DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

DINAMICHE DI CELLULE VEGETATIVE E SPORE DI *BACILLUS CEREUS* ARTIFICIALMENTE INOCULATO IN PANE E PANE IN CASSETTA CONTENENTI POLVERE DI GRILLO (*ACHETA DOMESTICUS*)

DYNAMICS OF VEGETATIVE CELLS AND SPORES OF *BACILLUS CEREUS* ARTIFICIALLY INOCULATED IN BREAD AND SANDWICH BREAD CONTAINING CRICKET POWDER (*ACHETA DOMESTICUS*)

TIPO TESI: (sperimentale)

Studente:
Riccardo Amagliani

Relatore:
PROF. ANDREA OSIMANI

Correlatrice:
DOTT.SSA CRISTIANA CESARO

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

Ai miei genitori

A Graziella

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE 4

ELENCO DELLE FIGURE 5

CAPITOLO 1 "INSETTI EDIBILI" 6

1.1 "Regolamentazione" 16

1.1.1 "Rischio microbiologico" 17

1.1.1.1 "Bacillus cereus" 23

CAPITOLO 2 "CHALLENGE TEST" 25

2.1 "Criteri *pass/fail*" 28

CAPITOLO 3 "SCOPO DEL LAVORO" 30

CAPITOLO 4 "MATERIALI E METODI" 32

CAPITOLO 5 "RISULTATI E DISCUSSIONE" 36

CONCLUSIONI 42

BIBLIOGRAFIA 44

RINGRAZIAMENTI 55

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1: Formulazioni dei campioni di pane in cassetta (P_C, C_{PC}) e pane (P, C_P) conservati in presenza di ossigeno (O_2) a diverse temperature (T_4, T_{amb}, T_{30}) e conservati sottovuoto (SV) a diverse temperature (T_4, T_{amb}, T_{30}) 34

Tabella 2: Risultati delle conte delle cellule vegetative e delle spore di *Bacillus cereus* in pane in cassetta 37

Tabella 3: Risultati delle conte delle cellule vegetative e delle spore di *Bacillus cereus* in pane 40

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1: Esempio di pane in cassetta realizzato nell'ambito della presente Tesi.....33

Capitolo 1
INSETTI EDIBILI

Entro il 2030, oltre nove miliardi di persone dovranno essere nutrite, insieme ai miliardi di animali allevati ciascuno anno per il cibo o come animali domestici (FAO, 2009). L'organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura ha quindi evidenziato un potenziale problema di sicurezza alimentare globale, che probabilmente si fa sentire più acutamente nei paesi in via di sviluppo (Belluco et al., 2013).

Tra le possibili risposte ai problemi delle risorse alimentari sufficienti per l'uomo e gli animali, nel suo rapporto intitolato "Insetti commestibili", la FAO raccomanda di prendere in considerazione l'allevamento di insetti su scala industriale (Van Huis et al., 2013).

Secondo la FAO, quasi 2,5 miliardi di esseri umani consumano regolarmente insetti nel mondo. In molte parti del mondo, con l'urbanizzazione e il cambiamento nelle abitudini alimentari, questo numero è in declino (Gracer, 2010). In Europa, sta inoltre guadagnando terreno l'idea di sviluppare la produzione industriale di insetti commestibili (Van Huis et al., 2013).

Diverse pubblicazioni scientifiche descrivono gli insetti come onnipresenti e in grado di riprodursi rapidamente (ad esempio *Acheta domesticus* può deporre fino a 1500 uova in un mese) durante tutto l'anno in condizioni controllate. Secondo queste stesse pubblicazioni, inoltre, gli insetti mostrano alti tassi di crescita rispetto all'allevamento convenzionale (Nakagaki e Defoliart, 1991). Altri studi sottolineano il basso impatto ambientale durante l'intero ciclo di vita degli insetti edibili, principalmente a causa di minori emissioni di gas serra (Oonincx et al., 2010) e riduzione della domanda di termini di spazio di allevamento. Le pubblicazioni scientifiche tutt'ora disponibili concludono che alcuni insetti possono costituire alimenti altamente nutrienti, particolarmente ricchi di calorie e con un alto contenuto di proteine, grassi e minerali. Inoltre, questi insetti potrebbero essere consumati interi, macinati

in polvere o in pasta e incorporati in varie preparazioni alimentari per aumentare la loro accettabilità da parte dei consumatori (Yi et al., 2013).

In un contesto di crescente scarsità di risorse, di un declino dei terreni agricoli e di forte dipendenza dalle proteine per l'alimentazione animale, molti produttori di mangimi per animali hanno mostrato un crescente interesse per il valore degli insetti come fonte di proteine. Essi ritengono che l'uso di materiale biologico – rifiuti e/o sottoprodotti dell'agricoltura e delle industrie alimentari – per allevare insetti potrebbe essere utile per diversi motivi: (1) sfruttamento di prodotti di basso valore (letame, rifiuti industriali) per produrre una fonte di proteine di alto valore, (2) riduzione di grandi volumi di rifiuti

(ad esempio, mediante vermicompostaggio, la trasformazione di rifiuti biodegradabili in fertilizzanti naturali usando vermi di compost). Prevedono l'allevamento di diverse specie di Ditteri per contribuire a ridurre vari tipi di rifiuti organici, in un breve lasso di tempo (Van Huis, 2013).

Secondo l'industria alimentare è previsto un aumento dell'utilizzo di insetti come mangime in acquacoltura e allevamento di pollame nei prossimi decenni. Inoltre, la produzione di mangimi tradizionali per animali domestici dovrebbe intensificarsi ulteriormente. L'industria alimentare ritiene che, di fronte alla crescente scarsità di risorse (terra, acqua, ecc.) e la necessità di un uso più efficiente di queste risorse, è giunto il momento di diversificare, in particolare, con l'uso di nuove fonti di proteine (Van Huis, 2013). Attualmente, 2086 specie di insetti sono consumate da circa 3071 gruppi etnici in 130 paesi del mondo (Ramos-Elorduy et al., 2009; Rumpold e Schlüter 2013). Nei paesi delle regioni tropicali, in Africa, Asia, Australia e Sud America, l'entomofagia si è tradizionalmente sviluppata nelle popolazioni rurali, che hanno trovato una fonte molto economica e abbondante di proteine negli insetti raccolti in natura (Barre et al., 2014). Successivamente si è diffusa nelle città di questi paesi, spesso sovraffollate, in particolare tra le popolazioni urbane più povere. Mentre la raccolta di insetti edibili persiste ancora nelle aree rurali, ha lasciato il posto a un'industria di produzione di massa di insetti edibili, situata principalmente nelle aree periurbane. Sviluppata inizialmente in aziende agricole di modeste dimensioni, la produzione e l'allevamento di insetti edibili avviene ora in aziende specializzate, in particolare in Thailandia e in altri paesi asiatici (Barre et al., 2014).

Gli insetti più comunemente consumati sono:

- Larve o adulti di Ortotteri (grilli, locuste e katididi) e Imenotteri (api, vespe e formiche),
- Larve di Coleotteri (punteruoli e coleotteri),
- Bruchi e pupe di Lepidotteri (farfalle e falene),
- alcuni adulti di Isotteri (termiti) o Hemiptera acquatici (insetti acquatici) (Durst e Shono, 2010; Mignon, 2002; Raubenheimer e Rothman, 2013). Sebbene l'obiettivo dei vari attori del settore sia quello di incorporare gli insetti nella dieta di base in futuro, è ancora attualmente un mercato di nicchia per pochi consumatori principalmente desiderosi di sperimentare nuove sensazioni.

Le norme del Codex Alimentarius relative ai cereali, alle verdure essiccate, ai legumi e alle sostanze proteiche vegetali vietano la presenza di insetti vivi interi nella farina o nei cereali, ma autorizzano un massimo dello 0,1% di frammenti di insetti in massa del campione. Anche tenendo conto di questa realtà, la Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti ha definito tolleranze per questi tipi di difetti, che sono naturali e inevitabili in alcuni alimenti.

A questo proposito, l'entomologo Marcel Dicke dell'Università di Wageningen nei Paesi Bassi ha stimato il nostro consumo annuale involontario di frammenti di insetti tra 500 g e un chilogrammo, soprattutto in prodotti fabbricati contenenti farina (pane, pasta, biscotti, ecc.), cioccolato, frutta e succhi di frutta o verdure.

Alcuni insetti considerati parassiti delle colture sono tuttavia apprezzati in tutto il mondo (Defoliart, 1995). Ad esempio, la sericoltura sfrutta il baco da seta, il bruco della falena della seta del gelso (*Bombyx mori*) che si nutre di foglie di gelso fino allo stadio di produzione della seta utilizzata per filare il suo bozzolo. Il baco da seta ha subito un intenso addomesticamento a causa del suo potenziale tecnologico e alimentare. Diversi paesi tra cui la Cina hanno investito nella sua produzione per ottenere seta e sfruttare le sue pupe per l'alimentazione umana e animale (Defoliart, 1995). Dal 1987, il Ministero della Salute Pubblica tailandese ha autorizzato l'incorporazione di *B. mori* pupee nelle formule alimentari prescritte ai bambini malnutriti (Defoliart, 1995). In India, Giappone, Sri Lanka e Cina, le pupe di *B. mori* e i residui della loro produzione sono utilizzati per l'alimentazione di pesci e pollame (Kiuchi e Tamaki, 1990). Un altro insetto che è stato addomesticato con successo è l'ape, *Apis mellifera*. Nei paesi industrializzati, l'apicoltura è praticata per la produzione di miele ma anche di cera d'api, polline, propoli, pappa reale e veleno d'api (usati per trattare gravi allergie legate alle punture) (Schmidt e Buchmann, 1992). Il colorante E120, ampiamente utilizzato nell'industria

agroalimentare e cosmetica, proviene dalla cocciniglia (*Dactylopius coccus*). Questo insetto produce acido carminico per proteggerlo dai predatori di insetti. L'acido carminico viene estratto dal corpo e dalle uova di questo insetto per fare un colorante di colore rosso, cremisi, autorizzato come colorante dalle normative europee e utilizzato in varie formulazioni alimentari come yogurt, dolciumi e bibite (Cardon, 2003; Verkerk et al., 2007).

Alcuni criteri sono stati selezionati dai professionisti per la produzione redditizia di insetti commestibili: la scelta dipenderebbe da una specie con interesse nutrizionale, privilegiando caratteristiche più facilmente accettabili dai consumatori (Rumpold e Schluter, 2013b). Gli insetti possono anche essere selezionati sulla base delle loro dimensioni, del comportamento sociale (ridotto cannibalismo), della sicurezza per i gestori, della sensibilità ai rischi epidemici, del potenziale di riproduzione e della sopravvivenza, dei benefici nutrizionali, del potenziale di conservazione e della commerciabilità (Schabel, 2010). In generale, ci si aspetta che l'insetto scelto produca molte uova con alti tassi di vitalità, che si sviluppi rapidamente con la massima sincronizzazione della pupa al fine di facilitare la raccolta degli individui, che abbia un alto tasso di conversione alimentare, con mangimi poco costosi, che non sia suscettibile alle malattie, che sia in grado di vivere in spazi ridotti con un'alta densità di individui, e di produrre proteine di qualità rispetto ad altre proteine animali o vegetali (Rumpold e Schluter, 2013b). I bruchi dei lepidotteri sono spesso usati perché non hanno ali in questa fase e non saltano, e convertono efficacemente la biomassa vegetale in biomassa animale (Schabel, 2010). Gli ortotteri (cavallette, katididi e grilli) sono utilizzati anche a causa della loro abbondanza e disponibilità geografica (Defoliart, 1995). Ad esempio, un chilogrammo di biomassa dalla cavalletta *Oxya fuscovittata* è stato prodotto in 29-35 giorni da 84 individui (Haldar et al., 1999).

Le poche pubblicazioni sull'argomento evidenziano il valore nutrizionale degli insetti commestibili, sebbene questi studi riguardino solo un numero molto limitato di specie. Questi risultati dovrebbero quindi essere considerati con le necessarie precauzioni. Sembra che alcune specie siano particolarmente caloriche e ricche di proteine, lipidi, minerali e vitamine, e con composizioni aminoacidiche generalmente ben bilanciate per le esigenze umane (Raubenheimer e Rothman, 2013; Rumpold e Schluter, 2013a.). Al contrario, gli insetti sono descritti come a basso contenuto di carboidrati con un massimo del 10% della massa totale in alcune specie di insetti (Chen et al., 2009). La composizione nutrizionale e il contenuto

energetico delle principali specie di insetto consumate in vari paesi sono presentati in due recenti pubblicazioni (Makkar, Tran et al., 2014; Rumpold e Schluter, 2013a). I valori forniti si basano sulla sostanza secca. Gli insetti studiati sono stati analizzati interi e sempre con il loro esoscheletro chitinoso.

Uno studio che ha confrontato 100 g di insetti con 100 g di carne (peso fresco) ha riportato un contenuto energetico simile (ad eccezione di alcuni tagli di carne di maiale che sono particolarmente ricchi di grassi) (Sirimungkararat et al., 2008).

