

Presenza di funghi micotossigeni e gestione del rischio di contaminazione da micotossine nella frutta secca

Davide Spadaro^{*,**} - Simona Prencipe^{*,**} - Silvia Valente^{*,**} - Edoardo Piombo^{*,**} - Angelo Garibaldi^{**} - Maria Lodovica Gullino^{*,**}

^{*}Centro di Competenza per l'Innovazione in Campo agro-ambientale (Agroinnova) – Università degli Studi di Torino – Grugliasco (TO)

^{**}Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari (DiSAFA) – Università degli Studi di Torino – Grugliasco (TO)

Riassunto

Il microbiota fungino presente sulla frutta secca è principalmente rappresentato dai generi *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Molte delle specie appartenenti a questi generi sono riconosciute come produttrici di micotossine. Il microbiota di castagne e nocciole è principalmente rappresentato da specie appartenenti al genere *Aspergillus* sezione *Flavi* e al genere *Penicillium*. Tra le specie appartenenti alla sezione *Flavi*, le più importanti specie aflatossigene sono *A. flavus* e *A. parasiticus*. L'isolamento di un elevato numero di specie potenzialmente produttrici di micotossine dalla frutta secca evidenzia la necessità di mettere a punto procedure per il contenimento della crescita fungina e della contaminazione da micotossine. Le informazioni sulle specie di *Aspergillus* e di *Penicillium* isolate e sulle micotossine da esse prodotte sono utili ai principali attori della filiera corilicola e castanicola per sviluppare procedure da applicare sia in campo sia durante la fase di produzione e conservazione, con il fine di ottenere prodotti sani e privi di micotossine.

Parole chiave: aflatossine; *Aspergillus* spp.; *Castanea sativa*; farina di castagne; ocratossina A; *Penicillium* spp.

Summary

Occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxin risk management in nuts

The main fungal genera present in the microbiota of nuts are *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium*. Several species of these three genera are mycotoxigenic. The microbiota of chestnuts and hazelnuts is mainly represented by *Aspergillus* section *Flavi* and *Penicillium* spp.. The main aflatoxigenic species of *Aspergillus* section *Flavi* are *A. flavus* and *A. parasiticus*. The isolation of a high number of mycotoxigenic species points out the need to implement the procedures for the control of the fungal growth and mycotoxin contamination. The information gained about the species of *Aspergillus* and *Penicillium* and the isolated mycotoxins are useful for the main stakeholders of the hazelnut and chestnut production chains to develop appropriate practice for the field and the storage phases, useful to obtain healthy and safe food products.

Key words: *aflatoxins*; *Aspergillus* spp.; *Castanea sativa*; *chestnut flour*; *ochratoxin A*; *Penicillium* spp.

Introduzione

La frutta secca di maggiore rilevanza commerciale è costituita da nocciole (*Corylus avellana*), noci (*Juglans regia*), pistacchi (*Pistacia vera*), castagne (*Castanea sativa*), arachidi (*Arachis hypogea*), pinoli (*Pinus pinea*), anacardi (*Anacardium occidentale*) e mandorle (*Prunus amygdalis*) (Ros, 2010). La maggior parte del consumo è costituito da prodotti freschi o tostati, ma anche da derivati quali olii, ingredienti per la preparazione di salse o creme spalmabili.

I benefici per la salute umana legati all'assunzione di frutta secca sono stati ampiamente dimostrati, e l'introduzione di tali prodotti nelle recenti linee guida per una sana alimentazione ha determinato un aumento della domanda (Alasalvar e Shahidi, 2008). Secondo quanto riportato dallo studio di Nielsen (2017) negli ultimi anni si è registrato un progressivo aumento della vendita di frutta secca in Italia con un indotto complessivo di 890 milioni di euro. L'Italia è il secondo produttore europeo di castagne, con 43.000 t/annue, e il secondo produttore mondiale di nocciole, dopo la Turchia, con 75.456 t/annue. La produzione di mandorle, noci e pistacchi è di 74.016 t, 12.344 t e 3.555 t, rispettivamente (FAOSTAT, 2014).

Aspetti nutrizionali delle castagne e delle nocciole

Le castagne hanno interessanti caratteristiche nutrizionali in quanto sono ricche in carboidrati (circa il 40%), vitamine e fibre, e risultano avere bassi livelli di grassi (circa lo 0.5-5%) e di proteine (2-4%) (Migueluez *et al.*, 2004; Borges *et al.*, 2008; Peña-Méndez *et al.*, 2008; Üstün *et al.*, 2009). Sono, inoltre, un'importante fonte di acidi grassi essenziali (Barreira *et al.*, 2009).

