0,3	0,2	0,3	0,2	1
30°C		0	4	4	4	4	4
		5	2	2,8	2,8	2,3	2,46
		10	2,71	2,2	2,57	2,68	2,56
		15	2,8	2	3	2	2,54
		20	2,4	2,5	2,3	2,6	2,43
		25	1,5	2	0,16	2,5	1,398
		30	1	0	1	1	0,8
		35	1	1	1	1	1
		40	0,8	-0,3	-1	-2	-0,52
		45	-1,3	1	0	1	0,01
		50	-0,5	1	0	2	0,45
		55	-1,3	-1,6	-1	-0,67	-1,144
		60	-0,71	-1	-1,67	0,14	-0,886
		65	-1	-0,6	-2	0	-1,02
	70	-1,6	-2,3	-2,2	-0,2	-1,64	

Tabella 1: Esempio a 30° per 70 giorni di valutazione sensoriale mediante metodo della somma ponderata.

In questo modo, è possibile comprendere come cambia la qualità del tè conservato a diverse temperature nel tempo e avere un punto di riferimento di confronto con altri modelli. Triantaphyllou, Evangelos (2000) .^[29]

3.3.2 Q10

È noto che l'aumento della temperatura può accelerare il processo di deterioramento sensoriale dei prodotti alimentari (Institute of Food Science and Technology (U.K.), 1993 ^[12]. Questo accade perché i processi chimici responsabili del deterioramento, come l'ossidazione dei grassi o la degradazione delle proteine, si verificano più rapidamente a temperature più elevate. Se assumiamo che il cambiamento sensoriale sia esclusivamente di natura chimica e dipenda dalla temperatura, possiamo fare riferimento alla legge di Arrhenius per descrivere il fenomeno.

La legge di Arrhenius stabilisce che la costante di velocità di un processo chimico è proporzionale alla temperatura secondo l'equazione:

$$K = K_a * \exp(-Ea/RT) \quad (8)$$

dove K tasso costante di un cambiamento (chimico o sensoriale), K_a è una costante dell'equazione di Arrhenius, E_a è l'energia di attivazione, R è la costante dei gas e T è la temperatura assoluta (in kelvin).

Nel contesto del deterioramento organolettico dei prodotti alimentari, possiamo considerare i punteggi ottenuti dalle analisi sensoriali come una misura del cambiamento dei processi chimici che influiscono sulle proprietà organolettiche del prodotto. Utilizzando

questi punteggi, possiamo calcolare la costante di velocità di cambiamento sensoriale (K), che rappresenta la velocità di cambiamento delle proprietà organolettiche nel tempo.

Il Q10, invece, non è altro che il rapporto tra la costante di velocità di cambiamento a una temperatura $t+10^\circ$ (quindi $K(t+10^\circ)$) e la costante di velocità a una temperatura t quindi ($K(t)$). Questo rapporto ci fornisce un'indicazione di quanto varia la velocità di cambiamento sensoriale, quando c'è una variazione di 10°C .

Però poiché la shelf-life dei prodotti alimentari è inversamente proporzionale alla velocità di cambiamento, allora:

$$Q_{10} = \frac{k_{(T+10)}}{k_T} = \frac{\text{Shelflife alla temperatura } (T)}{\text{Shelflife alla temperatura } (T+10)} \quad (9)$$

Si può quindi utilizzare il valore di Q10 per stimare l'effetto di un aumento di temperatura sulla shelf-life del prodotto. Ad esempio, se calcoliamo un Q10 di 2, significa che la velocità di cambiamento sensoriale si raddoppia ogni volta che la temperatura aumenta di 10 gradi e viceversa. Possiamo quindi utilizzare questa informazione per stimare la shelf-life del prodotto a diverse temperature senza la necessità di condurre ulteriori test sensoriali.

$$(Q_{10})^{(\Delta/10)} = \frac{\theta_{(s(T_1))}}{\theta_{(s(T_2))}} \quad (10)$$

$\theta_{(s(T_1))}$ = shelf-life a temperature $T_1^\circ\text{C}$

$\theta_{(s(T_2))}$ = shelf-life a temperature $T_2^\circ\text{C}$

Δ = differenza di temperatura.

Utilizzando il modello di Arrhenius è possibile dimostrare che:

$$\ln Q_{10} \approx \frac{10 E_a}{RT^2} \quad (11)$$

dove:

E_a = energia di attivazione di una reazione specifica (J mol^{-1})

R = costante dei gas ideali ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T = temperatura assoluta (K)

(Van Boekel, Martinus, 2009).^[30]

Conoscendo il limite di tempo (shelf-life) del prodotto a una certa temperatura, è possibile calcolare il limite di tempo a cui il prodotto rimane accettabile a una diversa temperatura.

È stato osservato che l'FLGT ottenuto con il metodo Q10 concorda bene con quello della valutazione sensoriale. In conclusione, considerando la relazione tra temperatura, costante di velocità di deterioramento e Q10, possiamo valutare l'effetto della temperatura sulla shelf-

life dei prodotti alimentari, supponendo che il cambiamento sensoriale sia di natura chimica e dipenda dalla temperatura.

3.3.3 *Analisi di sopravvivenza come metodo di valutazione alternativo.*

Un metodo alternativo usato in questo caso e in molti altri, per studiare la shelf-life di un alimento è quello che si basa, su una vecchia teoria chiamata "teoria dell'affidabilità". In pratica, questa teoria è nata per aiutare le compagnie assicurative del 19° secolo a calcolare quanto dovevano addebitare ai loro clienti a seconda della probabilità che un evento accadesse. Già si parlava in termini di "tasso di guasto" e "tasso di rischio" oggi ancora in uso. L'idea alla base è che la rottura di un mezzo meccanico è simile alla vita o alla morte di un organismo biologico, e lo scopo è prevedere la probabilità di un evento per un dato individuo o popolazione. In questo caso, l'evento analogo alla morte di un sistema biologico è la fine della shelf-life del prodotto alimentare, e questo evento viene studiato utilizzando l'analisi di sopravvivenza. L'analisi di sopravvivenza è una tecnica statistica utilizzata appunto per studiare la mortalità negli organismi biologici e i guasti nei sistemi meccanici. Genericamente l'analisi di sopravvivenza comporta la modellazione del tempo con eventid data.

L'alimento è però un sistema complesso composto da diverse componenti, ognuna delle quali può deteriorarsi a ritmi differenti la combinazione degli effetti di queste componenti determina la fine della shelf-life. Considerare più componenti significa avere grande variabilità dell'evento di fallimento/tempo di scadenza dell'alimento ed esiste una rappresentazione grafica che deriva dalla teoria della affidabilità dei sistemi, chiamata “curva a vasca da bagno”, (fig.6) che serve a rappresentare graficamente questa variabilità del tasso di fallimento/scadenza del prodotto in cui si distinguono tre fasi.

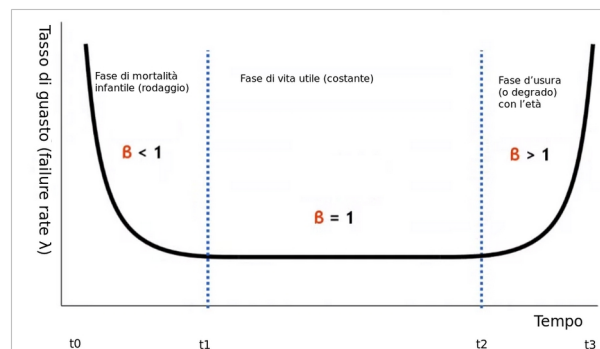


Figura 6: Curva a vasca da bagno. Fonte: immagine modificata da Fragassa, Cristiano. (2007). QUALITÀ E CERTIFICAZIONE. ¹⁶⁷

Durante il periodo tra t_0 e t_1 possono verificarsi i primi fallimenti precoci a causa di un guasto nel processo stesso, di un imballaggio difettoso, di un abuso iniziale estremo del prodotto e di molte altre sollecitazioni ambientali a cui il prodotto è sottoposto.

Il fallimento precoce non deve essere considerato come un vero e proprio fallimento relativo alla durata di conservazione del prodotto, a meno che non rappresenti una condizione normale. Da t_1 a t_2 si può prevedere che, a meno di forti oscillazioni di temperatura, non si verifichino guasti. Questo intervallo rappresenta il vero periodo di stabilità del prodotto. Il tasso di guasto è ridotto e quasi costante durante questo periodo. Il tasso di rischio o di guasto aumenta dal tempo t_2 al punto finale t_3 a causa dei veri cambiamenti deteriorativi che si verificano all'interno del prodotto. (Fu, B., Labuza, 1997)^[7].

3.3.3.1 Aspetti generali.

Nell'analisi di sopravvivenza, in questo caso sarebbe più giusto parlare di analisi di scadenza, si indica con x il tempo necessario perché l'alimento fallisca/scada (il fallimento/scadenza è considerato l'evento). Questo tempo può variare da confezione a confezione come già detto. Quindi ci si basa sulla probabilità dell'evento. Questa analisi di sopravvivenza si avvale di alcune funzioni matematiche utili allo scopo. La prima è la funzione di densità di probabilità $f(x)$ che nel caso specifico dello studio preso in esame indicherebbe la probabilità che il tè si degradi in un esatto momento quindi, ad esempio, la probabilità che il tè si degradi esattamente il secondo giorno. La funzione cumulativa di probabilità $F(x)$, che si deriva integrando $f(x)$ da $-\infty$ a x , cioè l'area sotto la curva di $f(x)$, indicherebbe la probabilità che il tè si degradi entro un certo tempo. Quindi, ad esempio, la probabilità che il tè si degradi entro il terzo giorno. La funzione di sopravvivenza $S(x)$, è definita come il complemento della funzione cumulativa di probabilità $F(x)$, ovvero :

$$S(x) = 1 - \int_{-\infty}^x f(t) dt = 1 - F(x) \quad (12)$$

indicherebbe la probabilità che il tè sopravviva oltre un certo periodo di tempo, ad esempio la probabilità che il tè sopravviva oltre il terzo giorno.

La funzione di pericolo $h(x) = f(x) / S(x)$ è un altro strumento utile che indicherebbe la probabilità che il tè si degradi esattamente in un dato momento, una volta che ha già resistito fino a quel momento. Ad esempio, la probabilità che il tè si degradi esattamente a 31 giorni,

dato che è già sopravvissuto per almeno 30 giorni, se $h(30) = 0,193$ c'è una probabilità del 19,3% che il tè si degradi esattamente a 30 giorni, dato che è già sopravvissuto per almeno 30 giorni.