Il contenuto proteico degli insetti può essere equivalente o addirittura superiore al contenuto proteico di alcune carni (Bukkens, 1997; Ramos-Elorduy, 1997; Srivastava et al., 2009). Secondo Rumpold e Schluter (2013a), le proteine rappresentano il componente principale della sostanza secca degli insetti, tra 45 e 75g/100g di peso secco, a seconda della specie. Secondo gli stessi autori, la composizione proteica e il contenuto di aminoacidi degli insetti variano notevolmente da una specie all'altra. Sembra anche che gli insetti siano poveri di metionina, il che è raramente il caso della carne. La sperimentazione dei mangimi dovrebbe consentire di specificare la qualità delle proteine degli insetti, sia in termini di digeribilità che di efficienza di conversione in amminoacidi. Uno studio cinese mostra variazioni molto ampie nel contenuto lipidico degli insetti, tra 7 e 77g/100g di peso secco, a seconda delle specie considerate e della loro dieta (Chen et al., 2009). Il contenuto lipidico può essere più alto nelle larve e nelle pupe rispetto agli insetti adulti (Chen et al., 2009). Gli insetti con il più alto contenuto lipidico di solito appartengono agli ordini di Isotteri (termiti) e Lepidotteri (farfalle e falene). Rispetto al pollame e al pesce, gli insetti possono contenere più acidi grassi polinsaturi (PUFA) (DeFoliart, 1991). In confronto, la carne bovina e suina contengono pochissimi PUFA, ma molto più acidi grassi monoinsaturi (MUFA) (DeFoliart, 1991). La composizione del colesterolo varia anche con la dieta degli insetti (Ritter, 2010). In effetti, non sono in grado di produrre i propri steroli, il che richiede loro di ottenerli dal loro cibo. I risultati ottenuti da uno studio tedesco (Rumpold e Schluter, 2013a) indicano che, in generale, il fabbisogno giornaliero di calcio e potassio per l'uomo non sarebbe soddisfatto dal consumo di 100g di insetti commestibili. Per quanto riguarda le basse quantità di sodio, è ipotizzabile che alcuni insetti possano essere utilizzati in diete a basso contenuto di sale. Infine, il fabbisogno di rame, ferro, magnesio, manganese, selenio, zinco e fosforo potrebbe essere soddisfatto con il consumo di 100 g al giorno di alcune specie di insetti. La presenza di ferro e zinco negli

insetti è particolarmente interessante perché questi due minerali sono spesso causa di carenze nutrizionali nei paesi in via di sviluppo (Rumpold e Schluter, 2013b; Van Huis et al., 2013). Anche il contenuto di minerali varia, a seconda della specie di insetti, del suo stadio di sviluppo e della sua dieta (Rumpold e Schluter, 2013a; Rumpold e Schluter, 2013b; Van Huis et al., 2013). Ci sono pochi dati sulla composizione delle vitamine, ma questi sembrano dimostrare una variabilità molto elevata. Tuttavia, alcuni insetti accuratamente selezionati sembrano essere in grado di fornire le vitamine necessarie agli esseri umani. Inoltre, l'allevamento di questi insetti su substrati ricchi di vitamine può aumentare il loro contenuto vitaminico (Pennino et al., 1991). Come indicato sopra, le composizioni nutritive degli insetti commestibili sono generalmente soggette ad ampie variazioni. Fattori esterni come il clima, il cibo, l'habitat e la preparazione (ad esempio se gli insetti sono grigliati o bolliti), così come il metodo analitico (Bukkens 1997; Chen et al., 2009; Verkerk et al., 2007) devono essere presi in considerazione. Al fine di mitigare queste variazioni, se gli insetti dovessero essere incorporati nella dieta umana (in particolare quella delle persone con determinati disturbi metabolici), dovrebbero essere sviluppati e messi a disposizione degli allevatori dei metodi standard per l'allevamento degli insetti, inclusa la composizione della dieta (Bednářová et al., 2014).

È necessario garantire che le tecniche di lavorazione utilizzate sugli insetti garantiscano la loro decontaminazione. La maggior parte degli insetti commestibili offerti per l'alimentazione umana o animale vengono disidratati dopo la macellazione al fine di garantirne la conservazione. Solitamente, possono essere utilizzati diversi trattamenti:

- Disidratazione in forno ventilato, a bassa temperatura: le temperature citate (Rumpold e Schluter, 2013a) vanno dai 60°C ai 110°C. La disidratazione a 90°C in aria secca è spesso praticata per durate superiori alle cinque ore. A questa temperatura viene applicato un trattamento termico di pastorizzazione, con valori di pastorizzazione molto elevati. In quest'ultimo caso, il trattamento di disidratazione garantisce anche la cottura per insetti che non sono stati precedentemente cotti. Gli insetti crudi congelati vanno preferibilmente scongelati a 4°C prima dell'essiccazione, con eliminazione degli essudati, per evitare di introdurre prodotti a bassissima temperatura nei forni di disidratazione.

- Frittura (uso più raro): questo trattamento termico ad alta temperatura (>160°) in olio bollente consente una decontaminazione microbiologica più efficace dei prodotti. L'alta temperatura denatura anche i composti tossici a base di proteine. Tale processo è applicato su scala artigianale in Asia, in particolare per la preparazione di aracnidi (ragni, scorpioni), che vengono direttamente immersi nel grasso di frittura. Alcuni altri insetti come le locuste vengono preparati in questo modo, specialmente in alcune zone dell'Africa. Durante la frittura, la diversità delle reazioni (termodegradazioni di vitamine e pigmenti, reazioni di Maillard, ecc.) e delle trasformazioni genera nuovi composti di varia tossicità, compresi i composti di nuova formazione i cui rischi per la salute associati dovrebbero essere valutati.

- Tostatura: a volte si utilizzano temperature di essiccazione più elevate alla fine del ciclo (>120°C) per "tostare" gli insetti, sviluppare aromi specifici o migliorarne la consistenza (prodotti volutamente croccanti per snack). I trattamenti superiori a 100°C, ma in assenza di umidità, distruggono le spore batteriche solo parzialmente: i prodotti così trattati sono solo pastorizzati e può essere ancora presente una contaminazione da spore vitali.
Va notato che un'essiccazione insufficiente può portare a una scarsa conservazione a medio termine, con lo sviluppo di muffe. In pratica, il processo di essiccazione dovrebbe portare gli insetti ad un $a_w < 0,70$ per un'adeguata conservazione, senza sviluppo di muffe durante lo stoccaggio e con inibizione di eventuali batteri presenti.

Altri metodi possono essere considerati, fra questi, la liofilizzazione o l'acidificazione (Klunder et al., 2012; Van Huis et al., 2013).
- Liofilizzazione: questa operazione serve ad eliminare per sublimazione la maggior parte dell'acqua contenuta in un prodotto surgelato. Si tratta quindi di un'operazione di disidratazione a bassa temperatura che consente di conservare gli alimenti a lungo termine (in un luogo fresco e asciutto). La liofilizzazione, poiché non è considerata una pratica in grado di risanare l'alimento, non è adatta per gli insetti uccisi dal semplice congelamento, ma potrebbe essere presa in considerazione per gli insetti precedentemente bolliti.

- Acidificazione: Klunder, Wolkers-Rooijackers et al., (2012) hanno dimostrato che la fermentazione lattica potrebbe inattivare le Enterobacteriaceae e stabilizzare la popolazione di

batteri sporigeni in una miscela di farine composite e acqua contenente tra il 10 e il 20% di vermi della farina macinati grigliati (*Tenebrio molitor*) (una miscela per la fortificazione proteica di alimenti fermentati).

Dopo la disidratazione, gli insetti commestibili possono essere mantenuti a temperatura ambiente come qualsiasi altro prodotto essiccato. Dopo la conservazione devono essere avvolti in un pacchetto sigillato. Il principale fattore che ne limita la conservazione è l'elevata quantità di acidi grassi insaturi che generano una maggiore suscettibilità alla perossidazione dovuta all'ossigeno (irrancidimento) sotto l'effetto del calore e della luce. La struttura e la presentazione favoriscono questa ossidazione, accelerando lo sviluppo di irrancidimento nei prodotti (sapori sgradevoli, perdita di qualità nutrizionale).
I prodotti derivati dagli insetti sono confezionati in atmosfera protettiva neutra (azoto) o confezionati sottovuoto per controllarne la durata. Alcuni prodotti disidratati commercializzati nell'Unione Europea vengono confezionati sottovuoto e poi congelati per rallentare le reazioni di ossidazione.

I pericoli per la salute associati agli insetti o ai prodotti a base di insetti possono essere di due tipi principali:
- specifici per la specie: presenza di pericoli microbici o di origine microbica, corpi estranei, sostanze tossiche (intrinseche o bioaccumulate), sostanze antinutrizionali o allergeni;
- relativi all'allevamento (alimenti, medicinali veterinari) o alle pratiche di trasformazione, o alle condizioni di conservazione e trasporto.
I pericoli qui presentati possono riguardare sia l'alimentazione umana che l'alimentazione animale e descrivono principalmente la mancanza di conoscenze che consentirebbero un'analisi esaustiva dei pericoli. L'analisi dei pericoli è stata condotta in base alla letteratura esistente fino ad oggi e a quelle che sono state considerate condizioni ragionevolmente prevedibili per la distribuzione/consumo.

Gli insetti vivi e trasformati possono essere considerati potenziali serbatoi e/o vettori di agenti fisici, chimici e biologici (e delle loro tossine) che possono influire sulla salute dell'uomo e degli animali se consumati direttamente o indirettamente attraverso l'alimentazione del

bestiame. I pericoli possono verificarsi sia naturalmente (insetto = serbatoio primario del pericolo biologico (tubo digerente e altre parti anatomiche), sia dalla contaminazione durante i processi di produzione, lavorazione e preparazione (allevamento su un substrato contaminato, mangimi contaminati, trattamento di inattivazione insufficiente, conservazione difettosa, trasferimento di contaminazione, ecc.).

La salubrità dell'insetto considerato come alimento deve essere quindi dello stesso livello degli altri alimenti "convenzionali". Ad oggi, le diverse fasi di produzione (allevamento, preparazione, confezionamento, conservazione) per gli insetti commestibili sono state studiate su un numero limitato di specie, e sono necessari ulteriori studi mirati. Tutti i processi attuati per garantire la sicurezza alimentare dovranno garantire il raggiungimento degli obiettivi fissati dalle normative sull'igiene alimentare, fra le quali anche la verifica delle condizioni di produzione, come per i prodotti di origine animale, concentrandosi sulla natura e l'origine del mangime somministrato agli insetti, sul controllo dei rischi e sulla garanzia della biosicurezza degli impianti. Tale verifica dell'allevamento, della preparazione e dell'imballaggio degli insetti commestibili dovrebbe applicarsi agli insetti interi e a tutti i prodotti derivati, in particolare le farine (polveri) di insetti, che possono essere inclusi nella preparazione di vari prodotti alimentari. Tenuto conto del metabolismo molto specifico degli insetti, devono essere prese particolari precauzioni nell'allevamento, nella preparazione e nella commercializzazione degli insetti destinati all'alimentazione, in particolare con uno screening analitico per eventuali sostanze tossiche nei prodotti finiti, caso per caso, come richiesto per l'immissione sul mercato dei nuovi prodotti alimentari (Regolamento (EU) n. 2015/2283)

In base alle conoscenze fin qui disponibili risulta opportuno escludere l'uso di insetti selvatici raccolti dall'ambiente naturale, a favore di insetti d'allevamento con garanzia di tracciabilità e in grado di beneficiare di un approccio HACCP completo.

Lo sviluppo dell'allevamento di insetti dovrebbe essere accompagnato dalla formulazione di raccomandazioni sulle buone pratiche (allevamento, trasporto e macellazione).

Occorre inoltre valutare il digiuno degli insetti prima della macellazione, i suoi effetti sulla microflora digestiva e il suo impatto in termini di rischi per la salute.

Per evitare il bioaccumulo di prodotti tossici negli insetti, i mangimi dovrebbero essere rigorosamente controllati, insieme alla qualità dei substrati agricoli (substrati organici in particolare). Inoltre, è opportuno effettuare un'analisi completa dei pericoli per gli insetti

utilizzati negli alimenti. Analisi microbiologiche più dettagliate, mirate ai principali agenti patogeni (e alle loro tossine) e alcuni indicatori ben scelti, eventualmente integrati da analisi genomiche per identificare tutti i microrganismi dominanti presenti negli insetti e i rischi biologici associati, dovrebbero essere intrapresi su un numero limitato di insetti candidati per una possibile produzione di massa.