Le nocciole, al contrario, sono meno ricche in carboidrati (10-22%) e più ricche in proteine (11-17%) rispetto alle castagne (Köksal *et al.*, 2006; Özdemir e Devres, 1999; Özilgen e Özdemir, 2001). La maggiore componente delle nocciole è invece quella lipidica, che rappresenta tra il 55% e il 70% del peso secco. Le nocciole sono ricche in particolare di acidi grassi mono- e polinsaturi, specialmente acido oleico e linoleico, e sono povere di acidi grassi saturi (Botta *et al.*, 1994; Özdemir e Devres, 1999; Özilgen e Özdemir, 2001). Queste caratteristiche, oltre alla ricchezza in fibre, minerali e vitamine, in particolare B1, B6, niacina e vitamina E, rendono la nocciola un alimento altamente nutritivo e salutare, che influenza positivamente i livelli di colesterolo nel sangue (Kabak *et al.*, 2016; Köksal *et al.*, 2006; Özilgen e Özdemir, 2001).

Il microbiota della frutta secca

Il microbiota fungino presente sulla frutta secca è principalmente rappresentato dai generi *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Molte delle specie appartenenti a questi generi sono riconosciute come produttrici di micotossine e la presenza di colture contaminate fa sì che siano presenti in diverse matrici alimentari, quali la frutta secca, i cereali o alimenti destinati al consumo animale. Generalmente il genere *Fusarium* è maggiormente presente in campo mentre i generi *Aspergillus* e *Penicillium* sono riscontrabili prevalentemente nelle fasi

post-raccolta (Rodrigues *et al.*, 2012).

Uno dei parametri principali legati alla crescita fungina è rappresentato dall'attività dell'acqua (a_w). Le specie appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium* sono in grado di crescere a valori di a_w bassi, compresi tra 0,75-0,85, e il loro valore ottimale di crescita è compreso tra 0,93 e 0,98, mentre le specie di *Fusarium* necessitano di una a_w maggiore di 0,85, con un valore ottimale di 0,99. Il microbiota di mandorle e castagne è principalmente rappresentato da specie appartenenti al genere *Aspergillus* sezione *Flavi* e al genere *Penicillium*, sia in campo sia in conservazione (Rodrigues *et al.*, 2012). Tra le specie appartenenti a questa sezione, le più importanti sono *A. flavus* e *A. parasiticus*. La presenza di tali specie è stata largamente documentata anche su arachidi, noci, pistacchi e nocciole.

Le contaminazioni da *Aspergillus flavus*

Tra le principali problematiche legate alla conservazione di frutta secca vi è lo sviluppo fungino e la possibile contaminazione da micotossine. Tale contaminazione parte dal campo ed arriva sino in conservazione, per poi estendersi al prodotto finale. La presenza sinergica di fattori fisici, chimici e biologici favorisce la colonizzazione fungina e/o la produzione di micotossine. In campo danni meccanici da insetti o eventi atmosferici, quali forti piogge e gelate, possono favorire la contaminazione fungina. Le elevate precipitazioni nel periodo di raccolta favoriscono una maggiore incidenza di *A. flavus* in campo (Prencipe *et al.*, 2018a). Secondo gli studi di Abrar *et al.* (2012) e Abdel Gawad e Zhori (1993), condizioni favorevoli allo sviluppo fungino possono verificarsi anche durante le fasi di conservazione, lavaggio ed essiccazione. Particolare attenzione va mostrata anche in conservazione, monitorando temperatura, umidità relativa, ventilazione e tempi di permanenza in magazzino (Abdel Gawad e Zhori, 1993). Le condizioni ottimali di crescita fungina non coincidono però con quelle per la produzione di metaboliti secondari tossici, quali le micotossine: secondo quanto riportato in letteratura la temperatura ottimale per la crescita di *A. flavus* è compresa tra i 30-33°C, mentre la produzione di aflatossine è bloccata al di sopra dei 42°C. Come dimostrato dagli studi di Trenk e Harman (1970) e Liu *et al.* (2017), i valori ottimali per la produzione di aflatossine variano in funzione dell'ospite.