$H(x)$ è la funzione di rischio cumulativo :

$$H(x) = \int_0^x h(t) dt \quad (13)$$

il prodotto accumula una quantità di rischio di fallimento o deterioramento fino a quel momento che si traduce nell'integrale di $h(x)$ compreso tra 0 e x . Fornisce la probabilità cumulativa che un prodotto fallisca. La funzione cumulativa consente di valutare l'effetto cumulativo di tutto il rischio che un prodotto alimentare può incontrare durante la conservazione in quell'intervallo di tempo.

Infine, il percentile è il valore di x al quale la funzione di distribuzione cumulativa $F(x)$ raggiunge una determinata probabilità.

Inoltre i modelli di sopravvivenza, sono costruiti scegliendo una specifica distribuzione di probabilità per la funzione di sopravvivenza nel caso preso in esame è stata scelta la distribuzione di Weibull.

In pratica, conoscere queste funzioni matematiche aiuta a valutare quanto dura il tè e a stabilire la sua durata di conservazione.

3.3.3.2 Metodo

Nella pratica l'autore dello studio è partito dalla valutazione sensoriale, per sapere a quanti giorni il campione mantenuto ad una certa temperatura risulta inaccettabile. Il campione di tè mantenuto a 30°C è stato giudicato inaccettabile da alcuni panelisti tra i 40 e i 55 giorni. Si raccolgono in una tabella tutti questi tempi di inaccettabilità/fallimento del prodotto poi vengono disposti in ordine cronologico e ad ogni fallimento, si associa un punteggio rank (k). I punteggi (Rank) vengono assegnati in ordine cronologico inverso, cioè: -il primo risultato inaccettabile (che sarà quindi il primo in tabella) riceve il punteggio più alto

-quello che è risultato inaccettabile per ultimo riceve il rango più basso = 1.

Si calcola quindi direttamente la funzione di rischio $h(x)$ come $100/\text{rango}$ perché in questo caso il rango è una sorta di misura del tempo. Poi sommando gli $h(x)$ si ottiene il rischio cumulato $H(x)$.

$H(x)$ si fa corrispondere alla funzione di rischio cumulato, relativo alla distribuzione di Weibull. Viene scelta questa particolare distribuzione perché descrive bene i fallimenti dei sistemi complessi come sono gli alimenti. $H(x)$ nella distribuzione di Weibull $H(x) = (x/\alpha)^\beta$. Questa espressione può essere linearizzata prendendo il logaritmo da entrambi i lati, e riorganizzata come segue:

$$\ln x = \ln \alpha + (1/\beta) \ln H(x) \quad (14)$$

Quindi questo è stato fatto anche con i valori ricavati dal test sensoriale, sono stati calcolati i logaritmi dei tempi di fallimento/guasto (x) e i logaritmi di $H(x)$ che sono stati poi utilizzati per costruire una regressione lineare di equazione analoga alla equazione 14, permettendo la stima di α e β secondo il metodo "Gacula". Labuza, Theodore, et al. (1988) ^[16]

(In particolare, il parametro β è quello che permette di spostarsi lungo la curva a vasca da bagno quindi di capire se si parla di fallimenti precoci o normali o in fase di senescenza).

Tuttavia, il parametro β deve essere compreso tra 2 e 4 per avere stime accurate della durata di conservazione.

Per affrontare queste difficoltà, sono stati proposti diversi metodi di correzione, come il metodo "Labuza", che consiste nell'ignorare i dati con un hazard cumulativo superiore a 100, o il metodo "Sloan", che consiste nel ricalcolare l'hazard cumulativo dopo aver rimosso i dati che superano il valore di 100. Quindi la retta viene costruita utilizzando questi valori corretti di $H(x)$. Labuza, Theodore, et al. (1988) ^[16]

Per interpretare i risultati e stimare la fine della shelf-life, si deve scegliere un livello di probabilità (P) come la percentuale di pannellisti che rifiutano il prodotto, ovvero quale rischio di inaccettabilità si è disposti ad accettare. Ovviamente minore è il rischio di inaccettabilità che si accetta minore sarà la shelf-life. Si può ricavare una relazione tra il tasso di guasto cumulato e la probabilità (P) di inaccettabilità del prodotto. La formula,

$$P = 100 * (1 - \exp - \Sigma(H/100)) \quad (15)$$

sviluppata da Bin Fu e Theodore P. utilizzando la distribuzione Weibull, permette di calcolare la probabilità (P) di inaccettabilità del prodotto corrispondente a un determinato tasso di guasto cumulato. Poiché in questo caso la scelta di P è di tipo maggioritario, si sceglie una P del 50%, vogliamo sapere a quale tasso di rischio cumulato corrisponde tale probabilità. La formula fa corrispondere il 50% di probabilità di inaccettabilità al 69,3% di rischio cumulato. Utilizzando la regressione lineare già citata, possiamo calcolare in quanti giorni il prodotto raggiunge il 69,3 % di rischio cumulato $H(x)$. Quei giorni corrispondono alla shelf-life stimata, metodo sviluppato da Labuza, Theodore, et al. (1988) ^[16]. Le

valutazioni dei FLGT da parte della WHA sono quasi del tutto coerenti con i risultati della valutazione sensoriale e del metodo Q10. In breve, danno gli stessi risultati in termini di shelf-life stimata.

3.3.3.3 Conclusioni e conferme

Sempre nello stesso studio, sono state analizzate alcune sostanze chimiche tra cui polifenoli e catechine presenti nei campioni di tè a ogni fase della conservazione (indicatori di freschezza). Queste sostanze possono cambiare nel tempo durante la conservazione del tè. Alcune diminuiscono, altre aumentano e poi diminuiscono.

Per capire meglio i cambiamenti chimici, i ricercatori hanno usato un metodo chiamato "analisi gerarchica dei cluster". Questo metodo ha permesso loro di raggruppare i campioni di tè in due categorie principali: tè fresco e tè andato a male. Sono stati considerati campioni di tè andato a male, quelli che avevano mostrato una variazione maggiore delle sostanze chimiche rispetto ai campioni di tè fresco.

Un fatto interessante è che quattro campioni di tè conservati a diverse temperature per un certo periodo di tempo (20°C per 67 giorni, 20°C per 65 giorni, 30°C per 55 giorni e 40°C per 45 giorni) sono stati raggruppati nella categoria del tè andato a male. Questi risultati sono coerenti con i risultati stimati con i metodi Q10 e WHA. Infine, è stato previsto che il tè verde conservato a 4°C avrebbe mantenuto la freschezza per 93 giorni secondo il Q10, e ciò è stato confermato da un test di accettabilità su campioni di tè conservati a 4°C.

3.4 Utilizzo di un modello predittivo per migliorare la conservazione dei prodotti da forno: il caso di *Aspergillus candidus*.

Durante la conservazione della maggior parte dei prodotti alimentari si vuole evitare lo sviluppo di muffe perché renderebbe il prodotto non più adatto al consumo. Tal volta però se il microrganismo, trova le condizioni sufficientemente adatte allo sviluppo, si riproduce.

Un metodo per evitare questo problema è quindi quello di conoscere queste condizioni per cercare di impedirle durante tutta la vita di scaffale del prodotto. Ogni ceppo (o sottospecie) ha condizioni ottimali (di massimo sviluppo) e condizioni che invece gli impediscono di crescere.

A tal proposito uno studio condotto da Huchet V., Pavan S et al. (2013) ^[11], ha sviluppato un approccio di modellazione per prevedere l'effetto dell'attività dell'acqua (a_w) e della

temperatura sul tempo di apparizione di *Aspergillus*, quindi sulla sua crescita nel prodotto alimentare durante la conservazione.

In particolare si è posta l'attenzione sull'effetto di fluttuazioni di a_w nelle previsioni di sviluppo, poiché i campioni testati, quando messi a contatto con le diverse umidità relativa, nei primi 14 giorni subiscono una redistribuzione dell'umidità dall'esterno all'interno del prodotto, al cuore dell'alimento.

È stato studiato un ceppo di una muffa (*Aspergillus*) in particolare, e non un altro ceppo perché basandosi sulle informazioni di un precedente studio era stato notato che quel ceppo rappresenta uno dei più comuni contaminanti nei prodotti da forno del tipo in esame.

Il processo di studio della crescita di *Aspergillus candidus* prevede diverse fasi.

In primo luogo, il ceppo batterico viene isolato dal campione di alimento e viene preparato un inoculo contenente un preciso numero di spore per millilitro di soluzione. Successivamente l'inoculo viene piastrato su piastre Petri ⁹ a diverse temperature e attività dell'acqua (a_w) il microorganismo si moltiplicherà nel tempo aumentando il diametro delle colonie, e sono proprio le misure dei diametri nel tempo di incubazione ad essere determinanti per calcolare i valori cardinali di crescita (T_{min} , T_{opt} , T_{max} , a_w min e a_w opt) ¹⁰.

Il ceppo batterico viene è stato inoculato anche in tortine, ovvero in substrato alimentare, con diversi livelli di temperatura e attività dell'acqua (a_w) per misurare il tempo di crescita del micelio fino alla sua visibilità (TV) .

I dati raccolti dalle piastre Petri (diametri e tempi) vengono utilizzati per creare il modello primario di crescita di *Aspergillus candidus*, che descrive la crescita batterica a diversi livelli di temperatura e attività dell'acqua (a_w), permettendo così di ricavare il tasso di crescita

⁹

Piastra di Petri: Una piastra di Petri è un dispositivo in vetro o plastica a forma di piatto poco profondo con un coperchio. Utilizzata in microbiologia, la piastra di Petri contiene un terreno di coltura per la crescita dei microrganismi. Dopo l'inoculazione del campione microbiologico, la piastra viene chiusa con il coperchio per creare un ambiente sterile. Durante l'incubazione, i microrganismi si sviluppano come colonie sulla superficie del terreno di coltura, consentendo la loro visualizzazione e il conteggio. La piastra di Petri è un'importante strumento per studiare la presenza e l'abbondanza dei microrganismi in un campione microbiologico.

¹⁰ T_{min} : La temperatura minima a cui un microrganismo può iniziare a crescere.

T_{opt} : La temperatura ottimale in cui un microrganismo cresce più velocemente e in modo ottimale.

T_{max} : La temperatura massima sopportata da un microrganismo prima che la crescita sia inibita.

a_w min: L'attività dell'acqua minima richiesta per la crescita dei microrganismi.

a_w opt: L'attività dell'acqua ottimale in cui i microrganismi crescono più rapidamente e in modo ottimale.

massimo (μ_{max}). Questi dati vengono poi utilizzati per stimare con maggiore precisione i valori cardinali di crescita attraverso il modello secondario.

Infine, i dati raccolti dalle tortine vengono utilizzati per stimare il tempo di visibilità (TV) ottimale per la crescita del ceppo batterico.