I principali agenti patogeni potenzialmente presenti nei prodotti finiti dovrebbero essere sottoposti ad analisi. In particolare, la relazione tra insetti della matrice e tossinogenesi per *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum* dovrebbe essere meglio compresa. Una migliore conoscenza delle infezioni parassitarie associate al consumo di insetti sembra inoltre essere necessaria. Lo stesso vale per i prioni, per i quali il rischio non può essere escluso. Inoltre, è necessario considerare il rischio virale, che non è stato finora studiato (ANSES, 2015).
I principali rischi chimici nella produzione di insetti a fini alimentari sembrano derivare da sostanze prodotte in quantità sufficiente da alcune specie, al di sopra delle soglie di reattività e/o di protezione della salute per l'uomo, o da sostanze accumulate durante il metabolismo dall'insetto dal suo ambiente nell'ambito dell'ampia variabilità delle interazioni dinamiche che coinvolgono molte specie e fattori eco-ambientali. Studi tossicologici dovrebbero essere eseguiti su un pannello selezionato di specie non tossiche, come quelli condotti da un team cinese sulle proteine nelle pupe del baco da seta (Zhou and Han, 2006). I metodi di lavorazione possono anche essere responsabili dell'emergere di sostanze di nuova formazione e devono essere valutati i rischi associati alla loro presenza (ANSES, 2015).
Le parti fisiche (ali, zampe, rostri, ecc.) naturalmente presenti nei prodotti a base di insetti devono essere prese in considerazione nell'analisi dei pericoli (ANSES, 2015).

L'esistenza di numerose proteine comuni agli insetti commestibili, altri artropodi (acari, crostacei), molluschi, muffe ed elminti, potrebbe portare a reazioni crociate con le IgE di soggetti allergici ai crostacei e agli acari in particolare. Ciò dimostra l'importanza di analizzare sperimentalmente il potenziale rischio allergico al fine di caratterizzare i principali allergeni specifici di alcune specie di insetti, chiarire la resistenza di questi principali allergeni alla denaturazione termica e digestiva, studiare l'evoluzione di questi principali allergeni durante

la conservazione prolungata degli insetti commestibili e verificare l'esistenza di reazioni crociate (ANSES, 2015).

In generale, poiché l'insetto è una matrice alimentare non comune, dovrebbe essere studiata al fine di qualificare meglio e, se necessario, adattare le pratiche depurative associate ai processi di cottura, essiccazione, refrigerazione, congelamento, trattamento termico, ecc. La soddisfacente qualità microbiologica degli insetti preparati richiede un trattamento termico almeno equivalente alla pastorizzazione, ottenuto mediante cottura e/o essiccazione (ANSES, 2015).

Le tecniche di conservazione dovrebbero essere adattate per garantire la gestione della durata di vita degli insetti e dei prodotti derivati dagli insetti. Gli insetti disidratati devono essere portati ad un livello di umidità residua compatibile con la loro conservazione e avvolti in imballaggi ermetici o confezionati in atmosfera modificata, adatti alla data di conservazione dichiarata, tenendo conto degli alti livelli di acidi grassi insaturi che rendono questi prodotti molto sensibili all'ossidazione (ANSES, 2015).

Per il consumo umano, in assenza di una garanzia della sicurezza microbiologica degli alimenti derivati dagli insetti, è preferibile non mangiarli crudi. La qualità microbiologica di questi alimenti derivati dagli insetti dovrebbe essere presa in considerazione anche per l'alimentazione animale (ANSES, 2015).

Un'etichettatura adeguata dovrebbe avvertire il consumatore della presenza, in qualsiasi forma, di insetti negli alimenti. Più in particolare, il consumatore dovrebbe essere informato dell'eventuale presenza delle parti dure degli insetti (ali, zampe, rostri, ecc.), naturalmente presenti nel prodotto (ANSES, 2015).

Una comunicazione chiara sugli usi impropri/impropri ragionevolmente prevedibili degli insetti e dei prodotti derivati dagli insetti sembra essenziale; Ad esempio, la vendita di insetti o prodotti a base di insetti destinati all'alimentazione animale e dirottati verso l'alimentazione umana (ANSES, 2015).

1.1 **REGOLAMENTAZIONE**

Il Codex Alimentarius, che rappresenta una linea guida internazionale per la sicurezza alimentare, non considera gli insetti come cibo. Attualmente, nel Codex Alimentarius, gli insetti sono indicati solo come "impurità". Le normative differiscono fortemente da paese a

paese e la maggior parte dei paesi occidentali non si rivolge nemmeno specificamente agli insetti. Questo status giuridico non standardizzato in tutto il mondo rappresenta il più grande ostacolo per l'industria degli insetti commestibili poiché ostacola o rallenta la crescita di un mercato globale degli insetti commestibili. Nell'Unione Europea, l'entrata in vigore del nuovo Regolamento 2283/2015 sui Nuovi Alimenti e dei suoi Regolamenti di attuazione 2468/2017 e 2469/2017 ha chiarito e armonizzato le norme relative agli insetti commestibili che, fino ad allora, erano state considerate una "zona grigia" dal punto di vista giuridico. Al giorno d'oggi, gli insetti commestibili sono indubbiamente considerati come "nuovi alimenti". Infatti, il regolamento (UE) n. 2283/2015 specifica che le categorie di alimenti che costituiscono nuovi alimenti comprendono sia gli insetti interi che le loro parti. Dal 1° gennaio 2018, gli insetti e i prodotti a base di insetti devono essere autorizzati prima di essere immessi sul mercato e la procedura richiede almeno 17 mesi. Tuttavia, il regolamento offre una procedura di autorizzazione semplificata per i nuovi prodotti alimentari che sono nuovi per i mercati dell'Unione Europea, ma sono stati tradizionalmente utilizzati nei paesi terzi. In tale situazione, l'alimento può essere commercializzato sulla base di una semplice notifica all'operatore del settore alimentare, a condizione che sia possibile dimostrare che l'alimento tradizionale è sicuro (il consumo è continuato per più di 25 anni nella dieta abituale di un numero significativo di persone in almeno un paese terzo) e che non vi sono preoccupazioni per la sicurezza sollevate dagli Stati membri dell'UE o dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA). Questa procedura di notifica richiede solo 5 mesi. Nei mercati di lingua inglese (cioè Stati Uniti, Regno Unito, Canada, Australia e Nuova Zelanda), gli insetti commestibili sono per lo più soggetti all'approvazione delle loro agenzie di sicurezza alimentare. Nel sud-est asiatico e in Sud America, nonostante gli insetti siano considerati alimenti tradizionali, c'è poca o nessuna regolamentazione sulla produzione di insetti commestibili.

1.1.1 *RISCHIO MICROBIOLOGICO*

Lo studio delle comunità microbiche negli alimenti contenenti insetti rappresenta senza dubbio un campo di indagine relativamente nuovo. Alcuni studi si sono concentrati sulla composizione microbica e sulla dinamica degli insetti commestibili freschi o trasformati. Tra questi, ve ne so sono alcuni che analizzano nuovi alimenti che imitano preparazioni a base di

carne e prodotti a base di cereali arricchiti con proteine (Osimani e Aquilanti, 2021). Alcuni studi si sono anche focalizzati sui batteri sporigeni naturalmente presenti nei nuovi alimenti a base di insetti (Osimani e Aquilanti, 2021). Più in dettaglio, per i prodotti simili alla carne Stoops et al., (2017) hanno recentemente valutato le dinamiche microbiche durante la produzione e lo stoccaggio di prodotti simili alla carne macinata ottenuti dalla lavorazione di larve di vermi della farina (*Tenebrio molitor*) e vermi minori della farina (*Alphitobius diaperinus*). Per ottenere il prodotto finale, gli autori hanno sottoposto le materie prime (larve di insetti freschi) a diversi trattamenti termici, vale a dire, cottura a vapore e frittura. Di conseguenza, le cariche microbiche, compresi i conteggi delle spore batteriche, sono state influenzate dai trattamenti applicati. Più in dettaglio, sebbene le fasi di riscaldamento applicate fossero diverse per i due tipi di insetti (5 minuti di cottura a vapore per le larve di vermi della farina e 2 minuti di frittura per le larve di vermi minori della farina), è stata ottenuta una riduzione generale delle spore. È interessante notare che, alla fine della lavorazione, la presenza di spore è stata costantemente rilevata a seconda delle cariche iniziali presenti nelle larve fresche, nelle spezie e negli agenti leganti aggiunti, che potrebbero aver contenuto spore batteriche. Inoltre, durante la conservazione a freddo del prodotto macinato simile alla carne macinata ottenuto per 35 giorni, eseguita sia in presenza di ossigeno che sotto il confezionamento in atmosfera modificata (MAP), sono state costantemente rilevate cariche di spore batteriche comprese tra 0,7 e 1,5 log ufc/g, indipendentemente dalla specie di insetti e dalla composizione del gas dello spazio di testa. È interessante notare che l'isolamento e le analisi metagenetiche effettuate durante la conservazione del prodotto hanno rivelato la presenza dei generi *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Psychrobacillus* (Stoops et al., 2017). Più recentemente, Borremans et al., (2018) hanno valutato l'effetto di una salsa di soia e della marinata di vino rosso e della fermentazione lattica sulle cariche microbiche delle larve di vermi della farina. È interessante notare che Borremans et al., (2018) hanno scoperto che la conta delle spore aumentava con circa 1 log ufc/g durante la marinatura, raggiungendo 3,9 log ufc/g, mentre la fermentazione lattica era efficace nell'inibire le endospore batteriche e i clostridi solfito riduttori nella pasta fermentata di vermi della farina. La pasta di vermi della farina è stata anche sottoposta a valutazione microbiologica da De Smet et al., (2019). In quest'ultimo studio, la preparazione degli insetti con l'aggiunta di nitrito di sodio o lattato di sodio è stata sottoposta a conservazione a freddo. Anche in questo caso, durante la

conservazione a freddo a 4°C, la conta delle spore aerobiche e anaerobiche è rimasta più o meno costante, raggiungendo valori compresi tra 1,2 e 2,6 log ufc/g al termine della conservazione in frigorifero (tre settimane) (De Smet et al., 2019). Inoltre, la pasta di insetti è stata anche sottoposta a fermentazione lattica utilizzando fermenti lattici commerciali comunemente sfruttati per la produzione di prodotti a base di carne fermentata; La preparazione includeva anche l'aggiunta di nitrito. De Smet et al., (2019) hanno riferito che nella pasta fermentata, l'aggiunta sia di starter che di nitriti ha permesso la riduzione dei clostridi solfiti-riduttori, allo stesso modo della tradizionale fermentazione della carne. Per quanto riguarda l'uso di insetti commestibili come nuovo ingrediente alimentare per la fortificazione proteica dei prodotti a base di cereali, la maggior parte degli studi ha riguardato la panificazione. Osimani et al., (2018a) hanno caratterizzato per la prima volta i microrganismi che formano spore nel pane prodotto con polvere di insetti dai grilli domestici (*Acheta domesticus*). In questo studio è stata utilizzata polvere di grillo a livelli crescenti di sostituzione della farina di grano tenero (*Triticum aestivum*), fino al 30%. Le pagnotte di pane cotte sono state sottoposte a conteggio vitale dei batteri sporigeni e ad analisi basate sul DNA batterico (Polymerase Chain Reaction - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, PCR DGGE). Nonostante il processo di cottura, le pagnotte erano caratterizzate da conte di spore fino a 3,7 log ufc/g, a seconda del livello di sostituzione della farina di frumento con quella di grillo. Inoltre, le analisi molecolari, effettuate tramite PCR-DGGE, hanno evidenziato la presenza di diverse specie di *Bacillus*, tra cui *Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis e Brevibacillus borstelensis*. È interessante notare che sia *B. licheniformis* che *B. subtilis* sono associati al deterioramento del pane; inoltre *B. licheniformis* è anche potenzialmente patogeno per l'uomo. Successivamente, Roncolini et al., (2019) hanno studiato lo sfruttamento dei vermi della farina per la fortificazione proteica del pane. Il razionale dello studio era simile a quello applicato da Osimani et al., (2018a) con differenze nei livelli di sostituzione della farina di grano (5 o 10%). Per quanto riguarda i batteri sporigeni, sono stati evidenziati conteggi al di sotto dei limiti di rilevamento, sebbene l'analisi PCR DGGE abbia rivelato la presenza di alcune specie di *Bacillus*, comprese quelli già rilevati da Osimani et al., (2018a), oltre a *Brevibacillus agri* e *Paenibacillus* spp. Sulla base dei precedenti risultati di Osimani et al., (2018a) e Roncolini et al., (2019), un'ulteriore passo per migliorare la qualità dei prodotti lievitati a base di insetti è stato eseguito da Roncolini et al., (2020) producendo fette biscottate