Tossicità e limiti per le aflatossine

Secondo l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC), le aflatossine sono classificate come "cancerogene per l'uomo" (gruppo 1). Il Regolamento (UE) 165/2010 stabilisce i tenori massimi di aflatossine nei prodotti alimentari con riferimento alla sola presenza della aflatossina B1 o alla presenza delle aflatossine totali (B1, B2, G1 e G2). I tenori massimi consentiti variano tra 2 e 10 µg/kg, in funzione della matrice, per categorie di prodotti destinati al consumo diretto, mentre vanno da 5 µg/kg a 15 µg/kg per i prodotti che devono essere sottoposti a cernita o trattamenti fisici. Arachidi, pistacchi, noci e nocciole del Brasile hanno livelli massimi fissati specifici per matrice, mentre per le castagne i tenori massimi sono inclusi nella categoria "frutta a guscio, diversa dalla frutta a guscio precedentemente elencata".

Presenza di *Aspergillus* sezione *Flavi* su castagne

In letteratura, gli studi su castagna hanno riguardato principalmente i prodotti commerciali, ma non hanno approfondito la presenza delle specie di *Aspergillus* e il loro potenziale aflatossigeno alla raccolta e lungo la filiera di produzione (Wells e Payne, 1975; Rodrigues *et al.*, 2013). Le specie principalmente presenti appartengono al genere *Aspergillus* sezione *Flavi* (Abdel-Gawad e Zohri, 1993; Overly *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2013). I processi di cernita e tostatura sono critici nel ridurre la presenza di *Aspergillus* sezione *Flavi* (FAO/WHO, 2012), ma le pratiche attuali sembrano non essere in grado di eliminare le specie potenzialmente aflatossigene e la produzione di aflatossine. Secondo quanto riportato da Bertuzzi e collaboratori (2015), l'elevata presenza di aflatossine nella farina di castagne può essere correlata alla contaminazione post-raccolta o durante le fasi di produzione della castagna.

In un recente studio (Prencipe *et al.*, 2018a), sono state isolate specie potenzialmente aflatossigene da ogni fase della filiera di produzione e da campioni alla raccolta. L'incidenza di *Aspergillus* sezione *Flavi* alla raccolta è stata del 53%, probabilmente favorita dall'elevata umidità registrata durante questa fase (CAST, 2003). Sono stati caratterizzati tramite saggi biologici, molecolari e chimici 58 isolati di *Aspergillus* sezione *Flavi*, provenienti dal frutteto, dalle fasi di lavorazione delle castagne e da farine di castagna commerciali.

Un approccio multidisciplinare risulta necessario per evitare l'erronea identificazione degli isolati, e ciò richiede un'analisi morfologica, un approccio di sequenziamento multi-locus e l'analisi della produzione di aflatossine (Rodrigues *et al.*, 2009, 2011; Samson *et al.*, 2014).

I risultati ottenuti tramite il sequenziamento del gene della beta-tubulina e del gene della calmodulina, hanno permesso di identificare correttamente i ceppi. L'analisi del gene della calmodulina ha prodotto risultati validi, raggruppando le specie in cluster distinti basandosi sulla presenza di siti polimorfici conservati, così come dimostrato dallo studio di Gallo e collaboratori (2012). *A. flavus* è risultata la specie dominante, seguita da *A. oryzae* var *effusus*, *A. tamarii*, *A. parasiticus* e *A. toxicarius*. L'analisi filogenetica ha inoltre evidenziato la presenza di una elevata variabilità intraspecifica, come osservato dagli studi di Pildain *et al.* (2004) e Vaamonde *et al.* (2003). Tale variabilità è stata anche osservata tramite analisi macromorfologica sui terreni CYA, YES e MEA.

La produzione di aflatossine è stata verificata *in vitro*, dove la percentuale di ceppi aflatossigeni è risultata del 19%. Poiché i saggi *in vitro* spesso sottostimano il numero di ceppi in grado di produrre aflatossine (Probst e Cotty, 2012), sono stati svolti anche saggi *in vivo*, in cui il 40% dei ceppi è risultato essere produttore. Il saggio di patogenicità ha evidenziato la presenza di soli due ceppi non patogeni su castagna, con una prevalenza di ceppi altamente o mediamente virulenti.

La presenza di ceppi di *Aspergillus* sezione *Flavi* aflatossigeni, isolati dal campo e lungo tutte le fasi di produzione della castagna, evidenziano la necessità di implementare le tecniche di conservazione, concentrandosi su temperatura, umidità ed essiccazione

per ridurre la crescita di queste specie e la possibile contaminazione da aflatoSSine.