3.4.1 *Modello primario e valutazione dell'effetto delle temperature e attività dell'acqua.*

Nell'articolo oggetto di studio, gli effetti della temperatura e dell'attività dell'acqua sulla crescita microbica sono stati valutati tramite la misurazione del diametro della colonia su piastre durante l'incubazione. A ogni tempo (t) corrisponde un diametro specifico (in μm) della colonia. Per valutare l'effetto della temperatura, si sono mantenuti costanti e ottimali i valori dell'attività dell'acqua, mentre per valutare l'effetto dell'attività dell'acqua si sono mantenuti costanti e ottimali i valori della temperatura.

Durante l'incubazione su piastre Petri, si ottengono una serie di dati che riguardano l'evoluzione nel tempo del diametro delle colonie microbiche. Questi dati possono essere rappresentati graficamente in un diagramma a coordinate cartesiane, dove l'asse delle ordinate (y) indica il diametro delle colonie, mentre l'asse delle ascisse (x) rappresenta il tempo, generalmente si ottiene una nuvola di punti che ricorda una curva sigmoide. Utilizzando questi dati, è possibile costruire un modello matematico di crescita microbica, noto come modello primario di crescita, che consente di rappresentare l'evoluzione della crescita dei microrganismi nel tempo. Questo modello matematico permette di calcolare il coefficiente angolare della curva di crescita, che rappresenta la velocità di crescita massima (μ_{max}), e il tempo di latenza (λ), che indica il tempo necessario per il batterio per adattarsi al substrato prima di poter crescere a velocità massima.

3.4.2 *Dalla teoria esponenziale al modello trifasico.*

Il modello primario di crescita microbica si basa sulla teoria della crescita esponenziale. Esso si fonda sull'assunzione che una cellula ha un tempo medio di generazione (TM) costante. Questo significa che entro ogni periodo di durata pari a TM, il numero di cellule dovrebbe raddoppiare. La popolazione finale (N_t) al tempo t può quindi essere ottenuta semplicemente utilizzando la seguente relazione:

$$N_t = N_0 * 2^{N_{gen}} \quad (16)$$

Dove:

- N_0 è la popolazione iniziale, la prima cellula di partenza che rappresenta la popolazione all'istante iniziale $t = 0$.

- $2^{N_{gen}}$ è il tasso di crescita della popolazione.

(Il numero 2 indica che ogni generazione produce 2 volte il numero di individui della generazione precedente, e N_{gen} è il numero di generazioni che si sono susseguite dall'istante iniziale $t = 0$).

Questo è però una semplificazione dove si descrive che la crescita parte immediatamente con un modello esponenziale dove immediatamente da una cellula se ne generano due, poi da ognuna delle due nuove cellule se ne generano a loro volta altre due (crescita geometrica) e così via.

In realtà il microrganismo che approda su un nuovo substrato inizialmente deve adattarsi all'ambiente; quindi, trascorre un po' di tempo dove non si divide, perché l'energia è sfruttata per produrre tutto il corredo enzimatico necessario per trasformare le molecole che trova nell'ambiente (fase lag, di adattamento). Ci sarà poi un'accelerazione seguita dalla crescita esponenziale (log) una decelerazione una fase stazionaria e una fase di declino (fig.7).

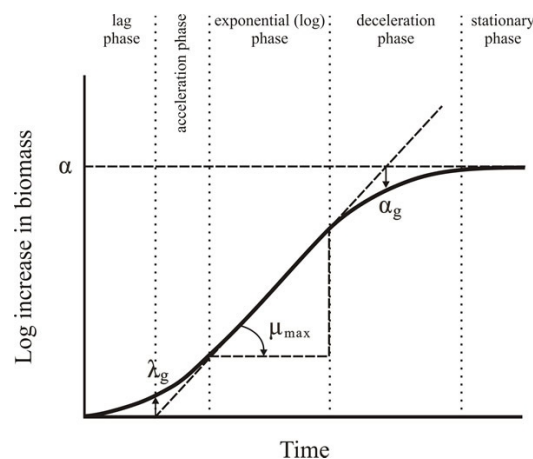


Figura 7: Fonte : Moore, D., Robson, et. Al (2011).^[21]

Un modello graficamente intuitivo utile a rappresentare non solo la fase di crescita esponenziale, ma bensì le tre fasi di crescita ossia Lag, Log e fase stazionaria; è il modello trilineare (o trifasico) di Buchanan et al (1997)^[24]. Si basa su questi presupposti:

- Le cellule richiedono un adattamento iniziale (fase lag), durante il quale la crescita è nulla;
- una volta superato il tempo lag, la crescita inizia immediatamente al suo tasso massimo (μ_{max} , mm/h).

c. ad un certo punto, questa crescita cessa immediatamente di aumentare ($\mu = 0$); raggiungendo N_{max} al relativo tempo t_{MAX} . Graficamente si può interpretare in questo modo:

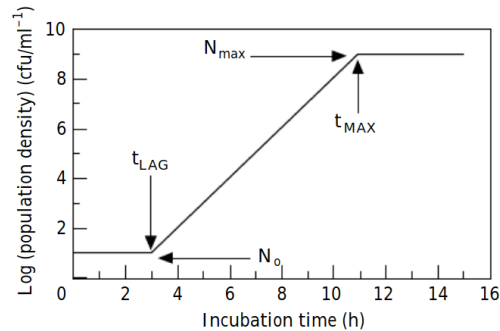


Figura 8: Immagine che rappresenta le tre fasi. Fonte: <https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0125>. [24]

si nota in figura 8 che fintato che il tempo di adattamento t_{lag} non è trascorso, il numero di cellule non raddoppia.

Il segmento della linea di crescita rappresentata in figura 9, relativa al tempo lag graficamente può essere diviso anche in due parti:

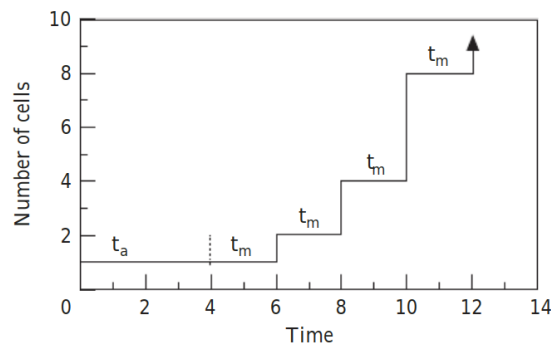


Figura 9: $tLAG$ definito come $Ta+Tm$. Ta = periodo in cui il microrganismo si adatta al nuovo substrato. Tm ,periodo richiesto dopo l'adattamento durante il quale il m.o. si prepara per la prima divisione. Fonte: Fonte: <https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0125>. [24]

Si assume che la fase lag sia la somma di un periodo di adattamento iniziale (t_a) più il tempo necessario alle cellule per acquisire l'energia metabolica per la prima divisione cellulare (t_m); le successive generazioni si susseguiranno a intervalli t_m .

La curva di crescita del microrganismo può essere divisa quindi in tre segmenti e rappresentata nelle varie fasi in questo modo:

- 1) Fase lag:

$$N_t = N_0 \text{ se } t \leq t_{lag}^{11} \quad (17)$$

2) Fase Esponenziale:

$$N_t = N_0 + \mu_{max} (t - tLAG) \rightarrow tlag < t < tmax.^{12} \quad (18)$$

3) Fase stazionaria:

$$N_t = N_{MAX} \text{ se } t \geq t_{MAX} \quad (19)$$

Un modo alternativo per misurare la crescita del microrganismo è quella di utilizzare la misura del diametro della colonia invece del numero di cellule o della biomassa. Sostituendo N (numero di cellule) con D ossia i diametri delle colonie per quanto riguarda le prime due fasi si ottiene:

$$D(t) = \begin{cases} D_0 \Rightarrow t \leq \lambda \\ D_0 + \mu_{max} * (t - \lambda) \Rightarrow t > \lambda \end{cases} \quad (20)$$

dove λ è il tempo lag, D_0 è il diametro dell'inoculo iniziale e $D(t)$ = diametro della colonia al tempo t.

Il modello trilineare permette quindi di calcolare μ_{max} (mm/h), che è uguale alla pendenza della retta del segmento relativo alla crescita esponenziale e λ (tempo lag). Si ottengono quindi i valori di μ_{max} e i tempi lag relativi alle varie condizioni di temperatura e attività dell'acqua. (Gardini, Fausto, et.al , 2013)^[8]

3.4.3 *Evoluzione concettuale*

Negli ultimi decenni, gli scienziati hanno cercato di approfondire la comprensione del processo di crescita e diffusione dei microrganismi. Inizialmente, il modello di Arrhenius fu utilizzato per spiegare che la crescita batterica aumenta in modo esponenziale all'aumentare della temperatura. Tuttavia, ricercatori successivi come Ratkowsky, hanno notato che la crescita batterica non può continuare all'infinito all'aumentare della temperatura, ma esiste invece un range di temperature ottimale in cui la crescita è più rapida. Successivamente, il modello di Rosso ^[26] ha ampliato la comprensione della crescita microbica introducendo il

¹¹ N_0 rappresenta la popolazione batterica iniziale, mentre N_t indica la popolazione batterica al tempo t durante la crescita microbica.

¹² μ_{max} , abbreviazione di "massima velocità di crescita" (in inglese, maximum growth rate), è un termine utilizzato nella microbiologia per indicare la massima velocità alla quale un microrganismo può crescere in determinate condizioni di coltura. Rappresenta la massima capacità di replicazione di un microrganismo in un ambiente ideale, in cui tutti i fattori necessari per la crescita sono ottimali, come temperatura, pH, disponibilità di nutrienti e condizioni ambientali favorevoli.

concetto di temperature cardine e il parametro CMn che cos'è. Questo ha permesso di valutare in modo più accurato e quantitativo l'effetto della temperatura sulla crescita batterica. E ancora il concetto di gamma ha ulteriormente ampliato il modello cardinale, permettendo di valutare gli effetti combinati di più fattori ambientali sulla crescita batterica. (Gardini, Fausto, et.al , 2013)^[8]

3.4.4 *Modello secondario.*

Si può immaginare il modello primario come una proposizione che dice "l'area di un quadrato è proporzionale al lato del quadrato". In questo caso, se si conosce la relazione tra l'area e il lato, è possibile trovare la lunghezza del lato che massimizza l'area. Lo stesso concetto si applica al modello secondario: se si conosce la relazione tra u_{max} e temperatura/attività dell'acqua, si possono trovare i valori di temperatura e attività dell'acqua che massimizzano l' u_{max} . I valori di μ_{max} ricavati dal modello primario vengono utilizzati nel modello secondario, chiamato Modello cardinale con inflessione (CMI).