contenenti polvere di verme minore della farina. Lo scopo di quest'ultimo studio è stato quello di superare il problema delle spore batteriche nel pane attraverso un'ulteriore fase di tostatura potenzialmente in grado di uccidere le cellule vegetative dei batteri sporigeni provenienti dalla germinazione delle spore che si può verificare subito dopo la cottura. Sfortunatamente, non è stata ottenuta alcuna riduzione significativa delle spore batteriche aerobiche dopo la tostatura delle fette di pane. Infatti, la conta delle spore nelle fette biscottate variava da 0,50 a 1,45 log ufc/g, a seconda del livello di sostituzione (10 o 30%). L'analisi basata sul DNA (PCR-DGGE) eseguita sulle fette biscottate ha permesso di rilevare la presenza di *Bacillus* e *Paenibacillus*. Inoltre, i valori di attività dell'acqua (a_w) rilevati nelle fette biscottate erano inferiori a quelli in grado di sostenere la crescita delle specie di *Bacillus*, rappresentando così un potenziale ostacolo per la moltiplicazione microbica. Come riportato nel "Profilo di rischio relativo alla produzione e al consumo di insetti come alimenti e mangimi" pubblicato dall'EFSA (2015), la presenza di batteri sporigeni negli insetti commestibili trasformati rappresenta una potenziale preoccupazione per la salute pubblica. Al momento, la maggior parte degli studi disponibili che si occupano di insetti commestibili utilizzati come ingredienti alimentari si concentrano principalmente sull'idoneità tecnologica di questa nuova fonte alimentare. Solo una minoranza di questi studi si occupa della valutazione dei rischi microbiologici legati alla presenza di batteri sporigeni negli alimenti a base di insetti. Sebbene siano stati attuati alcuni tentativi per limitare la presenza di batteri sporigeni negli alimenti (Roncolini et al., 2020), c'è ancora molto da fare. Come accennato in precedenza, uno dei problemi principali nel limitare la presenza di batteri sporigeni negli insetti edibili si basa sull'impossibilità di evitare la trasmissione verticale di questi batteri dalla madre alla prole. I batteri ospitati nell'intestino degli insetti sono noti per contribuire alla nutrizione degli insetti, alla produzione di feromoni e alla degradazione dei pesticidi; Inoltre, migliorano l'efficienza della digestione e forniscono enzimi digestivi o vitamine (Shinde, 2012). Per quanto riguarda i batteri sporigeni, Shinde et al., (2012) hanno isolato un ceppo di *B. subtilis* da un verme (*Helicoverpa armigera*) (Lepidoptera: Noctuidae) con elevata attività proteolitica, suggerendo così un contributo positivo di questo microrganismo alla digestione del mangime proteico e all'adattamento agli inibitori della proteasi delle piante ospiti. Inoltre, le specie del genere *Clostridium* che erano state isolate dall'intestino degli insetti sono state trovate utili per degradare cellulosa e xilano con enzimi multipli (ad esempio glicosidasi) (Jang e Kikuchi 2020). Quindi, una strategia per eliminare i

batteri sporigeni, tra cui *Bacillus* o *Clostridium*, negli insetti commestibili vivi potrebbe esercitare un effetto negativo sullo sviluppo e sulla crescita degli insetti. Inoltre, i substrati e i sistemi di allevamento e il contatto con il suolo possono svolgere un ruolo fondamentale nel limitare la contaminazione degli insetti commestibili da parte di batteri sporigeni (Fasolato et al., 2018). È interessante notare che l'associazione tra insetti e substrati utilizzati come mangime dipende dalla specie. Infatti, le larve di vermi della farina sono solitamente allevate a diretto contatto sia con il substrato che con gli escrementi dalle larve mescolati con i residui del substrato (frass) (Fasolato et al., 2018); quindi, dopo la raccolta, le larve devono essere sottoposte a un trattamento di pulizia. Per quanto riguarda le larve di falena domestica della seta (*Bombyx mori*), il loro contatto con i substrati di allevamento e il frass dipende dal sistema di allevamento, che potrebbe essere basato sull'uso di graticci, dove possono essere nutriti con foglie di gelso bianco, o sull'uso di diete artificiali (Fasolato et al., 2018, Bhattacharyya et al., 2016). Per i grilli domestici e i grilli campestri (*Gryllus campestris*), l'allevamento di queste specie di *Orthoptera* viene solitamente effettuato in gabbie senza contatto continuo né con il substrato di allevamento né con il frassino, facilitando così la separazione degli insetti dall'ambiente di allevamento (Fasolato et al., 2018). Infine, a causa del loro habitat sotterraneo, le ninfe del grillo talpa (*Gryllotalpa Gryllotalpa*) possono spesso essere in contatto con il suolo, quindi essere contaminate da batteri derivati dal suolo che di solito includono formatori di spore (Fasolato et al., 2018, Sudarshan et al., 2017). Un altro problema che l'industria alimentare deve affrontare per quanto riguarda la presenza di batteri sporigeni nei nuovi alimenti è legato al trattamento termico. Infatti, a causa dell'elevato contenuto di insetti nei grassi e nelle proteine, forti trattamenti termici volti a distruggere le spore batteriche possono anche essere dannosi per le caratteristiche nutrizionali e sensoriali degli ingredienti o degli alimenti derivati dagli insetti. Per l'industria alimentare, l'inattivazione delle spore e la gestione del risveglio e della germinazione delle spore rappresentano una vera sfida per gli alimenti sensibili al calore, come quelli contenenti ingredienti a base di insetti. Un recente studio condotto da Vandeweyer et al., (2017) sui vermi della farina ha riportato che lo sbollentamento delle larve, seguito da stoccaggio refrigerato o essiccazione industriale a microonde, ha avuto un effetto trascurabile sui carichi di endospore aerobiche. La produzione di spore batteriche dipende in gran parte dalla creazione di condizioni ambientali inadatte alla crescita. In queste condizioni, le spore vengono rilasciate dopo lisi della cellula madre (Christie e Setlow, 2020).

Poiché le spore prodotte sono metabolicamente inattive, possono resistere a condizioni sfavorevoli tra cui alte temperature, essiccazione, radiazioni e agenti chimici (ad esempio antibiotici, disinfettanti, ecc.). Le spore sono caratterizzate dalla presenza di un mantello e di una corteccia che circondano il cosiddetto nucleo; questi strati concentrici conferiscono resistenza alle spore (Clair et al., 2020). Inoltre, il nucleo ha le seguenti caratteristiche: un basso contenuto di acqua, un'elevata quantità di acido dipicolinico e ioni metallici bivalenti chelati e piccole proteine solubili in acido legate al DNA batterico (Clair et al., 2020). Una volta che la spora germina in una cellula vegetativa, la sua resistenza alle condizioni di stress viene persa. La germinazione delle spore è un fenomeno multistadio e complesso che coinvolge: i) recettori specifici, ii) la presenza nutrienti (ad esempio zuccheri e amminoacidi), iii) operoni specifici che codificano per proteine accessorie e iv) enzimi litici della corteccia (Christie e Setlow, 2020, Xing e Harper, 2020). Nonostante il progresso della conoscenza della germinazione delle spore, i meccanismi di trasduzione del segnale associati a questo fenomeno non sono ancora chiari (Christie e Setlow, 2020). In realtà, l'approccio "germinare per sradicare" rappresenta la tattica più applicata dall'industria alimentare per la decontaminazione delle spore; tuttavia, nuove tecnologie di conservazione, come il trattamento ad alta pressione (HPP), potrebbero essere utili per l'inattivazione delle spore, anche in combinazione con calore e specifiche condizioni acide (Evelyn e Silva, 2019). Come evidenziato anche da Rumpold et al., (2014), per ottenere una significativa inattivazione delle spore negli insetti commestibili utilizzando HPP con un tempo di trattamento economico, sono necessarie alte pressioni e temperature elevate. Per quanto riguarda i limiti microbici dei batteri sporigeni negli alimenti, la legislazione europea non prevede limiti di riferimento specifici per questo gruppo microbico, ad eccezione di quelli stabiliti dal regolamento (CE) n. 2073/2005, modificato dal regolamento (CE) n. 1441/2007 per *B. cereus* negli alimenti per lattanti essiccati e negli alimenti dietetici essiccati a fini medici speciali destinati ai lattanti di età inferiore ai sei mesi. È interessante notare che l'Autorità olandese per la sicurezza dei prodotti alimentari ha stabilito un criterio di sicurezza alimentare per quanto riguarda le conte vitali di *B. cereus* negli insetti commestibili (NVWA, 2014). Inoltre, anche il comitato scientifico belga dell'Agenzia federale per la sicurezza della catena alimentare (FASFC, 2014) ha raccomandato una fase di riscaldamento (scottatura, cottura, frittura o frittura) prima che i prodotti siano immessi sul mercato o consumati, poiché non si può escludere che batteri patogeni (e spore) provenienti

dall'ambiente di produzione possano infettare gli insetti e quindi i consumatori. Infine, un parere dell'Agenzia francese per l'alimentazione, l'ambiente, la salute e la sicurezza sul lavoro ha evidenziato come i trattamenti superiori a 100°C, ma in assenza di umidità, distruggano solo in parte le spore batteriche, poiché tale contaminazione è ancora presente nel prodotto finale (ANSEN, 2015). Le raccomandazioni di cui sopra evidenziano l'attenzione delle autorità pubbliche in merito ai rischi associati ai batteri che formano spore negli alimenti contenenti insetti commestibili che, a conoscenza dell'autore, devono ancora essere ulteriormente studiati.

1.1.1.1 Bacillus cereus

B. cereus è un noto patogeno mesofilo di origine alimentare in grado di moltiplicarsi tra 10 e 50 °C (con un optimum tra 28 e 37 °C). Da notare che alcuni ceppi di *B. cereus* sono anche in grado di moltiplicarsi a temperature di refrigerazione inferiori a 7°C. L'attività minima dell'acqua (a_w) richiesta da *B. cereus* per crescere è > 0,92. Le spore di alcuni ceppi di *B. cereus* richiedono l'attivazione del calore per germinare e sono moderatamente resistenti al calore (Osimani et al., 2018b). Tra i batteri sporigeni negli insetti commestibili, *Bacillus* rappresenta il genere più frequentemente rilevato, mentre il genere *Clostridium* è stato rilevato solo sporadicamente. Infatti, un recente studio che si è concentrato sulla presenza del gruppo *B. cereus* negli insetti commestibili trasformati dall'e-commerce, condotto da Fasolato et al., (2018), ha rivelato la presenza di ceppi appartenenti al gruppo *B. cereus sensu stricto*, al gruppo *Bacillus thuringiensis* e al *Bacillus cytotoxicus*, quest'ultimo è un potenziale patogeno di origine alimentare. Quindi tale studio ha fornito una prima linea di base nell'identificazione del pericolo di tale genere sporigeno negli insetti commestibili. Il gruppo *B. cereus*, noto anche come *Bacillus cereus sensu lato*, comprende dodici specie strettamente correlate, vale a dire, *Bacillus anthracis, B. cereus* (definito anche come *B. cereus sensu stricto*), *B. thuringiensis, Bacillus weihenstephanensis, Bacillus wiedmannii, Bacillus mycoides, Bacillus pseudomycoides, B. cytotoxicus, Bacillus toyonensis, Bacillus bingmayongensis, Bacillus gaemokensis* e *Bacillus manliponensis* (Rasigade et al., 2018), e nove nuove specie proposte, tra cui *Bacillus paranthracis, Bacillus pacificus, Bacillus tropicus, Bacillus albus, Bacillus mobilis, Bacillus luti, Bacillus proteolyticus, Bacillus nitratireducens* e *Bacillus paramycoides* (Liu Y et al., 2017). I membri del gruppo *Bacillus cereus* sensu stricto sono gli agenti causali di due sindromi gastrointestinali: i) un'intossicazione (malattia emetica) dovuta a una tossina stabile al calore, chiamata cereulide, che viene prodotta direttamente nella matrice alimentare,

e ii) un'infezione (malattia diarroica) causata da enterotossine di *B. cereus* che sono direttamente prodotte nell'intestino tenue dell'ospite (Osimani et al., 2018b). La sindrome diarroica è prodotta da due complessi di enterotossine, vale a dire, emolisina BL (HBL) e enterotossina non emolitica (NHE), insieme a due singole proteine chiamate citotossina K ed enterotossina T. È interessante notare che, per quanto riguarda il gruppo *B. cereus* sensu stricto isolato da Fasolato et al., (2018), negli insetti edibili, circa il 26% mostrava tutti i geni codificanti per i tre componenti dell'enterotossina HBL, mentre i geni per il NHE erano trasportati dal 30% dei ceppi, suggerendo così una potenziale attività patogena di tali ceppi. Da notare che il rischio di produzione di tossine emetiche negli alimenti dipende dal carico di cellule vegetative di *B. cereus*, che dovrebbe essere di almeno 10^5 ufc/g, mentre per produrre la sindrome diarroica, i carichi di *B. cereus* dovrebbero superare i 10^6 ufc/g (FSAI, 2016); quindi, il controllo della crescita (o sopravvivenza) di *B. cereus* negli alimenti insetti contenenti è fondamentale per prevenire la sua moltiplicazione e la produzione di tossine negli alimenti.

Da notare, è stabilito che solo l'ingestione di un alimento contenente da 4 a 5 log ufc/g di *B. cereus* può portare a malattie di origine alimentare (Pawluk et al., 2022). Al fine di valutare praticamente il rischio correlato a *B. cereus* negli alimenti contenenti insetti, è necessario applicare un approccio caso per caso. Infatti, sebbene siano stati condotti numerosi studi sul microbiota degli insetti commestibili (Garofalo et al., 2019), a conoscenza degli autori, solo un numero limitato di studi pubblicati si occupa della dinamica di specifici patogeni in alimenti pronti contenenti insetti commestibili.