Presenza di *Aspergillus* sezione *Flavi* su nocciole

Sebbene il guscio delle nocciole costituisca una buona barriera contro le contaminazioni fungine, è riportata in letteratura la presenza di *A. flavus* e *A. parasiticus* in questa matrice (Şimşek *et al.*, 2002; Gürses, 2006; Ozay *et al.*, 2008) e di conseguenza di aflatoSSine nei prodotti finali (Aycicek *et al.*, 2005; Gürses, 2006; Baltaci *et al.*, 2012; Prella *et al.*, 2012; Golge *et al.*, 2016; Kabak, 2016). I funghi aflatoSSigeni possono contaminare le nocciole sia in campo sia in post-raccolta, ed è maggiore l'incidenza di *A. flavus* rispetto a *A. parasiticus*, probabilmente grazie alla capacità di adattarsi anche alle parti aeree della pianta oltre che al suolo (EFSA, 2007).

La contaminazione e la produzione di aflatoSSine dipendono da numerosi fattori fra cui la presenza di danni da insetti, dalla composizione del substrato, dalla temperatura e dall'umidità, dai metodi di raccolta, di lavorazione e dai tempi e dalle condizioni di conservazione (Özdemir e Devres, 1999; Fontana *et al.*, 2012).

In un recente lavoro svolto su nocciole italiane e turche, dalle nocciole sane è stato possibile isolare alcuni ceppi fungini, fra cui due isolati di *A. flavus*, ma la carica fungina è risultata inferiore al limite di rilevabilità. Nelle nocciole essiccate sono state isolate numerose specie fungine fra cui circa il 20-25% di *Aspergillus* spp., corrispondenti ad una carica fungina tra 2,3 e 3,8x10² ufc per grammo di nocciole. Sono stati isolati 40 ceppi di *Aspergillus* spp., di cui 13 appartenenti alla specie *A. flavus* e 6 alla specie *A. parasiticus*.

La maggior parte degli *Aspergillus* sezione *Flavi* sono stati isolati da nocciole sane ed essiccate, inoltre tutti gli isolati di *A. parasiticus* sono stati isolati da nocciole provenienti dalla Turchia, probabilmente a causa delle diverse condizioni climatiche presenti che favoriscono maggiormente lo sviluppo di questa specie fungina.

La percentuale di ceppi aflatoSSigeni può essere molto variabile, ad esempio è risultata compresa fra il 4% e il 48% in uno studio di tre anni svolto su nocciole turche (Ozay *et al.*, 2008). Quasi tutti gli isolati di *A. parasiticus* sono forti produttori di aflatoSSine, mentre solamente il 40-50% degli isolati di *A. flavus* è aflatoSSigeno (Schmidt-Heydt *et al.*, 2010; Kabak, 2016).

Il potenziale aflatoSSigeno dei ceppi fungini isolati in questo studio è stato valutato utilizzando Yeast Extract Sucrose (YES)-broth (Prencipe *et al.*, 2018a). In particolare, i funghi sono stati incubati al buio a 35°C per 7 giorni ed è stata valutata la presenza di aflatoSSine nel terreno liquido, mediante analisi cromatografica. Dei 19 ceppi isolati, sei, di cui 4 di *A. parasiticus* e 2 di *A. flavus*, sono risultati produttori di aflatoSSine *in vitro*.

Dallo studio svolto è emersa la presenza di specie potenzialmente aflatoSSigene su nocciole fresche ed essiccate provenienti da Italia e Turchia. È quindi opportuno valutare e migliorare le strategie di essiccazione e conservazione delle nocciole, per limitarne la presenza e garantire l'assenza di aflatoSSine nel prodotto finale.

Prevenzione della contaminazione da aflatoSSine

La FAO e l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) hanno elaborato un Codice di Buona Pratica, il "Codex

Alimentarius" valido per tutta la frutta secca di interesse commerciale, per uniformare le pratiche di gestione e controllo da micotossine, con lo scopo di proteggere la salute dei consumatori e assicurare la correttezza degli scambi internazionali (FAO, 2004). La prevenzione da contaminazione fungina parte dalla raccolta, che dovrebbe essere manuale in modo da ridurre i danni meccanici ed evitare il contatto con il terreno. Secondo quanto riportato da Rachaputi *et al.* (2002) è stata ritrovata una correlazione positiva tra la raccolta anticipata e una minore presenza di aflatoSSine. In campo, inoltre, l'impiego di agrofarmaci permette una riduzione delle infezioni fungine, con una conseguente possibile ridotta contaminazione da micotossine. L'uso di agenti di lotta biologica atti a contenere la crescita fungina ha risvolti positivi anche sulla riduzione della contaminazione da aflatoSSine lungo la filiera produttiva (Dorner & Cole, 2001; Atehnkeng *et al.*, 2014).