Il modello di Rosso ^[27] è derivato da un modello pubblicato in precedenza (Lobry et al., 1991)^[17]:

$$u_{max} = u_{opt} * \left(1 - \frac{(t - t_{opt})^2}{(t - t_{opt})^2 + t(t_{max} + t_{min} - t) - t_{max} \cdot t_{min}} \right) \quad (21)$$

Questa formulazione deriva dalla considerazione che l'efficacia dell'enzima (velocità di crescita) aumenta con la temperatura fino a un valore ottimale e poi diminuisce rapidamente quando la temperatura supera il valore ottimale. Questo comportamento può essere modellato da una funzione a campana come quella della Gaussiana, per rappresentare la diminuzione dell'efficacia dell'enzima al di fuori del valore ottimale.

Secondo il modello di Rosso et al. (1993) e Rosso e Robinson (2001)^[26]:

$$u_{max} = u_{opt} * CM_n(x) \quad (22)$$

La velocità di crescita massima corrisponde alla velocità di crescita ottimale, quando tutti i fattori ambientali sono nelle loro condizioni ottimali per la crescita (u_{opt}).

Il valore u_{opt} è modificato dal valore del CM_n che può essere relativo alla sola temperatura o attività dell'acqua (o un altro fattore ambientale x).

Il $CM_n(x)$ è un valore compreso tra 0 e 1, che descrive l'effetto relativo del fattore ambientale (x) sulla crescita microbica. Questa formula penalizza i valori di x che si discostano dal valore ottimale, con una penalizzazione più grande per i valori che si discostano di più.

Il CM_n per il fattore x (che può essere Temperatura, pH o attività dell'acqua) è calcolato come segue:

$$CM_n(X) = \frac{[(X - X_{max}) * (X - X_{min})^n]}{[(X_{opt} - X_{min}) * (X_{opt} - X_{min}) * (X - X_{opt}) - (X_{opt} - X_{max}) * (X_{opt} + X_{min} - 2X)]} \quad (23)$$

In generale, per la temperatura, l'attività dell'acqua e il pH, il valore del parametro di forma nel modello rosso è $n=2$.

Quindi per esempio per la temperatura diventa:

$$CM_n(T) = \frac{(T - T_{max}) * (T - T_{min})^2}{(T_{opt} - T_{min}) * [(T_{opt} - T_{min}) * (T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max}) * (T_{opt} + T_{min} - 2T)]} \quad (24)$$

che descrive il calcolo del termine discreto CM_n per la temperatura. Se la temperatura di T (temperatura attuale) è uguale alla temperatura ottimale, il valore di $CM_n(T)$ sarà pari a 1, indicando che non c'è nessun effetto inibitorio sulla velocità di crescita microbica. Al contrario, se la temperatura di T (temperatura attuale) è al di fuori del range di temperature per la crescita, ovvero quando T è minore di T_{min} o maggiore di T_{max} il valore di $CM_n(T)$ sarà 0, indicando un effetto inibitorio sulla velocità di crescita microbica.

Il parametro "n" rappresenta l'ordine di reazione nel modello di Rosso e Robinson ^[26]. Quando n è uguale a 2, ciò significa che la relazione tra la temperatura e la velocità di crescita microbica è una relazione di secondo ordine, il che significa che una diminuzione della temperatura rispetto alla temperatura ottimale influisce sulla crescita in modo proporzionale al quadrato della differenza. (es. se c'è uno sbalzo di 5°C e la relazione tra temperatura e crescita microbica è di secondo ordine, l'effetto sulla crescita sarà proporzionale al quadrato di questa differenza di temperatura, ovvero $5^2 = 25$ volte)

Se n fosse 1, la relazione tra la temperatura e la velocità di crescita microbica sarebbe di primo ordine, (una relazione lineare), il che significa che una diminuzione della temperatura rispetto alla temperatura ottimale influirebbe sulla crescita in modo proporzionale alla differenza. Se n è 0, significa che la temperatura non ha alcun effetto sulla velocità di crescita microbica.

3.4.5 Concetto Gamma.

Se con il modello Rosso è possibile isolare l'effetto dei fattori di crescita come temperatura e attività dell'acqua e stimare i valori cardinali, il concetto Gamma, proposto da Pinon A, Zwietering M, et al. (2004) ^[22], si basa sull'ipotesi che l'effetto dei diversi fattori ambientali sulla velocità di crescita microbica sia indipendente ma moltiplicativo. Quindi che:

$$u_{opt} = u_{max} / [CM_2(pH) * CM_2(T) * CM_2(a_w)] \quad (25)$$

Il "fattore di combinazione" $[CM_2(pH)*CM_2(T)*CM_2(a_w)]$ rappresenta l'effetto complessivo sinergico delle condizioni ambientali sulla velocità di crescita del microorganismo. Se le condizioni ambientali sono tutte ottimali, ogni $CM_n(X)$ sarà uguale ad 1, e la velocità di crescita ottimale sarà uguale alla velocità di crescita massima altrimenti sarà minore. In altre parole, valuta l'effetto complessivo della combinazione di più variabili, si tiene conto degli effetti sinergici o antagonisti tra le diverse variabili.

3.4.6 *Il tempo di comparsa e tempo di adattamento.*

Come già detto, i microrganismi hanno bisogno di un certo tempo di adattamento (tempo lag) per adattarsi alle nuove condizioni ambientali prima di iniziare la crescita esponenziale; ma quando le condizioni sono ottimali, quindi quando il "fattore di combinazione" è uguale a 1 il tempo di adattamento sarà il minore possibile, il che significa che il microorganismo raggiungerà la crescita esponenziale il più rapidamente possibile. In altri termini la velocità di crescita μ è inversamente proporzionale al tempo lag. In sintesi, le condizioni ottimali di un microorganismo gli consentono di avere il minor tempo adattamento e la massima velocità di crescita. Quindi: $\mu=1/Lag$. Sostituendolo nel concetto gamma si ottiene:

$$1/Lag_{opt} = (1/Lag_{max}) / [CM_2(pH) * CM_2(T) * CM_2(a_w)]^{13} \quad (26)$$

Il tempo di apparizione del micelio (tv) viene introdotto come un'altra misura della velocità di crescita dei microrganismi. Segue quindi gli stessi principi, se le condizioni di crescita sono ottimali il micelio diventa subito visibile.

In generale, sia il tempo di adattamento (lag time) che il tempo di apparizione del micelio (tv) sono indicatori della velocità di crescita microbica e sono influenzati dalle stesse condizioni ambientali. Tuttavia, misurano tempi leggermente diversi: il tempo lag misura il tempo tra l'inoculazione del microorganismo e l'inizio della crescita, mentre il tempo di apparizione del micelio (tv) è la misura del tempo tra l'inoculazione del microorganismo e il momento in cui il micelio diventa visibile; quindi, è possibile sostituire $1/Lag$ con $1/tv$ nella formula ottenendo:

$$(1/tv_{max}) = (1/tv_{opt}) * [CM_2(pH) * CM_2(T) * CM_2(a_w)] \quad (27)$$

¹³ a_w = attività dell'acqua.

tv è il tempo di apparizione del micelio, il tempo necessario per raggiungere un diametro di 1 mm sul substrato di cultura¹⁴. Si può quindi calcolare il tempo necessario al micelio per raggiungere 1 mm di diametro (quindi inaccettabile) in determinate condizioni. Sono stati quindi calcolati le presunte tv (in determinate condizioni di temperatura e attività dell'acqua) partendo dal giorno 0 e partendo dal quattordicesimo giorno.

A questo punto è stato possibile confrontare i tv ottenuti nei challenge test dei tortini con quelle provenienti dal modello di previsione. Confrontando anche i tv calcolati al giorno 0 e dopo 14 giorni, questo perché l'aw (attività dell'acqua) oscilla maggiormente nelle prime due settimane, a causa dello scambio di acqua tra il nucleo dell'alimento (aw più elevata) e la periferia (aw inferiore dopo la cottura) fino a quando non si raggiunge un equilibrio. Dopo due settimane, l'aw potrebbe potenzialmente oscillare ma entro un range più piccolo.

Inoltre, è stato dimostrato che le differenze tra l'aw misurata il giorno 1 e quella misurata il giorno 14 influenzano le previsioni del modello matematico rendendo più precise le previsioni dopo il quattordicesimo giorno.

3.4.7 Precisione e Accuratezza.

Lo studio descritto utilizza l'approccio della microbiologia alimentare predittiva per prevedere i tempi di crescita del micelio. L'approccio si basa sulla riproducibilità delle risposte dei microorganismi ai fattori ambientali. I risultati vengono riassunti sotto forma di equazioni matematiche, che possono essere utilizzate per prevedere le risposte, risposte che poi devono essere rappresentative della realtà.

Il processo di prevedere la crescita di un microrganismo è simile al processo di prevedere la caduta di un oggetto. Entrambi i processi sono influenzati da leggi fondamentali, come la velocità specifica di crescita nel caso della crescita del microrganismo e la forza di gravità nel caso della caduta dell'oggetto. Tuttavia, ci sono anche variabili specifiche dell'ambiente che possono influire sul processo, come la composizione del terreno colturale nel caso della crescita del microrganismo e la resistenza dell'aria nel caso della caduta dell'oggetto. Pertanto, anche se ci sono leggi fondamentali che governano entrambi i processi, c'è comunque una certa variabilità che deve essere presa in considerazione nella previsione del risultato finale.

Per valutare questa capacità predittiva, esistono varie possibilità, in questo caso vengono proposte due misure complementari come semplici indici di prestazione, o indicatori di bontà

¹⁴ materiale o ambiente in cui i microorganismi possono crescere e moltiplicarsi.

Questo tipo di valutazione si basa solitamente sul confronto tra i valori predetti e quelli osservati.

In questo caso sono stati utilizzati il fattore di bias e il fattore di accuratezza proposti da Ross (1996)^[27]. Il fattore bias (BF) o fattore di distorsione viene calcolato come:

$$BF = 10^{\left(\frac{\sum |\ln(\text{previsto}/\text{osservato})|}{n}\right)} \quad (28)$$

dove n è il numero di osservazioni prese in considerazione.