Capitolo 2
CHALLENGE TEST

I challenge test microbiologici sono stati e continuano ad essere uno strumento utile per determinare la capacità di un alimento di supportare la crescita di organismi alterativi o patogeni. Anche i challenge test microbiologici svolgono un ruolo importante nella convalida dei processi destinati a fornire un certo grado di letalità nei confronti di un organismo bersaglio o di un gruppo di organismi bersaglio. Molto spesso, a quest'ultimo scopo, è associato uno standard di prestazione che il processo deve fornire (ad esempio, una riduzione di 5 log di *Escherichia coli* O157:H7 per le carni fermentate). Un challenge test microbiologico opportunamente progettato convaliderà che un processo specifico è conforme allo standard prestazionale predeterminato. La progettazione, l'implementazione e la valutazione di un challenge test microbiologico risultano essere attività complesse che dipendono da fattori legati alla formulazione, produzione, confezionamento, distribuzione e uso previsto dell'alimento. Quindi, uno studio correttamente eseguito deve considerare i fattori rilevanti e progettare un challenge test che valuti al meglio la sicurezza alimentare del prodotto (clmattson, 2006). La mancata considerazione delle caratteristiche del prodotto e dei fattori ambientali nella progettazione del test potrebbe portare a conclusioni errate. I challenge test microbiologici sono utili anche per determinare la potenziale durata di conservazione di alcuni alimenti refrigerati o conservati a temperatura ambiente. La determinazione dell'adeguatezza o dell'utilità dei challenge test microbiologici deve essere effettuata considerando la probabilità che il prodotto supporti la crescita di organismi alterativi o agenti patogeni o una conoscenza della storia precedente del prodotto. Ad esempio, non è utile condurre dei challenge test microbiologici su alimenti congelati che non sosterrebbero la crescita in condizioni di conservazione adeguate; né sarebbe particolarmente utile condurre dei challenge test microbiologici su cibi in scatola sterilizzati commercialmente. Tuttavia, nell'esempio del cibo in scatola, potrebbe essere appropriato condurre studi sulle confezioni inoculate come

parte del protocollo per la convalida del processo. I challenge test microbiologici sono molto utili per i prodotti alimentari che possono sostenere la crescita di organismi patogeni e che sono conservati in frigorifero, a temperatura elevata o a temperatura ambiente e vulnerabili alla crescita di microrganismi (clmattson, 2006). Quando si conduce uno studio microbiologico, è necessario considerare una serie di fattori (Vestergaard, 2001). Questi includono (1) la selezione di agenti patogeni o microrganismi surrogati appropriati, (2) il livello di inoculo, (3) la preparazione dell'inoculo e il metodo di inoculazione, (4) la durata dello studio, (5) i fattori di formulazione e le condizioni di conservazione e (6) analisi di campioni. L'interpretazione dei dati e i criteri *pass/fail* sono fondamentali per valutare se un alimento necessita di un controllo di tempo/temperatura per la sicurezza. Mentre i challenge test microbiologici sono utili per determinare il potenziale di deterioramento della formulazione di un prodotto, il resto della discussione in questo capitolo si concentrerà sui patogeni rilevanti per gli alimenti che necessitano di un controllo di tempo/temperatura per la sicurezza (clmattson, 2006).

Il livello di inoculo utilizzato nel challenge test microbiologico dipende dal fatto che l'obiettivo dello studio sia determinare la stabilità e la durata di conservazione del prodotto o convalidare una fase del processo progettata per ridurre il numero microbico. Tipicamente, un livello di inoculo compreso tra 10^2 e 10^3 cellule/g di prodotto viene utilizzato per accertare la stabilità microbiologica di una formulazione. Livelli di inoculo più elevati possono essere appropriati per altri prodotti. A seconda della formulazione del prodotto, una parte dell'inoculo può morire inizialmente prima di adattarsi all'ambiente. Se si utilizza un livello di inoculo troppo basso, si potrebbe presumere erroneamente che il prodotto sia stabile quando non lo è. Al contrario, se il livello di inoculo è troppo alto per questo scopo, il sistema di conservazione o gli ostacoli alla crescita possono essere sopraffatti dalla dimensione inappropriata dell'inoculo, portando alla conclusione errata che la formulazione non è stabile (clmattson, 2006). Quando si convalida una fase di letalità del processo come il trattamento termico, il trattamento ad alta pressione o l'irradiazione, tuttavia, di solito è necessario utilizzare un livello di inoculo elevato (ad esempio, da 10^6 a 10^7 cellule/g di prodotto) per dimostrare l'entità della riduzione dei microrganismi. Ad esempio, negli Stati Uniti, i trasformatori di succhi sono ora tenuti a dimostrare una riduzione di 5 log di microrganismi pericolosi rilevanti nei loro prodotti

(standard di prestazione 5 D). Questi protocolli di convalida della riduzione logaritmica di solito richiedono l'uso di metodi di placcatura. Per misurare questo livello di riduzione entro i limiti statistici del metodo di conteggio, il livello di inoculo deve essere di almeno 10^6 ufc/g (clmattson, 2006).

È prudente condurre il challenge test microbiologico oltre, almeno, la durata di conservazione desiderata del prodotto (*shelf life*). È ancora più auspicabile sfidare il prodotto per l'intera durata di conservazione desiderata più un margine oltre la durata di conservazione desiderata perché è importante determinare cosa accadrebbe se gli utenti detenessero e consumassero il prodotto oltre la durata di conservazione prevista. Alcune agenzie di regolamentazione richiedono un minimo di dati sulla durata di conservazione più almeno un terzo della durata di conservazione prevista (clmattson, 2006). Un'altra considerazione che incide sulla durata del challenge test è la temperatura di conservazione del prodotto. I prodotti refrigerati possono essere messi alla prova per l'intera durata di conservazione al di sotto della temperatura di conservazione target, ma a temperature di abuso vengono generalmente conservati per un tempo più breve. In alcuni locali di ristorazione, può essere conveniente per lo stabilimento alimentare conservare specifici prodotti refrigerati a temperatura ambiente per brevi periodi di tempo. Ad esempio, alcune operazioni di fast food possono trovare conveniente mantenere fette di formaggio fuso a temperatura ambiente fino a 8 ore. Ciò consente al formaggio di temperarsi e sciogliersi più velocemente durante la preparazione di cibi come panini caldi. Tuttavia, sulle fette di formaggio possono essere presenti agenti patogeni a causa della contaminazione incrociata durante la manipolazione nel ristorante, e pertanto sarà necessario eseguire dei challenge test microbiologici per dimostrare che questa pratica è sicura. Se il ristorante desidera conservare le fette di formaggio a temperatura ambiente per un turno di 8 ore, la durata del challenge test deve essere di almeno 12 ore. Questo challenge test viene eseguito per garantire che la rapida crescita di agenti patogeni non si verifichi se le fette di formaggio vengono contaminate in modo incrociato nel ristorante attraverso la manipolazione (clmattson, 2006). È anche auspicabile testare il prodotto oltre e significativamente oltre la sua intera durata di conservazione, poiché in alcuni prodotti possono verificarsi lesioni sub-letali. Ciò può portare a un lungo periodo di latenza, in cui potrebbe non essere possibile coltivare l'inoculo, ma nel tempo un piccolo numero di cellule danneggiate si riprende e cresce nel

prodotto. Questo rimbalzo, o fenomeno "Phoenix", è stato osservato in numerosi prodotti (Jay, 1996). La frequenza dei test è regolata dalla durata del challenge test microbiologico. È desiderabile avere un minimo di 5-7 punti dati durante la durata di conservazione per avere una buona indicazione del comportamento dell'inoculo. In genere, se la durata di conservazione viene misurata in giorni, la frequenza dei test dovrebbe essere almeno giornaliera, se non più volte al giorno. Se la durata di conservazione viene misurata in settimane o mesi, la frequenza del test è in genere non inferiore a una volta alla settimana (clmattson, 2006). Tutti gli studi dovrebbero iniziare con il test "tempo zero", cioè l'analisi del prodotto subito dopo l'inoculazione. Per alcuni tipi di prodotti, può essere desiderabile concedere anche un periodo di equilibratura affinché l'inoculo si adatti al prodotto prima del test. Potrebbe essere desiderabile eseguire il test più frequentemente (ad esempio, ogni giorno o più volte al giorno) all'inizio del challenge test microbiologico (ovvero, per i primi giorni o la prima settimana), e quindi ridurre la frequenza del test a intervalli più lunghi (clmattson, 2006).

2.1 **Criteri *pass*/*fail***

La selezione dei microrganismi da utilizzare nei challenge test dipende dalle conoscenze acquisite attraverso l'esperienza commerciale e/o dai dati epidemiologici che indicano che l'alimento in esame o alimenti simili possono essere pericolosi a causa della crescita di agenti patogeni. Inoltre, dovrebbero essere considerate le proprietà intrinseche (ad esempio pH, attività dell'acqua e conservanti) ed estrinseche (ad esempio atmosfera, temperatura e lavorazione) dell'alimento. L'importanza di un aumento della popolazione varia con la caratterizzazione del pericolo (microrganismo). Ad esempio, la crescita di agenti patogeni infettivi dovrebbe essere sempre controllata, mentre la maggior parte della produzione di tossine richiede una crescita sostanziale prima che esista un pericolo. In questo caso, la sola crescita dell'organismo tossigenico non comporta un pericolo per la salute, ma lo sarà la produzione di tossine (clmattson, 2006). Tra i microrganismi che possono essere utilizzati in un challenge test microbiologico è compreso anche *B. cereus* e di seguito sono indicate le raccomandazioni e le motivazioni del panel per la valutazione della crescita tollerabile. L'assenza di formazione di tossine è il criterio preferito. Tuttavia, poiché la misurazione della tossina è difficile, un aumento di 3 log rispetto ai livelli di inoculo indicherebbe la necessità

di un controllo tempo/temperatura (clmattson, 2006). Questa determinazione del limite di crescita si basa su quanto segue:

● I livelli iniziali tipici di *B. cereus* sono bassi; pertanto, 10^3 ufc/g sarebbe un livello iniziale conservativo basato sulla letteratura.

● Sono necessarie popolazioni > 10^6 ufc/g per produrre tossine a livelli pericolosi per la salute (FDA 2001).

● La tossina emetica *di B. cereus* è stabile al calore; pertanto, non è probabile alcuna riduzione a seguito della cottura.

Altre considerazioni:

● Le spore di *B. cereus* sono relativamente sensibili al calore. È probabile che la cottura al forno distrugga i bassi livelli trovati nella farina utilizzata in prodotti da formo (pane) (Kaur, 1986); tuttavia, in torte alla zucca è stata segnalata un'insolita elevata resistenza al calore (Wyatt e Guy, 1981). Il potenziale di sopravvivenza di *B. cereus* deve essere quindi valutato per prodotti specifici.

● Il riso e le patate hanno una storia di associazione con la malattia di origine alimentare provocata da *B. cereus*, pertanto, i prodotti contenenti riso o patate dovrebbero essere valutati per i requisiti di controllo del tempo/temperatura.

Capitolo 3
SCOPO DEL LAVORO

Il pane è un prodotto lievitato ottenuto dalla cottura di una miscela di farina di frumento o altre farine (ad esempio, segale, orzo, mais, riso e soia) con acqua, agenti lievitanti, sale e altri ingredienti. Oggi il pane rappresenta uno degli alimenti più importanti e consumati nella dieta quotidiana in tutto il mondo. Il ruolo delle proteine di alto valore nella dieta degli esseri viventi è cruciale, poiché sono fondamentali nella sintesi e nella degradazione dei nutrienti, nonché nelle funzioni metaboliche. Le proteine sono anche essenziali per mantenere la massa muscolare e la forza, soprattutto nelle persone anziane (Song et al., 2018). La malnutrizione proteico-energetica e la sicurezza delle proteine sono sfide a livello globale, specialmente nei paesi a basso reddito in presenza di un basso apporto alimentare generalizzato e di altri fattori ambientali avversi (Müller et al., 2005). Nei paesi ad alto reddito, compresi quelli europei, l'assunzione giornaliera raccomandata di proteine di 0,66 g per chilogrammo di peso corporeo è generalmente soddisfatta dagli adulti di entrambi i sessi che consumano diete miste (EFSA, 2012). Tuttavia, anche in questi paesi, l'assunzione di proteine subottimale può essere evidenziata negli anziani (European Nutrition for Health Aliance, 2005), dove è stato correlato alla sarcopenia, una condizione caratterizzata da perdita di massa e funzione muscolare scheletrica (Deer et al., 2015). Pertanto, la formulazione di alimenti ricchi di proteine rappresenta una sfida per l'industria alimentare moderna. Oltre ad aumentare la quantità di apporto proteico, la fortificazione alimentare può anche potenzialmente migliorare la qualità delle proteine fornite con la dieta, ad esempio aggiungendo più aminoacidi essenziali alla dieta. Con questo obiettivo in mente, la ricerca di nuove fonti proteiche si trova costantemente di fronte a nuove sfide in Europa (Song et al., 2018) e nel mondo (Franco-Miranda et al., 2017). Ad oggi, sono stati esplorati una serie di interventi nutrizionali per aumentare l'assunzione di proteine attraverso il consumo di pane, tra cui, tra gli altri, l'uso di farine di cumino e semi di cumino (Ahmad et al., 2018), idrolizzati di proteine del siero di latte e della

soia (Song et al., 2018) e persino polveri di insetti (Osimani et al., 2018, de Oliveira et al., 2017, Gonzalez et al., 2018). Gli ingredienti proteici utilizzati per la fortificazione del pane e di altri prodotti da forno lievitati possono alterare le caratteristiche sensoriali dei prodotti finali, con una conseguente riduzione dell'appetibilità e dell'accettabilità complessiva del consumatore, come è stato recentemente riscontrato per muffin (Höglund et al., 2017) e pane arricchito con polvere di grillo (*Acheta domesticus*) (Osimani et al., 2018). Per quanto riguarda le polveri di insetti commestibili, sia la ricerca scientifica che le industrie alimentari riconoscono l'elevato potenziale offerto da questi ingredienti proteici alternativi per l'uso di alimenti e mangimi. Oltre ad essere ricchi di proteine di alta qualità e aminoacidi essenziali, gli insetti commestibili sono anche caratterizzati da un alto contenuto di lipidi, micronutrienti e vitamine (Belluco et al., 2013). Inoltre, rispetto al bestiame tradizionale, l'allevamento di insetti commestibili presenta numerosi vantaggi, poiché gli insetti (i) causano basse emissioni di gas serra e ammoniaca; ii) subire una rapida moltiplicazione, con una conversione alimentare più efficiente; e iii) richiedono uno spazio di allevamento relativamente limitato (Van Huis et al., 2013). Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di valutare le dinamiche di cellule vegetative e spore di *Bacillus cereus* artificialmente inoculato in pane e pane in cassetta contenenti polvere di grillo (*Acheta domesticus*). A tale scopo sono stati realizzati pani sperimentali contenenti cariche note del patogeno target e realizzate conte vitali in piastra al fine di determinare l'evoluzione della carica microbica subito dopo la cottura dei pani e durante il periodo di conservazione degli stessi realizzato a differenti condizioni.

Capitolo 4
MATERIALI E METODI

Preparazione dell'inoculo

Per eseguire i challenge test sono stati utilizzati tre diversi ceppi di *B. cereus*, ovvero *B. cereus* ATCC 11778, *B. cereus* DSM 31 and *B. cereus* 1. I ceppi ATCC e DSMZ sono stati acquistati rispettivamente dall'American Type Culture Collection e dalla Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zell Kulturen. *B. cereus* 1 invece appartiene alla Collezione Culturale del Dipartimento di Microbiologia e Scienze dell'Alimentazione dell'Università di Torino.

I tre ceppi sono stati separatamente rinfrescati in brodo di coltura Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid, Basingstoke Hampshire, Regno Unito) a 30 °C per 24 ore. Successivamente, le brodocolture sono state centrifugate a 4000 rpm per 10 minuti utilizzando una centrifuga Rotofix 32A (Hettich, Tuttlingen, Germania). Una volta scartati i surnatanti, i pellet cellulari sono stati risospesi in soluzione fisiologica (0,85% NaCl); le sospensioni batteriche sono state quindi sottoposte alla misurazione della densità ottica (DO_{600}) utilizzando uno spettrofotometro Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Giappone) e tenendo in conto che un OD_{600} di 0,5 corrisponde a circa 9 log ufc/mL (Biesta-Peters et al., 2010). In seguito, sono state eseguite conte microbiche vitali su terreno agarizzato BHI per valutare la vitalità cellulare. Infine, è stata preparata una sospensione batterica per ogni ceppo diluendo la sospensione iniziale con soluzione fisiologica fino al raggiungimento del livello di contaminazione desiderato pari a 6 log ufc/mL.

Preparazione dei campioni di pane in cassetta e pane

La farina di grillo (*Acheta domesticus*) è stata acquistata da un'azienda locale (Nutrinsect, Montecassiano, Italia) . Tutti gli ingredienti sono stati mescolati manualmente per circa 10 minuti. Gli impasti sono stati lasciati lievitare per 30 minuti a 25 °C. Successivamente, sono

stati formati impasti dal peso di 300 g e di 600 g per la produzione di pane in cassetta e pane, rispettivamente. La cottura è avvenuta in forno a 230 °C per 60 minuti e per 90 minuti per i campioni di pane in cassetta e i campioni di pane, rispettivamente.
In figura 1 sono riportate le materie prime utilizzate per la produzione delle tesi sperimentali.

Figura 1. Esempio di pane in cassetta realizzato nell'ambito della presente Tesi



Dopo la cottura, i campioni di pane in cassetta e pane sono stati lasciati raffreddare, per poi essere confezionati in sacchetti di plastica; la conservazione è avvenuta in diverse condizioni: i) in presenza di ossigeno a 4 °C; ii) in presenza di ossigeno a temperatura ambiente; iii) in presenza di ossigeno a 30 °C; iv) sottovuoto a 4 °C; v) sottovuoto a temperatura ambiente; vi)

sottovuoto a 30 °C. In tabella 1 sono riportate le materie prime utilizzate per la produzione delle tesi sperimentali.

Tabella 1 – Formulazioni dei campioni di pane in cassetta (P_C, C_{PC}) e pane (P, C_P) conservati in presenza di ossigeno (O_2) a diverse temperature (T_4, T_{amb}, T_{30}) e conservati sottovuoto (SV) a diverse temperature (T_4, T_{amb}, T_{30}).

Ingredienti	Tesi sperimentali											
	O_2			SV			O_2			SV		
	PC T_4	PC T_{amb}	PC T_{30}	P T_4	P T_{amb}	P T_{30}	C_{PC} T_4	C_{PC} T_{amb}	C_{PC} T_{30}	C_P T_4	C_P T_{amb}	C_P T_{30}
Farina di grano tenero (g/100 g di impasto)	56,0						70,0					
Farina di grano duro (g/100 g di impasto)	24,0						30,0					
Farina di grillo (g/100 g di impasto)	20,0						n.a.					
Sale (g/100 g di impasto)	1,0						1,0					
Lievito (g/100 g di impasto)	0,5						0,5					
Acqua (g/100 g di impasto)	50,0						50,0					

"n.a." significa "non aggiunto"

Conte microbiche

Campioni di pane in cassetta e pane sono stati raccolti ad intervalli regolari (ogni 7 giorni), a partire dal giorno dell'inoculo di *B. cereus* (t_0) per valutarne la sopravvivenza sia delle cellule vegetative che delle spore. Aliquote da 10 g sono state sospese in 90 mL di acqua peptonata sterile (1 g L^{-1} di peptone). I campioni sono stati quindi omogenati per 3 minuti a 260 rpm utilizzando lo Stomacher 400 Circulator (International PBI, Milan, Italy).

Le sospensioni ottenute sono state diluite dieci volte in acqua peptonata sterile, piastrate in CHROMagar *B. cereus* (CBc) e incubate a 30 °C per 24 ore. Per la ricerca delle spore, aliquote da 2 mL di ciascun omogenato sono state sottoposte ad un trattamento termico a 80° per 10 min. Successivamente sono state lasciate a - 20 °C per 15 min al fine di esporre eventuali forme vegetative del patogeno ad uno shock termico, provocandone la morte cellulare.

A tal fine, è stato utilizzato il terreno selettivo e differenziale I risultati delle conte sono stati espressi come media del log ufc/g ± deviazione standard.

Misurazione dell'attività dell'acqua (a_w)

Durante l'esperimento è stata misurata l'attività dell'acqua (a_w) dei campioni di pane in cassetta e pane rispettando il metodo ISO 21807:2004 attraverso lo strumento AwTherm (Rotronic, Bassersdorf, Svizzera).

Analisi statistica

I dati raccolti sono stati sottoposti ad analisi unidirezionale della varianza (ANOVA), utilizzando l'Honest Significant Difference (HSD) di Tukey-Kramer a un livello di significatività fissato a 0,05 ($P < 0,05$). Le analisi statistiche sono state effettuate con il software JMP® versione 11.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Capitolo 5
RISULTATI E DISCUSSIONE

Pane in cassetta

I risultati delle conte vitali sono riportati nella tabella 2.

Per quanto riguarda le conte eseguite al tempo 0 (t_0), sono state registrate concentrazioni di cellule vegetative pari a 6.76±0.09 log ufc/g e 6.77±0.01 log ufc/g negli impasti di pane in cassetta con aggiunta di farina di grillo (I_{PC}) e negli impasti di controllo ($I_{C\,PC}$), rispettivamente, evidenziando che il livello di contaminazione desiderato è stato raggiunto in tutti i campioni. Tuttavia, da dopo la fase di cottura fino alla fine dell'esperimento è stata registrata una carica di cellule vegetative al di sotto del limite di rilevazione in tutti i campioni analizzati. Inoltre, non è mai stata rilevata la presenza di spore di *B. cereus* durante l'intero periodo di sperimentazione (t_0-t_2). Osimani et al., (2018) è stato tra i primi autori a studiare il comportamento dei microorganismi sporigeni che si sviluppano nei panificati prodotti con farina di grillo. Nel suo studio, le alte temperature raggiunte durante la fase di cottura non sono state in grado di eliminare definitivamente gli sporigeni, ma anzi alla fine dell'esperimento i pani erano caratterizzati da una concentrazione di sporigeni uguale a 3,7 log ufc/g. Infatti, grazie alla sua capacità di sporificare, *Bacillus* spp. è generalmente in grado di sopravvivere al processo di cottura (Grabowski et al., 2017; Pepe et al., 2003; Rosenkvist et al., 1998). I risultati ottenuti da Roncolini et al., (2019) sono invece in linea con quelli registrati nel seguente lavoro. Infatti, nel suo studio sull'utilizzo di vermi della farina (*Tenebrio molitor*) per l'arricchimento proteico del pane, la carica di sporigeni rilevata dopo la fase di cottura era al di sotto del limite di rilevazione. Probabilmente, nel seguente esperimento come in quello condotto da Roncolini et al., (2019), le spore non sono state in grado di tollerare le alte temperature raggiunte nel cuore dei pani.

Tabella 2 – Risultati delle conte delle cellule vegetative e delle spore di *Bacillus cereus* in pane in cassetta

Livello di inoculo		**Campione**		***Bacillus cereus* (Log ufc/g)**			**aw**			**Temperatura (°C)**
				t_0	**t_1**	**t_2**	**t_0**	**t_1**	**t_2**	
6 log ufc/g		I_{PC}	Cellule vegetative	6,76±0.09			0,98			
			Spore	<1,00						
		$I_{C\ PC}$	Cellule vegetative	6,77±0,01			0,98			
			Spore	<1,00						
		PC	Cellule vegetative	n.e.			0,90			98,8
			Spore	<1,00						
		C_{PC}	Cellule vegetative	n.e.			0,88			97,9
			Spore	<1,00						
	O_2	PC T_4	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,95	0,95	96,8
			Spore		<1,00	<1,00				
		C_{PC} T_4	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,96	0,96	97
			Spore		<1,00	<1,00				
		PC T_{amb}	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,94	0,95	97,3
			Spore		<1,00	<1,00				
		C_{PC} T_{amb}	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,89	0,92	97,9
			Spore		<1,00	<1,00				
		PC T_{30}	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,94	0,93	97,3
			Spore		<1,00	<1,00				
		C_{PC} T_{30}	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,96	0,95	97,2
			Spore		<1,00	<1,00				
	SV	PC SV T_4	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,92	0,92	97,2
			Spore		<1,00	<1,00				

		C_{PC} SV T_4	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,95	0,93	97,8
			Spore		<1,00	<1,00				
		PC SV T_{amb}	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,90	0,91	97,9
			Spore		<1,00	<1,00				
		C_{PC} SV T_{amb}	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,96	0,95	96,8
			Spore		<1,00	<1,00				
		PC SV T_{30}	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,94	0,94	97
			SPcore		<1,00	<1,00				
		C_{PC} SV T_{30}	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,93	0,95	97,3
			Spore		<1,00	<1,00				

Impasto dopo la lievitazione (IPC, IC PC), pane appena sfornato (PC, CPC), pane conservato in presenza di ossigeno a 4 °C (PC T4, CPC T4), a temperatura ambiente (PC Tamb, CPC Tamb), a 30 °C (PC T30, CPC T30) e pane conservato sottovuoto a 4 °C (PC SV T4, CPC SV T4), a temperatura ambiente (PC SV Tamb, CPC SV Tamb), a 30 °C (PC SV T30, CPC SV T30).
I valori sono espressi come log ufc/g ± deviazione standard
t0, giorno dell'inoculo; t1, giorno 7; t2, giorno 14; n.e., non eseguiti; ufc, unità formanti colonie
"<1.00" indica che B. cereus era inferiore al limite di rilevazione (1 log ufc/g)
"SV" significa "sottovuoto

Pane

Nella tabella 3 sono riportati i risultati delle conte microbiologiche vitali eseguite sui campioni di pane. In questo caso, al tempo 0 (t_0) i risultati delle analisi effettuate hanno rilevato una concentrazione di cellule vegetative uguale a 7,59±0.09 log ufc/g e 7,39±0,01 log ufc/g nell'impasto addizionato di farina di grillo (I_P) e nell'impasto contenente solo farina di grano ($I_{C\,P}$), rispettivamente. Dopo una settimana (t_1), nei campioni è stata registrata la presenza del patogeno in esame. Più nel dettaglio, i risultati delle conte eseguite su pane conservato a 30°C in presenza di ossigeno hanno evidenziato una carica di cellule vegetative pari a circa 2,16 ± 0,09 log ufc/g, mentre in tutti gli altri campioni non è stata rilevata la presenza né di cellule vegetative né di spore (< 1,00). Al tempo 2 (t_2), la carica di *B. cereus* nei pani conservati a 30°C in presenza di ossigeno è rimasta costante (2,31±0,01 log ufc/g). Tuttavia, nei campioni contenenti farina di grillo conservati in presenza di ossigeno a temperatura ambiente (P T_{amb}) è stata registrata una concentrazione di cellule vegetative uguale a 2,32±0,06 log ufc/g, evidenziando quindi un leggero aumento della carica microbica. È degno di nota che in nessun campione conservato sottovuoto è stata rilevata la presenza di *B. cereus*, né al t_1 né al t_2.