Il fattore di bias indica se i valori osservati in media sono sopra o sotto i valori previsti, se sì, di quanto. Il fattore bias può essere visualizzato anche graficamente con un'equazione di tipo: $y = x + c$, dove y è il logaritmo del valore previsto, x è il logaritmo del valore osservato e c, è il logaritmo del fattore di bias. Viene utilizzato il logaritmo e non il semplice rapporto per attribuire lo stesso peso alla sovrastima e alla sottostima perché, ad esempio, se fosse un semplice rapporto, una sovrastima di un fattore di 10 ($\text{previsto}/\text{osservato} = 10$) avrà maggior peso rispetto ad una sottostima di un fattore di 10 del tempo di generazione ($\text{previsto}/\text{osservato}=0,1$) nel calcolo di una media. Ad ogni modo una perfetta corrispondenza tra previsioni e osservazioni porterà a un fattore di bias pari a 1, una sovrastima ad un fattore bias maggiore di 1, mentre una sottostima ad un valore inferiore di uno. Il fattore di accuratezza (AF) :

$$AF = 10^{\left(\frac{\sum |\ln|\text{previsto}/\text{osservato}||}{n}\right)} \quad (29)$$

l'unica cosa che cambia rispetto al fattore bias è il valore assoluto, che viene utilizzato per calcolare la distanza tra valore osservato e previsto. In questo caso, la direzione dell'errore non è considerata poiché l'obiettivo è valutare la vicinanza tra le previsioni e le osservazioni in termini assoluto dell'errore.

Questi fattori sono stati utilizzati per valutare la precisione e l'affidabilità del modello e per verificare se esiste una tendenza a sottostimare o sovrastimare i valori predetti rispetto ai valori sperimentali; n, è il numero di osservazioni utilizzate nel calcolo.

Il migliore dei casi si otterrebbe quando sia BF che AF sono uguali ad uno.

Gli studi di convalida sui dolci industriali hanno confermato i risultati sperimentali e hanno dimostrato la idoneità del modello per prevedere t_v nei cibi in funzione dell'aw e della temperatura. Il modello ha dimostrato una maggiore accuratezza delle previsioni quando si utilizzava l'aw misurata dopo 14 giorni di conservazione, quando l'equilibrio dell'aw era stato raggiunto. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che quando si verifica la germinazione e la crescita, l'aw è più vicina a quella ottenuta dopo 14 giorni rispetto all'aw iniziale (fig.10)

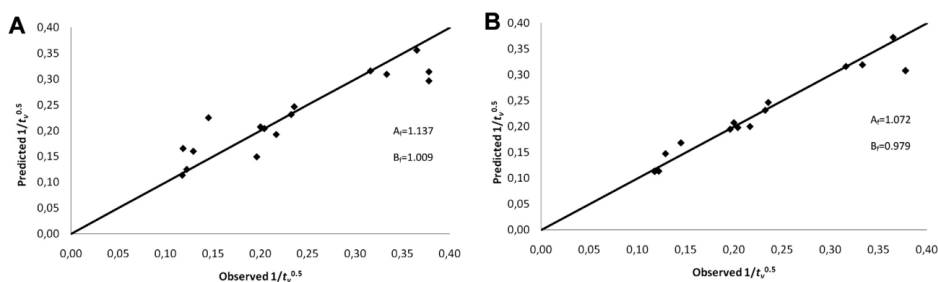


Figura 10: Correlazione tra il tempo osservato e il tempo previsto per la visibilità del micelio (t_v) sulle torte Madeleine (è stata applicata la trasformazione radice quadrata per ridurre la varianza). (A) Il t_v previsto è stato calcolato utilizzando l'attività dell'acqua iniziale delle torte (compresa tra 0,75 e 0,91); (B) il t_v previsto è stato calcolato utilizzando l'attività dell'acqua misurata dopo 14 giorni di conservazione (equilibrio di attività dell'acqua) a 15, 20 o 25 °C. Fonte: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.004>.^[11]

3.5 Predizione della stabilità di cereali per la colazione confezionati in pacchi flessibili

L'obiettivo del lavoro di Azanha, Faria, et.al (2005)^[1], portato come ultimo esempio è stato quello di determinare il contenuto critico di umidità (MC - critical moisture) di cornflakes e valutare l'adeguatezza di tre modelli matematici (lineare, punto medio e intervallo logaritmico) per stimare la shelf-life dei cornflakes (non zuccherati) confezionati in tre diverse confezioni flessibili in condizioni di stoccaggio simulato.

Per determinare la shelf-life dei cornflakes, uno dei fattori più importanti da considerare è quanta acqua riesce a penetrare dall'esterno della confezione all'interno del prodotto, poiché ciò causa la perdita di croccantezza e quindi l'inaccettabilità del prodotto da parte del consumatore che si aspetta un alimento croccante.

3.5.1 Panoramica

In uno studio condotto sulla stabilità dei cereali da colazione, da Azanha, Faria, et.al (2005)^[1], l'igroscopicità è risultata di grande importanza perché può causare problemi di mollezza, con conseguente perdita di consistenza e, più specificamente, di croccantezza. Ci sono almeno quattro fattori di deterioramento da considerare quando si conservano i cereali secchi: (a) aumento dell'umidità con perdita di croccantezza; (b) ossidazione dei lipidi con conseguente rancidità e sapore alterato; (c) perdita di vitamine con conseguente etichettatura

nutrizionale incorretta; (d) rottura del cereale con conseguente prodotto esteticamente indesiderabile. Per un alimento croccante e secco come i cornflakes, un aumento del contenuto di umidità dei cereali pronti al consumo del 2-3% di solito causa la perdita di croccantezza e li rende appiccicosi quando sono rivestiti di zucchero o glassati di zucchero.

Per capire come l'umidità influisce su un prodotto, è necessario ottenere l'isoterma di assorbimento dell'umidità del prodotto secco. L'isoterma di assorbimento può essere ottenuta mediante un esperimento di assorbimento, dove si pesa un campione del prodotto con umidità iniziale nota e lo si posiziona in una camera chiusa ad una determinata umidità relativa, si attende che il prodotto raggiunga l'equilibrio (cioè quando il peso non cambia più tra una misurazione e quella successiva). La differenza tra il peso iniziale e finale del campione corrisponde al suo incremento di umidità. . Questo procedimento viene ripetuto per diverse condizioni di umidità relativa e si utilizzano i dati ottenuti per costruire l'isoterma di assorbimento.

L'isoterma di assorbimento è un utile informazione soprattutto quando si parla di prodotti alimentari secchi o umidi dove variazioni di umidità ne compromettono la qualità . L'isoterma determina in effetti la tendenza dell'alimento a perdere o guadagnare umidità. Valutando l'effetto dell'acqua sulla conservazione di alimenti confezionati, in particolare quelli sensibili all'umidità come nel caso menzionato dallo studio, occorre considerare almeno due aspetti: il primo riguarda l'isoterma di assorbimento, che indica la quantità di acqua che può passare dall'atmosfera circostante al prodotto stesso. Tuttavia, poiché il prodotto è confezionato e l'atmosfera circostante al prodotto è quella all'interno della confezione, è anche essenziale comprendere il secondo aspetto, ovvero la quantità di umidità che riesce a permeare la confezione.

3.5.2 Sorbimento di acqua da parte degli alimenti.

Per analizzare l'assorbimento dell'umidità negli alimenti, si utilizza una curva chiamata "isoterma di sorzione". Questa curva descrive la quantità di acqua assorbita dall'alimento in diverse condizioni di umidità relativa (RH), mantenendo la temperatura costante. Ci sono varie procedure per costruire queste curve, ma una comune è quella di mettere l'alimento essiccato in contenitori con umidità relativa costante e pesare il campione via via che assorbe acqua, fino a quando il peso non cambia più tra due pesate consecutive. Questo significa che l'alimento ha raggiunto l'equilibrio, ovvero la capacità massima di assorbire acqua per quella data umidità relativa. In questa condizione, l'umidità relativa (RH) e l'attività dell'acqua (aw)

sono equivalenti, poiché la pressione di vapore dell'acqua nell'aria è uguale a quella dell'acqua nell'alimento. L'attività dell'acqua rappresenta la frazione della pressione di vapore dell'acqua nell'alimento rispetto alla pressione di vapore dell'acqua pura a quella temperatura. La curva di sorzione, o isoterma di sorzione, è una rappresentazione grafica della relazione tra l'attività dell'acqua e la quantità di acqua in peso contenuta in un determinato materiale.

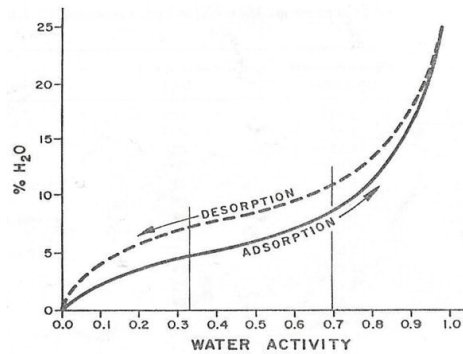


Figura 11: Ciclo di isteresi dell'assorbimento dell'umidità. Fonte: Kapsalis. [13]

L'isoterma di assorbimento è generalmente divisa in tre parti:

- la prima parte (A) è ripida e corrisponde all'assorbimento di uno strato d'acqua mono-molecolare, richiede la maggiore quantità di energia per rimuovere l'acqua, poiché l'acqua è fortemente adsorbita e legata a siti polari del materiale (es. ponti idrogeno);
- la seconda parte più piatta (B) corrispondente all'assorbimento di ulteriori strati d'acqua richiede una quantità di energia intermedia per rimuovere l'acqua, poiché l'acqua è legata in strati multipli ed è meno fortemente adsorbita rispetto alla fase A. (forze di van der Waals);
- e la terza parte (C) riguarda la condensazione dell'acqua nei capillari e nei pori del materiale per rimuoverla è necessario superare la tensione superficiale con una pressione o un aumento della temperatura, esattamente come in soluzioni diluite di sali.

Inoltre, l'acqua contenuta negli alimenti è distribuita in percentuali diverse dell'isoterma di assorbimento. In particolare, circa il 5% dell'acqua si trova nella fase A e B dell'isoterma, mentre il restante 95% si trova nella fase C, ovvero la fase capillare in cui l'acqua è trattenuta all'interno dei pori e dei capillari del materiale alimentare.