Anche nello studio condotto da Osimani et al., (2018) è stato registrato un abbassamento della carica microbica tra le conte effettuate sull'impasto e quelle eseguite sul pane appena sfornato. È importante sottolineare anche la differenza tra i risultati ottenuti sui pani contenenti farina di grillo e i pani contenenti solo farina di grano. Infatti, così come nel lavoro di Osimani et al., (2018) sulla ricerca di batteri sporigeni, la carica di *B. cereus* rilevata in C T_4, C T_{amb} e C T_{30} era sotto il limite di rilevazione (<1.00).

Tabella 3 – Risultati delle conte delle cellule vegetative e delle spore di *Bacillus cereus* in pane

Livello di inoculo		**Campione**		***Bacillus cereus* (Log ufc/g)**			**aw**			**Temperatura (°C)**
				t_0	**t_1**	**t_2**	**t_0**	**t_1**	**t_2**	
6 log ufc/g		I_P	Cellule vegetative	7,59±0,09			0,98			
			Spore	<1,00						
		$I_{C\,P}$	Cellule vegetative	7,39±0,01			0,98			
			Spore	<1,00						
		P	Cellule vegetative	n.e.			0,89			97,1
			Spore	<1,00						
		C_P	Cellule vegetative	n.e.			0,92			97,8
			Spore	<1,00						
	O_2	P T_4	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,95	0,96	97,6
			Spore		<1,00	<1,00				
		C_P T_4	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,95	0,96	97,4
			Spore		<1,00	<1,00				
		P T_{amb}	Cellule vegetative		<1,00	2,32±0,06		0,94	0,95	97,5
			Spore		<1,00	<1,00				
		C_P T_{amb}	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,89	0,92	97
			Spore		<1,00	<1,00				
		P T_{30}	Cellule vegetative		2,16±0,29	2,31±0,01		0,93	0,93	96,5
			Spore		<1,00	<1,00				
		C_P T_{30}	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,95	0,94	96,8
			Spore		<1,00	<1,00				
	SV	P SV T_4	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,91	0,92	97

			Spore		<1,00	<1,00				
		C_P SV T_4	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,93	0,94	98,1
			Spore		<1,00	<1,00				
		P SV T_{amb}	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,91	0,94	97,9
			Spore		<1,00	<1,00				
		C_P SV T_{amb}	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,92	0,90	97
			Spore		<1,00	<1,00				
		P SV T_{30}	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,94	0,96	97,3
			Spore		<1,00	<1,00				
		C_P SV T_{30}	Cellule vegetative		<1,00	<1,00		0,95	0,95	95,6
			Spore		<1,00	<1,00				

Impasto dopo la lievitazione (I_P, $I_{C\,P}$), pane appena sfornato (P, C_P), pane conservato in presenza di ossigeno a 4 °C (P T_4, C_P T_4), a temperatura ambiente (P T_{amb}, C_P T_{amb}), a 30 °C (P T_{30}, C_P T_{30}) e pane conservato sottovuoto 4 °C (P SV T_4, C_P SV T_4), a temperatura ambiente (P SV T_{amb}, C_P SV T_{amb}), a 30 °C (P SV T_{30}, C_P SV T_{30}).
I valori sono espressi come log ufc/g ± deviazione standard
t_0, giorno dell'inoculo; t_1, giorno 7; t_2, giorno 14; n.e., non eseguiti; ufc, unità formanti colonie
"<1.00" indica che *B. cereus* era inferiore al limite di rilevazione (1 log ufc/g)
"SV" significa "sottovuoto"

Inoltre, la persistenza del patogeno nei soli campioni conservati a 30 °C e a temperatura ambiente in presenza di ossigeno potrebbe essere attribuita al fatto che *Bacillus* spp. è un microorganismo aerobio con temperatura ottimale compresa tra i 28 e 37 °C. È degno di nota che i ceppi appartenenti al gruppo *B. cereus sensu stricto* producono tossine di tipo emetico e tossine di tipo diarroico (Osimani et al., 2018). Tuttavia, il rischio di produzione di tossine emetiche negli alimenti dipende dal carico di cellule vegetative del microorganismo target, che dovrebbe essere di almeno 10^5 ufc/g, mentre per produrre la sindrome diarroica, la carica di *B. cereus* dovrebbe superare 10^6 ufc/g (Food safety Authority of Ireland - FSAI); di conseguenza, la carica microbica finale rilevata nelle seguenti tesi sperimentali non costituisce un pericolo per la salute del consumatore.

CONCLUSIONI

I challenge test rappresentano validi metodi per lo studio del comportamento di microrganismi target nelle matrici alimentari. Tuttavia, questi metodi devono essere applicati secondo un approccio caso per caso che tenga conto delle caratteristiche specifiche dell'alimento oggetto dello studio. Pertanto, i risultati del presente lavoro di tesi devono essere valutati tenendo conto della presenza della polvere di insetto negli impasti che potrebbe aver modificato la reologia dei pani sperimentali e, con essa, l'interazione del microrganismo con la matrice alimentare.
Dall'analisi dei risultati è possibile concludere che, relativamente al pane in cassetta, la cottura è stata in grado di inattivare sia le cellule vegetative di *B. cereus* che le eventuali spore presenti. Tale risultato è stato verosimilmente ottenuto per via delle ridotte dimensioni dei pani che hanno consentito il raggiungimento di temperature e tempi di trattamento al cuore del prodotto idonei al suo risanamento microbiologico. Inoltre, non sono emerse differenze fra le cariche microbiche dei pani alle diverse condizioni di stoccaggio; pertanto appare verosimile che la cottura abbia eliminato in modo definitivo la presenza del patogeno artificialmente inoculato.
Relativamente ai pani (realizzati da un impasto di 600 g), è stata osservata una diversa evoluzione delle cariche microbiche. In particolare, i pani conservati in presenza di ossigeno e a temperatura ambiente hanno mostrato lo sviluppo di *B. cereus* nel prodotto dopo 2 settimane di conservazione. Inoltre, i pani conservati in presenza di ossigeno e mantenuti a 30°C hanno evidenziato la presenza del patogeno già dopo una settimana di conservazione. Tali evidenze fanno supporre che in questo tipo di pani la cottura non sia stata in grado di eliminare completamente le spore del patogeno e che, queste ultime, trovando le condizioni di sviluppo ideali (T ambiente e 30°C) abbiano originato cellule vegetative. Appare importante sottolineare che nei pani realizzati da un impasto di 600 g, la temperatura e il tempo di cottura, sebbene sufficienti determinare la cottura dell'impasto, potrebbero non essere stati sufficienti a determinare il risanamento dell'impasto dal microrganismo target. Tali evidenze non sono

invece emerse nei pani conservati a temperatura di refrigerazione e in condizioni di assenza di ossigeno.

Si raccomanda quindi:

- produrre pani contenenti polvere di insetto realizzando piccole pezzature;
- qualora il peso dei pani contenenti polvere di insetto superi i 300 g, confezionare i prodotti sotto-vuoto e conservarli a temperatura di refrigerazione.

BIBLIOGRAFIA

Ahmad, B.S., Talou, T., Straumite, E., Sabovics, M., Kruma, Z. & Saad, Z., 2018. Protein bread fortification with cumin and caraway seeds and by-product flour. *Foods*, 7, 1–11.

ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety): Opinion on the use of insects as food and feed and the review of scientific knowledge on the health risks related to the consumption of insects. Available at: 2015 In: https://www. anses.fr/en/documents/BIORISK2014sa3EN.pdf

Barre, A., Caze-Subra, S., Gironde, C., Bienvenu, F., Bienvenu, J. & Rougé, P., 2014. Entomophagie et risque allergique. *Revue Française d'Allergologie,* 54, 315-321.

Bednářová, M., Borkovcová, M. & Komprda, T., 2014. Purine derivate content and amino acid profile in larval stages of three edible insects. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 94, 71-76.

Belluco, S., Losasso, C., Maggioletti, M., Alonzi, CC., Paoletti, MG. & Ricci, A., 2013. Edible insects in a food safety and nutritional perspective: A critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,* 12, 296-313.

Bhattacharyya, P., Jha, S., Mandal, P. & Ghosh, A., 2016. Artificial diet based silkworm rearing system-a review. *International Journal of Pure & Applied Bioscience,* 4, 114-122.

Biesta-Peters, E.G., Reij, M.W., Joosten, H., Gorris, L.G.M. & Zwietering, M.H., 2010. Comparison of two optical-density-based methods and a plate count method for estimation of

growth parameters of *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology,* 76, 1399–1405.

Borremans, A., Lenaerts, S., Crauwels, S., Lievens, B. & Van Campenhout, L., 2018. Marination and fermentation of yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). *Food Control*, 92, 47- 52.

Bukkens, S.G.F., 1997. The nutritional value of edible insects. *Ecology of Food Nutrition,* 36, 287-319.

Cardon D., 2003. Le monde des teintures naturelles. *Belin, Paris*, 586.

Chen, X., Feng, Y. & Chen, Z., 2009. Common edible insects and their utilization in China: invited review. *Entomological Research,* 39, 299-303.

Christie, G. & Setlow, P., 2020. Bacillus spore germination: knowns, unknowns and what we need to learn. *Cell Signal*, 74, 109729.

Clair, G., Esbelin, J., Malle´ a, S., Bornard, I. & Carlin, F., 2020. The spore coat is essential for Bacillus subtilis spore resistance to pulsed light, and pulsed light treatment eliminates some spore coat proteins. *International journal of food microbiology*, 323:108592.

Clmattson, 2003. Comprehensive reviews in food science and food safety. *Microbiological Challenge Testing*, 2, 3-109.

Commission Regulation (EC) No. 2073/2005 of the European Parliament and the Council of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union, Available online http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do? uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:EN:PDF

Commission Regulation (EC) No. 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union, Available online http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ: L:2007:322:0012:0029:EN:PDF

Deer, R.R. & Volpi, E., 2015. Protein Intake and Muscle Function in Older Adults. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 18, 248–253.

DeFoliart, G.R., 1991. Insect fatty acids: similar to those of poultry and fish in their degree of unsaturation, but higher in the polyunsaturates. *The Food Insect Newsletter* 4, 1-8.

DeFoliart, G.R., 1995. Edible insects as minilivestock. *Biodiversity and conservation,* 4, 306-321.

De Oliveira, L.M., Da Silva, Lucas. A.J., Lopes Cadaval, C. & Sallas Mellado, M., 2017. Bread enriched with flour from cinereous cockroach (Nauphoeta cinerea) *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 44, 30–35.

De Smet, J., Lenaerts, S., Borremans, A., Scholliers, J., Van Der Borght, M. & Van Campenhout L., 2019. Stability assessment and laboratory scale fermentation of pastes produced on a pilot scale from mealworms (Tenebrio molitor). *LWT*, 102, 113- 121.

De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H.M. & Weckx, S., 2014. Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? *Food Microbiology*, 37, 11–29.

Durst, P. & Shono, K., 2010. Edible forest insects: exploring new horizons and traditional practice. *Edible Forest Insect: Human Bite Back*, 1-4.

EFSA Scientific Committee: Scientific opinion on a risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. EFSA J 2015, 13:4257 http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4257 (60 pp.)

European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for protein. EFSA Journal. 2012; 10(2): 2557.

European Nutrition for Health Aliance. Malnutrition within an ageing population: a call for action. Report on the Inaugural Conference of the European Nutrition for Health Alliance, London, 14th September 2005.

Evelyn & V.M.S. Filipa., 2019. Heat assisted HPP for the inactivation of bacteria, moulds and yeasts spores in foods: Log reductions and mathematical models. *Trends Food Sci Technol*, 88, 143-156.

FAO (2009) How to feed the world in 2050? Food and Agriculture Organization of the United Nations(FAO),Rome.
http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050. pdf.

FASFC (Belgian Scientific Committee of the Federal Agency for the Safety of the Food Chain): Food safety aspects of insects intended for human consumption. Common advice of the Belgian Scientific Committee of the Federal Agency for the Safety of the Food Chain (FASFC) and of the Superior Health Council (SHC). Available at: 2014 In: http://www.afsca.be/scientificcommittee/opinions/2014/_documents/Advice14-2014_ENG_DOSSIER2014-04.pdf.