L'altra faccia della medaglia è però l'isoterma del desorbimento, ossia la quantità di acqua che viene liberata da un materiale quando l'alimento è esposto via via a condizioni di umidità

relativa decrescente, il desorbimento forse interessa più i processi di rimozione dell'umidità dall'alimento; quindi, non è il caso dell'articolo preso in considerazione. Tuttavia, è facile notare una differenza tra queste due linee di assorbimento e desorbimento, questo fenomeno prende il nome di isteresi (o ciclo d'isteresi). Ci sono almeno tre motivi che aiutano a spiegare questo fenomeno:

1. Quando le molecole di un materiale poroso assorbono l'acqua, le proteine e i polimeri all'interno del materiale possono piegarsi e orientarsi in modo diverso rispetto alla loro posizione iniziale, a seconda della quantità di acqua assorbita. Quando l'acqua viene poi rilasciata, queste molecole possono non tornare esattamente alla loro posizione iniziale, il che contribuisce all'isteresi.
2. Alcuni materiali possono cristallizzare quando assorbono acqua, il che può causare un cambiamento permanente nella loro struttura interna. Anche quando l'acqua viene rilasciata, il materiale può non tornare alla sua struttura iniziale, il che contribuisce all'isteresi.
3. Infine, i materiali porosi con pori molto piccoli possono trattenere l'acqua all'interno dei pori attraverso la capillarità. Quando l'acqua viene rilasciata, è più difficile per i pori vuoti espellere completamente l'acqua trattenuta, il che contribuisce all'isteresi. L'equazione di Lord Kelvin sulla condensazione capillare potrebbe aiutarne la comprensione.

3.5.3 *Condensazione capillare e Isteresi.*

L'isteresi è una proprietà di un sistema fisico nel quale il passaggio da una condizione A a B e viceversa sono possibili tramite percorsi diversi. . In altre parole, l'isteresi è una proprietà di un sistema fisico in cui il comportamento non è reversibile.

In questo caso sono l'assorbimento e il desorbimento a seguire percorsi diversi, in particolare l' a_w risulta essere minore durante il desorbimento rispetto all'assorbimento, per una stessa percentuale di acqua contenuta nell'alimento.

Uno dei modi in cui è stato provato a spiegare il fenomeno, è quello della teoria della Ink-bottle (fig.12), che presuppone che la zona capillare (la zona C nell'isoterma) dove si trova il 95% dell'acqua, sia formata da pori a forma di "bocchetta di inchiostro" o di "beuta", con un collo stretto e un corpo largo. Questo fenomeno viene spiegato fisicamente attraverso il fenomeno della condensazione capillare. Si parla di condensazione capillare quando, nei solidi porosi, avviene adsorbimento multistrato, dove il vapore è separato da un menisco

dalla fase liquida, all'interno del capillare. Il concetto perde di senso quando le dimensioni dei pori sono così piccole che il termine menisco cessa di avere un significato fisico; quindi, si presuppone che per parlare di condensazione capillare il poro debba essere un meso-poro, cioè un poro di dimensione comprese tra $1,5 * 10^{-3} \mu\text{m}$ e $100 * 10^{-3} \mu\text{m}$ così che il fenomeno possa essere descritto dall'equazione di Lord Kelvin in questo modo:

$$\ln(P/P_0) = \frac{-2\sigma V_m \cos\theta}{RT r_m} \quad (30)$$

dove P è la pressione di vapore del liquido sopra il menisco curvo (Pa), Po è la pressione di vapore saturo (Pa) a temperatura T (K) (In equilibrio su una superficie planare), σ è la tensione superficiale (N/m), θ è l'angolo di contatto (in completa bagnabilità, θ è 0 e $\cos\theta = 1$), V_m è il volume molare del liquido (m³/mol) e r_m è il raggio medio di curvatura del menisco ed R la costante universale dei gas. Nell'adsorbimento la condensazione avviene prima nella cavità di grande diametro con raggio r_2 , l'equazione (30) diventa:

$$P_a = P_0 * \exp\left(\frac{-2\sigma V_m RT}{r_2}\right) \quad (31)$$

mentre per il desorbimento che è controllato dal collo r_1 la pressione di desorbimento:

$$P_d = P_0 * \exp\left(\frac{-2\sigma V_m RT}{r_1}\right) \quad (32)$$

Dalle considerazioni precedenti, segue che per una data quantità di acqua assorbita, la pressione sarà più alta durante l'adsorbimento che durante il desorbimento.

L'equazione di Kelvin deriva in parte dall'equazione di Laplace. In particolare, nel caso in cui si considera il calcolo della pressione interna ad una bolla d'aria immersa nel liquido il segno negativo davanti al due viene applicato per ricordare la curvatura negativa della superficie del liquido del menisco.

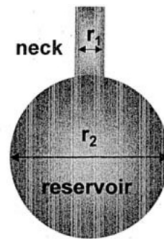


Figura 12: Rappresentazione di un poro a forma di beuta (o bottiglia d'inchiostro ink-bottle). Fonte: 0-8247-4063-7. [5]

Questa differenza di pressione è quella che poi cerca di spiegare il fenomeno di isteresi. Attualmente non è possibile ottenere una semplice reversibilità del processo. Sarebbe vantaggioso, se ci fossero prodotti in grado di assorbire e rilasciare l'umidità in modo completamente reversibile, poiché ciò garantirebbe la sicurezza alimentare ed eliminerebbe qualsiasi rischio di contaminazione batterica. Prendiamo ad esempio la carne bovina: si potrebbe rimuovere tutta l'acqua per conservarla, per poi raggiungerla nuovamente per riportarla alla stessa identica situazione iniziale, nel momento in cui devo cucinare la carne. Tuttavia, bisogna tenere presente il fenomeno dell'isteresi, che potrebbe influire sulla reversibilità del processo.

Inoltre, è importante considerare la curva standard a forma di S, che rappresenta la maggior parte dei prodotti alimentari. Alcuni prodotti alimentari, invece, seguono una forma a L, che indica una maggiore sensibilità all'umidità ambientale, soprattutto nei casi in cui il prodotto ha un alto contenuto di zucchero. Karel, Marcus, et al. (2003).^[14]

3.5.4 *Adattamento della curva dell'isoterma.*

Una volta ottenuta un'isoterma di assorbimento, in modo sperimentale, è possibile adattarne il comportamento con dei modelli matematici, poiché nel corso della storia, diverse persone hanno sviluppato equazioni che progressivamente riescono a spiegare la cinetica di assorbimento dell'acqua nelle varie regioni dell'isoterma.

La prima equazione è quella di Langmuir, sviluppata nel 1916, per descrivere l'adsorbimento di un gas su una superficie solida in funzione della pressione del gas sulla superficie ad una temperatura costante.

Il modello riesce a descrivere l'assorbimento mono-strato ossia la sezione "A" dell'isoterma di assorbimento. In vista di descrivere lo strato mono-molecolare, il modello presuppone che nell'alimento ci siano dei siti capaci di adsorbire, che questi siti siano tutti uguali, che possano ospitare al massimo una molecola, e che tra siti vicini non si influenzano l'un l'altro nel fenomeno dell'adsorbimento, infine, la superficie contenente i siti di adsorbimento è un piano perfettamente piatto senza increspature.

Per questo l'equazione di Langmuir è in grado di descrivere il fenomeno di adsorbimento, fornendo previsioni accettabili entro intervalli a_w di 0-0,3. L'equazione è così formulata:

$$\frac{a_w}{m} = \frac{1}{m_0} \cdot a_w + \frac{k}{b \cdot m_0} \quad (33)$$

dove:

a_w = attività dell'acqua (p/p_0),

m = contenuto di umidità all'equilibrio (kg H₂O/kg sostanza secca),

m_0 = contenuto di adsorbato nel mono-strato (kg H₂O/kg sostanza secca),

$k = 1/p_0$ (p_0 = pressione di vapore dell'acqua pura a temperatura costante),

b = costante di Langmuir

Quando a_w/m viene tracciato in funzione di a_w (fig. 13), il risultato è una linea retta con una pendenza uguale a $1/m_0$ e il valore del mono-strato può essere calcolato.

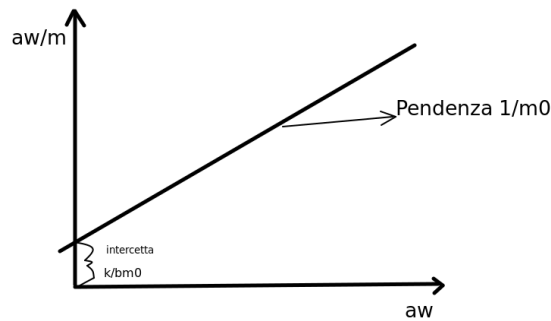


Figura 13: Retta rappresentante l'equazione di Langmuir

Il valore del mono-strato m_0 permette di conoscere l'area di assorbimento della superficie (S_0).

La superficie dell'acqua può essere calcolata utilizzando la seguente equazione:

$$S_0 = m_0 * \left(\frac{1}{M_{H_2O}} \right) * N_0 * A_{H_2O} \quad (34)$$

dove:

S_0 = area di assorbimento della superficie, (m²/g), M_{H_2O} = peso molecolare dell'acqua,

N_0 = numero di Avogadro, A_{H_2O} = area della molecola d'acqua.

Un ulteriore passo avanti fu l'isoterma BET, sviluppata a partire dall'equazione di Langmuir. La caratteristica principale del modello BET è che il processo di assorbimento è regolato da due meccanismi. Il primo meccanismo riprende la cinetica di Langmuir, in cui le molecole di gas vengono assorbite sui siti della superficie del solido fino a quando quest'ultima è coperta da uno strato di gas (spesso solo una molecola), e l'altro meccanismo è invece quello che rappresenta il passo evolutivo, cioè la condensazione in strati successivi, si assume che tutti i siti superficiali abbiano un'energia simile senza interazioni trasversali di superficie. Il modello non prevede l'adsorbimento nella regione capillare. Quindi descrive anche la regione "B" dell'isoterma oltre che la "A".

Il modello è generalmente valido solo per un intervallo a_w tra 0 e 0,55. La forma generale dell'equazione lineare dell'isoterma BET è:

$$\frac{a_w}{[(1 - a_w)m]} = \frac{(c - 1)}{(m_0 * c)} * a_w + \frac{1}{m_0} \quad (35)$$

dove C è la costante di calore superficiale data da:

$$c = costante = e^{(Q_s/RT)} \quad (36)$$

Q_s è calore di assorbimento (cal/mol). Il valore di c dipende dalle caratteristiche di assorbimento del sito adsorbente e diminuisce al di sopra del mono-strato.

Anche in questo caso dalla pendenza (fig.14) è possibile ricavare il valore dell'area di assorbimento della superficie, partendo da m_0 .