Fasolato, L., Cardazzo, B., Carraro, L., Fontana, F., Novelli, E. & Balzan, S., 2018. Edible processed insects from e-commerce: food safety with a focus on the *Bacillus cereus* group. *Food Microbiology*, 76, 296-303.

Food safety Authority of Ireland (FSAI): Microbial Fact Sheet Series, *Bacillus Cereus*, Issue No. 2. Food Safety Authority of Ireland, Abbey Court, Lower Abbey Street, Dublin 1, 2016. (Available online).

Franco-Miranda, H., Chel-Guerrero, L., Gallegos-Tintore´, S., Castellanos-Ruelas, A. & Betancur-Ancona, D., 2017. Physicochemical, rheological, bioactive and consumer acceptance analyses of concha-type Mexican sweet bread containing Lima bean or cowpea hydrolysates. *Food Science and Technology Brazilian*, 80, 250–256.

Garofalo, C., Milanović, V., Cardinali, F., Aquilanti, L., Clementi, F. & Osimani, A., 2019. Current knowledge on the microbiota of edible insects intended for human consumption: a state-of-the-art review. *Food Research International,* 125-108527.

Gonzalez, C.M., Garzón, R. & Rosell, C., 2019. Insects as ingredients for bakery goods. A comparison study of H. illucens, A. domestica and T. molitor flours. *Innovative Food Science & Emerging Technologies,* 51, 205-210.

Grabowski, N. T. & Klein, G., 2017. Bacteria encountered in raw insect, spider, scorpion, and centipede taxa including edible species, and their significance from the food hygiene point of view. *Trends in Food Science and Technology*, 63, 80–90.

Gracer, D., 2010. Forest insects as food: humans bite back. Proceedings of a workshop on Asia-Pacific resources and their potential for development, Chiang Mai, Thailand. *Filling the plates: serving insects to the public in the United States*, 1, 217-220.

Gonzalez, C.M., Garzón, R. & Rosell, C.M., 2018. Insects as ingredients for bakery goods. A comparison study of H. illucens, A. domestica and T. molitor flours. *Innovative Food Science & Emerging Technologies,* 51, 205-210.

Haldar, P., Das, A. & Gupta, R.K., 1999. A laboratory based study on farming of an Indian grasshopper Oxya fuscovittata Marschall Orthoptera: Acrididae. *Journal of Orthoptera Research*, 8, 93-97.

Höglund, E., Albinsson, B., Stuhr-Olsson, G., Signäs, M., Karlsson, C. & Rothenberg, E., 2017. Protein and energy enriched muffins designed for nutritional needs of older adults. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2, NFSIJ.MS.ID.555592.

Jang, S. & Kikuchi, Y., 2020. Impact of the insect gut microbiota on ecology, evolution, and industry. *Current Opinion in Insect Science*, 41, 33-39.

Jay, J.M., 1996. *Modern food microbiology 5th*, 13: 978-1-4615-7478-1.

Liu, Y., Du, J., Lai, Q., Zeng, R., Ye, D., Xu, J. & Shao, Z., 2017. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 2499-2508.

Kalyan Kumar, T.D., Murali, H.S. & Batra, H.V., 2010. Multiplex PCR assay for the detection of enterotoxic *Bacillus cereus* group strains and its application in food matrices. *Indian Journal of Microbiology,* 50, 165–171.

Kaur, P., 1986. Survival and growth of *Bacillus cereus* in bread. *The Journal of applied bacteriology,* 60, 513-6.

Kiuchi, M. & Tamaki, Y., 1990. Future of edible insects. *Farming Japan,* 24, 37-41.

Klunder, H.C., Wolkers-Rooijackers, J., Korpela, J.M. & Nout, M.J.R., 2012. Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food Control,* 26, 628-631.

Makkar, H.P.S., Tran, G., Heuzé, V. & Ankers, P., 2014. State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Animal Feed Science and Technology,* 197, 1-33.

Maoloni, A., Cardinali, F., Milanović, V., Garofalo, C., Osimani, A., Mozzon, M. & Aquilanti, L., 2022. Microbiological safety and stability of novel green sauces made with sea fennel (Crithmum maritimum L.). *Food Research International,* 157:111463.

Mignon, J., 2002. L'entomophagie : une question de culture ? *Tropicultura,* 20, 15-155.

Minervini, F., Lattanzi, A., De Angelis, M., Celano, G. & Gobbetti, M., 2015. House microbiotas as sources of lactic acid bacteria and yeasts in traditional Italian sourdoughs. *Food Microbiology*, 52, 66–76.

Müller, O. & Krawinkel, M., 2005. Malnutrition and health in developing countries. *Canadian medical association journal,* 173, 279–286.

Nakagaki, B.J. & Defoliart, G.R., 1991. Comparison of Diets for Mass-Rearing Acheta domesticus (Orthoptera: Gryllidae) as a Novelty Food, and Comparison of Food Conversion Efficiency with Values Reported for Livestock. *Journal of Economic Entomology,* 84, 891-896.

NVWA (Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority): Advisory report on the risks associated with the consumption of mass-reared insects. . Available at: 2014 In: http:// www.nvwa.nl/actueel/risicobeoordelingen/bestand/2207475/consumptie-gekweekte-insecten-advies-buro.

Oonincx, D., Van Itterbeeck, J., Heetkamp, M.J.W., Van den Brand, H., Van Loon, J.J. & Van Huis, A., 2010. An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. *PLoS ONE,* 5:14445.

Osimani, A., Aquilanti, L. & Clementi, F., 2018b. *Bacillus cereus* foodborne outbreaks in mass catering. *International Journal of Hospitality Management*, 72, 145-153.

Osimani, A. & Aquilanti, L., 2021. Spore-forming bacteria in insect-based foods. *Science Direct,* 37, 112-117.

Osimani, A., Milanovic, V., Cardinali, F., Roncolini, A., Garofalo, C., Clementi, F., Pasquini, M., Mozzon, M., Foligni, R., Raffaelli, N. & Zamporlini, F., 2018a. Bread enriched with cricket powder (Acheta domesticus): a technological, microbiological and nutritional evaluation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 48, 150-163.

Pawluk, A.M., Kim, D., Jin, Y.H., Jeong, K.C. & Mah, J.H., 2022. Biofilm-associated heat resistance of *Bacillus cereus* spores in vitro and in a food model, Cheonggukjang jjigae. *International Journal of Food Microbiology*, 363:109505.

Pennino, M., Dierenfeld, E.S. & Behler, J.L., 1991. Retinol, α-tocopherol and proximate nutrient composition of invertebrates used as feed. *International Zoo Yearbook,* 30, 143-149.

Pepe, O., Blaiotta, G., Moschetti, G., Greco, T. & Villani, F., 2003. Rope-producing strains of Bacillus spp. from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2321–2329.

Ramos-Elorduy, J., 1997. Insects: A sustainable source of food? *Ecology of Food Nutrition,* 36, 247-276.

Ramos-Elorduy, J., 2009, Anthropo-entomophagy: Cultures, evolution and sustainability. *Entomological Research,* 39, 271-288.

Raubenheimer, D. & Rothman, J.M., 2013. Nutritional ecology of entomophagy in humans and other primates. *Annual Journal of Entomology*, 58, 141-160.

Ritter, 2010. Insect and Cholesterol. *Food insects Newsl*, 3, 1-6.

Roncolini, A., Milanovic, V., Aquilanti, L., Cardinali, F., Garofalo, C., Sabbatini, R., Clementi, F., Belleggia, L., Pasquini, M. & Mozzon, M., 2020. Lesser mealworm (Alphitobius diaperinus) powder as a novel baking ingredient for manufacturing high-protein, mineraldense snacks. *Food Research International*, 131:109031.

Roncolini, A., Milanovic, V., Cardinali, F., Osimani, A., Garofalo, C., Sabbatini, R., Clementi, F., Pasquini, M., Mozzon, M. & Foligni, R., 2019. Protein fortification with mealworm (Tenebrio molitor L.) powder: effect on textural, microbiological, nutritional and sensory features of bread. *PLoS One*, 14:0211747.

Rosenkvist, H. & Hansen, Å., 1998. The antimicrobial effect of organic acids, sour dough and nisin against Bacillus subtilis and B. licheniformis isolated from wheat bread. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 621–631.

Rumpold, B.A., Fröhling, A., Reineke, K., Knorr, D., Boguslawski, S., Ehlbeck, J. & Schlüter, O.K., 2014. Comparison of volumetric and surface decontamination techniques for innovative processing of mealworm larvae (Tenebrio molitor). Innovative Food Science & Emerging Technologies, 26, 232-241.

Rumpold, B.A. & Schlüter, O.K., 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57, 802-823.

Rumpold, B.A. & Schlüter, O.K., 2013a. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57, 802-23.

Rumpold, B.A. & Schlüter, O.K., 2013b. Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies,* 17, 1-11.

Schabel, H.G., 2010. Forest insects as food: a global review. *Edible Forest Insect: Humans Bite Back*, 37-64.

Schmidt, J.O. & Buchmann, S.L., 1992. Other products of the hive. The hive and the honey be. *Advances in Entomology,* 9, 927-988.

Shinde, A.A., Shaikh, F.K., Padul, M.V. & Kachole, M.S., 2012. Bacillus subtillis RTSBA6 6.00, a new strain isolated from gut of Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) produces chymotrypsin like proteases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19, 317-323.

Sirimungkararat, S., Saksirirat, W., Nopparat, T. & Natongkham, A., 2008. Edible products from eri silkworm (Samia ricini D.) and mulberry silkworm (Bombyx mori L.) in Thailand. *RAP Publication,* 16, 189–200.

Song, X., Perez-Cueto, F.J.A. & Bredie, W.L.P., 2018. Sensory-driven development of protein-enriched rye bread and cream cheese for the nutritional demands of older adults. *Nutrients*, 10:1006.

Srivastava, S.K., Babu, N. & Pandey. H., 2009. Traditional insect bioprospecting - As human food and medicine. *Indian Journal of Traditional Knowledge,* 8, 485-494.

Stoops, J., Vandeweyer, D., Crauwels, S., Verreth, C., Boeckx, H., Van Der Borght, M., Claes, J., Lievens, B. & Van Campenhout, L., 2017. Minced meat-like products from mealworm larvae (Tenebrio molitor and Alphitobius diaperinus): microbial dynamics during production and storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 41, 1-9.

Sudarshan, K.A., Carter-House, D., Stajich, J.E. & Dillman, A.R., 2017. Microbial associates of the southern mole cricket (Scapteriscus borellii) are highly pathogenic. *Journal of Invertebrate Pathology*, 150, 54-62.

Vandeweyer, D., Lenaerts, S., Callens, A. & Van Campenhout, L., 2017. Effect of blanching followed by refrigerated storage or industrial microwave drying on the microbial load of yellow mealworm larvae (Tenebrio molitor). *Food Control*, 71, 311-314.

Van Huis, A., 2013. Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Health*, 58, 563-583.

Van Huis. A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A. & Vantomme, P., 2013. Edible Insects: Future Prospects for Food and Feed Security. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 187.

Verkerk, M.C., Tramper, J., Van Trijp, J.C.M. & Martens, D.E., 2007. Insect cells for human food. *Biotechnology Advances,* 25, 198-202.

Vestergaard, E.M., 2001. Building product confidence with challenge studies. *Dairy Food Environ Sanit*, 21, 206-9.

Wyatt, C.J. & Guy, V.H., 1981. Incidence and growth of *Bacillus cereus* in retail pumpkin pies. *Journal of Food Protection*, 44, 422-4.

Xing, Y., Harper, W.F., 2020. Bacillus spore awakening: recent discoveries and technological developments. *Current Opinion in Biotechnology*, 64, 110-115.

Yi, L., Lakemond, C.M.M., Sagis, L.M.C., Eisner-Schadler, V., Van Huis, A. & Boekel, M.A.J.S.V., 2013. Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. *Food Chemistry,* 141, 3341-3348.

Zhou, J. & Han, D., 2006. Safety evaluation of protein of silkworm (Antheraea pernyi) pupae. *Food and Chemical Toxicology,* 44, 1123-1130.

RINGRAZIAMENTI

Arrivati alla fine di questo percorso, i ringraziamenti, oltre che un fatto dovuto diventano un piacere personale. Un sincero e doveroso ringraziamento ai miei genitori, ai miei nonni e a tutti i parenti per il costante supporto e sostegno in tutti questi anni. In particolare desidero ringraziare il mio relatore Prof. Andrea Osimani, per il materiale fornito, l'aiuto, la collaborazione nell'elaborazione del presente lavoro e per la costante disponibilità. Ringrazio inoltre la dott.ssa Cristiana Cesaro, mia correlatrice, per l'aiuto e la disponibilità dimostrata durante tutto il progetto di tesi. Infine, voglio ringraziare me stesso, perché grazie alla costanza e all'impegno sono riuscito a raggiungere tutti gli obiettivi che mi sono prefissato fino a questo momento.