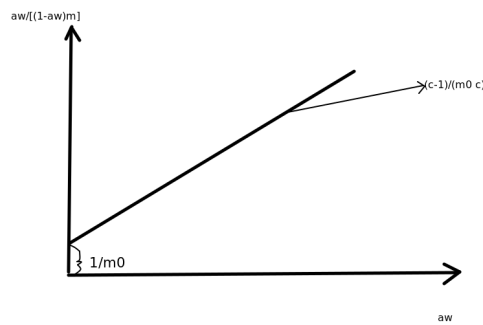


Figura 14: Grafico del monostrato BET, fonte: Rielaborazione immagine DeMan, J. M. (1999) [3]

Siccome l'equazione di BET funziona solo ad un certo intervallo di a_w , per livelli più elevati di a_w , è stato sviluppato il modello Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) che è un'equazione a tre parametri. Il modello GAB può essere applicato a prodotti alimentari in cui l'attività dell'acqua va da 0 a 0,95. Quindi riesce a descrivere le tre regioni A, B e C. Il modello GAB è sostanzialmente simile all'equazione BET in quanto presuppone un adsorbimento fisico localizzato in multistrati senza interazioni laterali. L'incorporazione del parametro k_b (costante), tuttavia, presuppone che le molecole del multistrato abbiano un'interazione con il sorbente che si colloca a livelli energetici intermedi rispetto a quelli delle molecole del mono-strato e del liquido in sospensione. Come se il secondo strato d'acqua ha le stesse proprietà degli strati successivi ma proprietà diverse dal mono-strato e da quelle dell'acqua liquida.

$$m = \frac{m_0 * k_b * c * a_w}{[1 - k_b * a_w][1 - k_b * a_w + c * k_b + a_w]} \quad (37)$$

L'equazione GAB è stata raccomandata dal Gruppo Europeo di Progetto COST 90 su Proprietà Fisiche degli Alimenti (Wolf et al. 1985) ed è stata accettata come la migliore equazione per modellare l'isoterma di sorzione dell'umidità al Simposio Internazionale sulle Proprietà dell'Acqua (ISOPOW) nel 1983. deMan, et.al , 1999 ^[5].

In aggiunta ai modelli di Langmuir, BET e GAB, è possibile utilizzare un modello lineare per descrivere la relazione tra contenuto di umidità e attività dell'acqua (a_w) in alcune porzioni delle isoterme di adsorbimento o desorbimento di alimenti. Il modello lineare è espresso come:

$$m = \alpha + \beta a_w \quad (38)$$

dove m rappresenta il contenuto di umidità, β è la pendenza della retta (g H₂O/g solido) e α l'intercetta (a $a_w = 0$). Questo modello può essere utile in alcune situazioni pratiche, come la previsione della durata di conservazione degli alimenti secchi confezionati. Chirife, J., & Iglesias, H. A. (1978) ^[4]. È stato dimostrato che la linea retta descriveva adeguatamente la parte inferiore dell'isoterma di un alimento secco, come il tè fino a circa 0,55 di attività dell'acqua. Altri autori hanno mostrato che una linea retta può essere utilizzata per descrivere l'isoterma di assorbimento del cavolo tra circa 0,07 e 0,25 di attività dell'acqua e quella di desorbimento del frumento tra 0,12 e 0,65 di attività dell'acqua. Tuttavia, i risultati per alcune isoterme, come quella del manzo essiccato all'aria, non sono stati completamente soddisfacenti.

3.5.5 Permeabilità della confezione

Fino a questo punto è stato descritto il modo in cui l'alimento assorbe e desorbe umidità, senza tenere in considerazione la "barriera" del confezionamento.

Una pellicola di confezionamento può estendere la durata di conservazione e migliorare la qualità degli alimenti limitando la migrazione dell'umidità, che potrebbe accelerare le reazioni di deterioramento (L.J Mauer; D.E Smith; T.P Labuza, 2000).^[18]

La permeabilità è una misura di quanto vapore acqueo viene trasmesso, da un lato all'altro di un materiale. Quando una pellicola è mantenuta a una temperatura costante e c'è un'umidità relativa costante su ciascun lato della pellicola, la quantità di vapore acqueo che passa attraverso una determinata area di pellicola per un determinato periodo di tempo è espressa

come tasso di trasmissione del vapore acqueo (WVTR). In sintesi, il WVTR è la quantità di vapore acqueo trasmesso per unità di tempo e area:

$$WVTR = \frac{gH_2O}{\text{giorni} \cdot m^2} = \frac{dW}{A \cdot dt} = \frac{k}{x} \cdot \Delta P \quad (39)$$

dove x è lo spessore del film, A è l'area del film (m²), ΔP è la differenza di pressione di vapore tra i due lati del film (mmHg H₂O), e k/x rappresenta la permeanza del film dove k è la permeabilità in unità.

La WVTR (Water Vapor Transmission Rate) è la velocità alla quale il vapore acqueo passa attraverso un film.

Per misurare la WVTR di un film, si utilizzano tazze speciali riempite con un agente disidratante o acqua distillata distinguendo tra due metodi standard per questa misura: il metodo della tazza asciutta e il metodo della tazza bagnata.

Nel metodo della tazza asciutta viene utilizzata una tazza speciale riempita con cloruro di calcio anidro per mantenere l'umidità relativa all'interno della tazza al 0%. Il film da testare viene fissato sulla parte superiore della tazza e sigillato con del nastro adesivo. La tazza viene pesata prima e dopo il periodo di test per calcolare la quantità di vapore acqueo che è penetrato attraverso il film; quindi, alla fine il peso della tazza sarà aumentato per tanto vapore è riuscito a penetrare. Quando il peso della tazza è plottato con il tempo in un grafico x-y genera una retta, la quale pendenza (m) in rapporto con la superficie del film, dà come risultante il WVTR. (Barbosa-Cánovas, Fontana, et al. 2007)^[3].

Dalla WVTR, è possibile calcolare la permeabilità del film, cioè la capacità del film di lasciar passare il vapore acqueo:

$$\text{permeabilità} = \frac{[WVTR \cdot \text{spessore film}]}{[\Delta P]} \quad (40)$$

3.5.6 *Contenuto critico di umidità*

Il principio generale consiste nell'utilizzo di un panel di giudici addestrati per valutare la differenza di qualità sensoriale tra un prodotto fresco di controllo e campioni con diversi livelli di umidità. La scala di intensità viene utilizzata per quantificare la percezione sensoriale della differenza tra i campioni. I campioni sono sottoposti a condizioni di stoccaggio specifiche, e la loro umidità viene misurata regolarmente. L'umidità critica (Mc) è stata raggiunta quando il prodotto ha perso la croccantezza a un livello tale da essere respinto dal consumatore e questo è stato poi confermato dalla misura di consistenza strumentale. In

sostanza, questa tecnica di misurazione consente di valutare oggettivamente la consistenza dei prodotti alimentari in termini di forza necessaria per comprimerli e di quantità di picchi positivi (cioè di croccantezza) presenti. Ciò consente di correlare la consistenza strumentale con la variazione del contenuto di umidità del prodotto, che è stata misurata in precedenza.

3.5.7 *Predizione della shelf-life.*

Una volta che si conoscono le isoterme di adsorbimento, quindi come l'alimento adsorbe umidità e la permeabilità del film di imballaggio all'umidità, è possibile utilizzare queste conoscenze per prevedere in quanto tempo, l'alimento raggiungerà l'umidità critica cioè in quanto tempo raggiungerà la fine della shelf-life. (Barbosa-Cánovas, Fontana, et al. 2007)^[3] Una delle applicazioni utilizzate da Labuza, per fare questo, è quello anzitutto di partire da dei presupposti:

1) L'aumento o la perdita di umidità dall'alimento all'interno della confezione è costante per tutta la durata dell'intero periodo di conservazione. L'espressione che descrive questo fenomeno deriva dalla combinazione della legge di Fick per la diffusione unidimensionale e della legge di conservazione della massa, considerando il flusso di massa dell'acqua in sistemi alimentari o di imballaggio secondo quanto segue:

$$\frac{dm}{A dt} = t * \frac{k}{x w_s} (p_{out} - p_{in}) \quad (41)$$

dove dm è la variazione di umidità dell'alimento, A è la superficie del film di imballaggio, t, è il tempo trascorso, k è la permeabilità del film, x (spessore del film in unità simili a k), w_s è il peso secco dei solidi contenuti, p_{out} (pressione del vapore all'esterno) e p_{in} (pressione del vapore all'interno della confezione) sono costanti.

La prima equazione in realtà è valida solo per un breve periodo di tempo in cui, in alimenti ad alto contenuto di umidità, l'attività dell'acqua può rimanere sostanzialmente costante anche con una variazione significativa dell'umidità. Tuttavia, per alimenti secchi e semi-umidi, una variazione di umidità può influire sull'equilibrio di umidità nel pacchetto e quindi sull'attività dell'acqua.

Quando gli alimenti semi-secchi guadagnano umidità, la forza che spinge il processo di assorbimento diminuisce nel tempo; quindi, la velocità di guadagno di umidità rallenta e la prima equazione non è più valida; quindi, per stimare i guadagni o le perdite di umidità di alimenti secchi sono state necessarie ulteriori assunzioni.

1) La prima assunzione riguarda la forma dell'isoterma di sorzione di umidità del prodotto, che si suppone essere lineare con una pendenza b per la gamma di variazione di umidità che stiamo considerando (figura 15).

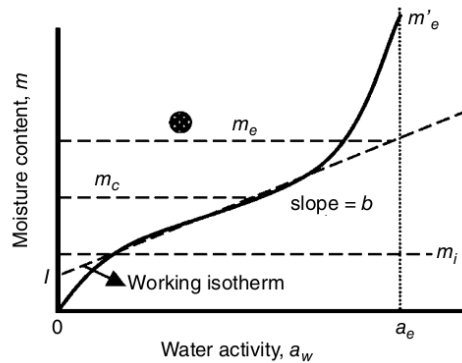


Figura 15: Linearizzazione isoterma Fonte : Barbosa-Cánovas, Fontana, et al. 2007^[3]

L'assunzione riguarda la linearità dell'isoterma di sorzione dell'umidità del prodotto. In pratica, si fa un'ipotesi semplificativa e si considera una porzione dell'isoterma, compresa tra il contenuto di umidità iniziale m_i e il contenuto di umidità critico m_c , che rappresenta il limite superiore della durata di conservazione del prodotto. Questo intervallo viene considerato costante e viene approssimato da una retta di pendenza b , utilizzata per stimare la quantità di umidità guadagnata o persa dal prodotto in un dato intervallo di umidità.

Per costruire la retta di approssimazione, si considerano due punti. Il primo punto si ottiene dall'intersezione di due rette: la prima retta è costruita come una perpendicolare all'asse x (a_w) che passa per il punto finale della curva di sorzione dell'umidità (m_e'), mentre la seconda retta è costruita come una linea parallela all'asse x che passa per il punto $y=m_e$. Il secondo punto si ottiene dall'intersezione della retta $y=m_i$ con la curva dell'isoterma di sorzione dell'umidità. È importante notare che nella costruzione della retta si fa uso di due diversi valori di m_e : uno per l'assunzione della retta come approssimazione lineare della curva e un altro (m_e') per la vera isoterma di adsorbimento dell'umidità. Quindi:

$$m = b \cdot (a_w) + I \quad (42)$$

2) La seconda assunzione riguarda la barriera principale al trasferimento di umidità, che si suppone essere il film di confezionamento.

3) Si presume che si raggiunga un equilibrio istantaneo di umidità all'interno della confezione nel tempo.

Ricavando i valori p_{in} e p_{out} dal modello lineare dai rispettivi valori e m_e ed m :

$$m_e = b \cdot (a_e) + I = b \cdot \left(\frac{p_{out}}{p_0} \right) + I$$

$$m = b \cdot (a_i) + I = b \cdot \left(\frac{p_i}{p_0} \right) + I$$
(43)

e sostituendoli nell'espressione che descrive il tasso costante di guadagno o di perdita di umidità si ottiene, dopo integrazione e riarrangiamenti, l'espressione:

$$\ln \left[\frac{m_e - m_i}{m_e - m} \right] = \frac{A}{k} \frac{x}{ws} \frac{p_0}{b} * t$$
(44)

In questo modo, si può determinare molto facilmente il tempo t , per raggiungere un certo contenuto critico di umidità, m_e , purché si conoscano la permeabilità (k/x), l'area della confezione A , il peso dei solidi contenuti ws , la pendenza dell'isoterma b e la pressione di vapore dell'acqua pura p_0 alle temperature di prova, la soluzione si basa sull'umidità che attraversa la porzione di isoterma che è stata approssimata con una linea retta. Questa approssimazione semplifica il calcolo del tempo necessario per raggiungere una determinata umidità critica. Ovviamente, l'isoterma deve essere determinata alla stessa temperatura alla quale si prevede l'aumento di umidità.

In sintesi, la predizione della shelf-life di un alimento è possibile grazie alla conoscenza delle isoterme di adsorbimento e della permeabilità del film di imballaggio all'umidità. Partendo da alcuni presupposti, è possibile utilizzare un'equazione che descrive il tasso costante di guadagno o perdita di umidità per determinare il tempo necessario per raggiungere un certo contenuto critico di umidità, m_e . Con la conoscenza della permeabilità del film, dell'area della confezione, del peso dei solidi contenuti, della pendenza dell'isoterma e della pressione di vapore dell'acqua pura alle temperature di prova, è possibile predire con facilità il tempo di shelf-life dell'alimento. (Barbosa-Cánovas, Fontana, et al. 2007)^[3]

CONCLUSIONI

L'approccio matematico nelle scienze alimentari si basa sull'utilizzo di assiomi delle scienze stesse, che costituiscono le regole di base per dedurre e dimostrare ulteriori fatti e teorie attraverso ragionamenti logici e matematici. Questo approccio consente di spiegare fenomeni complessi, costruendo una solida base di conoscenza.

Nell'ambito delle scienze alimentari, l'approccio matematico si manifesta in diversi modi ad esempio attraverso l'analisi strutturale che permette di scomporre gli alimenti in elementi geometrici finiti, consentendo di studiarne le proprietà chimico-fisiche in modo più accurato, oppure attraverso l'utilizzo di modelli matematici per stimare la durata di conservazione degli alimenti, considerando vari fattori come la composizione, le condizioni di conservazione e i processi di deterioramento, o ancora grazie all'utilizzo di strumenti informatici e reti neurali che consente di gestire e analizzare grandi quantità di dati campionari, migliorando la comprensione dei fenomeni alimentari. Inoltre, l'approccio matematico è utile per affrontare problemi complessi legati al consumismo e lo spreco alimentare attraverso l'identificazione di strategie mirate a una gestione più sostenibile delle risorse alimentari, incentivando la riduzione dei consumi e l'ottimizzazione della produzione e distribuzione degli alimenti.

Tuttavia, è importante considerare i limiti dell'approccio matematico. Le semplificazioni iniziali, pur essendo utili per affrontare fenomeni complessi, possono comportare una riduzione della complessità reale dei sistemi alimentari. Pertanto, è necessario considerare attentamente l'applicazione dei modelli matematici e valutare la loro adeguatezza nel contesto specifico, tenendo conto di fattori non quantificabili o imprevedibili che possono influenzare i risultati.

BIBLIOGRAFIA

1. Azanha, A.B. and Faria, J.A.F. (2005), Use of mathematical models for estimating the shelf-life of cornflakes in flexible packaging. *Packag. Technol. Sci.*, 18: 171-178. <https://doi.org/10.1002/pts.686>.
2. Anderson, David R., Sweeney, Dennis J., Williams, Thomas A., Freeman, Jim, Shoesmith, Eddie. *Statistics for Business and Economics*. 2014.
3. Barbosa-Cánovas, G. V., Fontana, A. J., Schmidt, S. J., & Labuza, T. P. (2007). *Water activity in foods: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons.
4. Chirife, J., & Iglesias, H. A. (1978). Equations for fitting water sorption isotherms of foods: Part 1 — a review. *Journal of Food Science*, 13(3), 159-174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1978.tb00792.x>.
5. DeMan, J. M. (1999). *Principles of Food Chemistry*. 3rd ed. Chapman & Hall Food Science Book, Food Science Text Series. Springer. ISBN 978-0834212343.
6. Fragassa, Cristiano. (2007). *QUALITÀ E CERTIFICAZIONE*.
7. Fu, Bin, and tèodore P. Labuza. "Shelf-Life Testing: Procedures and Prediction Methods." *Quality in Frozen Foods*, 1997, 377–415. doi:10.1007/978-1-4615-5975-7_19.
8. Gardini, Fausto, e Eugenio Parente, a cura di. *Manuale di microbiologia predittiva*. Milano: Springer Milan, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-88-470-5355-7>.
9. Guidance on date marking and related food information: part 1 (date marking). *EFSA Journal*, 18(12), doi:10.2903/j.efsa.2020.6306)
10. Hayat, Mattèw J. (2010). Understanding Statistical Significance. *Nursing Research*, 59(3), 219–223. doi:10.1097/nnr.0b013e3181dbb2cc.
11. Huchet V., Pavan S., Lochardet A., Divanac’h M.L., Postollec F., Thuault D. (2013). "Development and application of a predictive model of *Aspergillus candidus* growth

- as a tool to improve shelf life of bakery products". *Food Microbiology*, 36(1), 177-182. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.004>.
12. Institute of Food Science and Technology (U.K.). *Shelf Life of Foods: Guidelines for Its Determination and Prediction*. Institute of Food Science & Technology (UK), 1993. ISBN: 0905367111, 9780905367118.
 13. Kapsalis JG. Influences of hysteresis and temperature on moisture sorption isotherms. In: Rockland LB, Beuchat LR, editors. *Water Activity: Theory and Applications to Food*. New York: Marcel Dekker Inc; 1987. pp. 173-213
 14. Karel, M., & Lund, D. (2003). *Physical Principles of Food Preservation (Second Edition, Revised and Expanded)*. Springer.
 15. Kilcast, D., & Subramaniam, P. (2000). *The Stability and Shelf-life of Food*. Taylor & Francis.
 16. Labuza, Theodore & Schmidl, Mary. (1988). Use of sensory data in the shelf life testing of foods: Principles and graphical methods for evaluation. *Cereal Foods World*. 33.
 17. Lobry, J.R., Rosso, L., Flandrois, J.-P. (1991) A FORTRAN subroutine for the determination of parameter confidence limits in non-linear models. *Binary*, 3:86-93.
 18. Mauer, L.J., Smith, D.E., Labuza, T.P. (2000). Water vapor permeability, mechanical, and structural properties of edible β -casein films. *International Dairy Journal*, 10(5-6), 353-358. ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/S0958-6946(00)00061-3.
 19. Mengxuan Xiao, Sitong Liu, Huozhu Jin, Mingji Xiao, Huiqiang Wang, Haiwei Zhang, Qianying Dai, "Evaluating Freshness Loss of Green Tea with Q10 Method and Weibull Hazard Analysis under Accelerated Shelf Life Testing", *Journal of Chemistry*, vol. 2022, Article ID 2955839, 10 pages, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/2955839>.
 20. Montgomery, D. C. (2009). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons.
 21. Moore, D., Robson, G.D., Trinci, A.P.J. (Seconda Edizione). *1st Century Guidebook to Fungi*.
 22. Pinon A, Zwietering M, Perrier L, Membré JM, Leporq B, Mettler E, Thuault D, Coroller L, Stahl V, Vialette M. Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food

- products. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Feb;70(2):1081-7. doi: 10.1128/AEM.70.2.1081-1087.2004. PMID: 14766591; PMCID: PMC348795.
23. Rajalakshmi, R & Sujatha, G.P. & A, Serma Saravana Pandian & Rita, N & Perasiriyan, V & Narasingam, Karpoora Sundara Pandian. (2022). Application of Predictive Modeling to Assess the Shelf Life of Functional Enriched Sugarcane Juice. *INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES.* 12. 11049-11051.
 24. R.L Buchanan; R.C Whiting; W.C Damert (1997). When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. , 14(4), 313–326. doi:10.1006/fmic.1997.0125.
 25. Rosso, L., J. R. Lobry e J. P. Flandrois. "An Unexpected Correlation between Cardinal Temperatures of Microbial Growth Highlighted by a New Model". *Journal of tèoretical Biology* 162, n. 4 (giugno 1993): 447–63. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1993.1099>.
 26. Rosso, L., & Robinson, T. P. (2001). A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of molds. *International Journal of Food Microbiology*, 63(3), 265-273. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00469-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00469-4).
 27. Ross T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J Appl Bacteriol.* 1996 Nov;81(5):501-8. doi: 10.1111/j.1365-2672.1996.tb03539.x. PMID: 8939028.
 28. Tapia De Daza MS, Alzamora SM, Welti J. Combination of preservation factors applied to minimally processing of foods. *Critical. Reviews in Food Science and Nutrition.* 1996; 36(6):629-659.
 29. Triantaphyllou, Evangelos (2000). "Multi-Criteria Decision Making Methods: A Comparative Study" in *Applied Optimization*, Volume 44. DOI: 10.1007/978-1-4757-3157-6(Chapter 2), 5–21. doi:10.1007/978-1-4757-3157-6_2.
 30. van Boekel, M. A. J. S. (2009). *Kinetic Modeling of Reactions in Foods: Parameters Used in Food Science (Paragrafo 5.7)*. ISBN: 978-1-57444-614-2.
 31. Wilbey, R. A. (1997). Estimating shelf-life. *International Journal of Dairy Technology*, 50(2), 64–67. <https://doi.org/10.1111/J.1471-0307.1997.TB01739.X>.