Effetto dell'essiccazione sulle castagne

A causa della naturale composizione delle castagne, e in particolare del loro elevato contenuto in acqua e in zuccheri, questi frutti sono particolarmente suscettibili all'attacco di specie fungine micotossigene (Overy *et al.*, 2003; Attanasio *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2012) e il loro tempo di conservazione in post-raccolta risulta limitato. Pertanto, sono state studiate tecnologie per aumentare la conservazione della castagna, preservandone però la composizione chimica (Moreira *et al.*, 2011; Nazzaro *et al.*, 2011). L'essiccazione è una pratica comunemente utilizzata per limitare e prevenire lo sviluppo fungino (Jermini *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2012). Uno dei principali problemi legati alla conservazione delle castagne è rappresentato dalla presenza di aflatoSSine: alcuni studi hanno evidenziato un'elevata incidenza di campioni contaminati di farina di castagne e castagne secche e fresche, con valori che arrivano anche al 92% (Pietri *et al.*, 2012; Bertuzzi *et al.*, 2015). Questo scenario sottolinea quindi i problemi legati alle produzioni a base di castagna, ed evidenzia la necessità di ridurre la probabilità di crescita di funghi aflatoSSigeni per ottenere prodotti privi di aflatoSSine.

Ad oggi, molti studi sono stati effettuati considerando l'influenza di parametri ambientali sulla crescita di *A. flavus* e sulla produzione di aflatoSSine in diverse matrici (Marin *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2017), ma nessuno è stato focalizzato sull'effetto di diverse temperature di essiccazione sulla crescita fungina e sulla produzione delle micotossine, verificando le conseguenze di tali temperature sulla qualità della castagna. Considerando quindi la possibile contaminazione delle castagne da aflatoSSine, un recente studio presenta l'effetto di diverse temperature di essiccazione (30, 35, 40, 45 e 50°C) sulla crescita di *A. flavus*, sulla produzione di aflatoSSine e sulla composizione chimica delle castagne (Prencipe *et al.*, 2018b).

I dati ottenuti hanno mostrato una maggiore concentrazione di *A. flavus* per i trattamenti a 30°C e 35°C, mentre nessuna crescita è stata riportata per i campioni trattati a 45°C o 50°C, confermando quanto riportato in letteratura per le temperature ottimali di crescita e la temperatura massima tollerata da questo micete (Pitt e Hocking, 1997).

La concentrazione di aflatossine è risultata maggiore nelle tesi trattate a 40°C, dove si è registrata anche una minore crescita di *A. flavus*, e questi dati sono simili a quanto riportato di Lahouar *et al.* (2016) su sorgo. Lo studio di Marin *et al.* (2012), utilizzando modelli predittivi su pistacchio, ha evidenziato lo stesso andamento, con un aumento della concentrazione di aflatossine al crescere della temperatura, ma un arresto della produzione a temperature superiori ai 40°C.

L'applicazione dei trattamenti termici sulla qualità delle castagne determina alcuni cambiamenti nella loro composizione chimica. In generale si osserva una riduzione dell'umidità, che passa dal 45% al 9%, ed un conseguente aumento nel contenuto di carboidrati e grassi.

Sono stati inoltre valutati il contenuto fenolico totale e la capacità antiossidante, valori che in letteratura sono principalmente riportati per le castagne fresche, mentre solo alcuni studi si riferiscono a castagne cotte o soggette ad essiccazione (Zhu, 2011). Il contenuto fenolico aumenta con l'aumentare delle temperature applicate, mentre l'attività antiossidante si riduce all'aumentare delle temperature. Questi risultati sono simili a quanto riportato in letteratura per castagne bollite o tostate (Barros *et al.*, 2011; Nazzaro *et al.*, 2011).

Nei mulini commerciali le castagne fresche vengono essiccate e successivamente sottoposte a diversi processi, tra cui cernita, tostatura, granulatura, macinatura e conservazione (Prencipe *et al.*, 2018a). Attualmente il prodotto è essiccato a 30°C per 3-5 giorni fino a raggiungere il 10% di umidità, ma i risultati da noi ottenuti evidenziano che queste condizioni dovrebbero essere modificate aumentando la temperatura a 45°C, in modo da contenere la crescita fungina e la produzione di aflatossine.

Effetto dell'essiccazione sulle nocciole

Le nocciole vengono essiccate dopo la raccolta per ridurre il contenuto di umidità del frutto, sfavorire la crescita dei ceppi fungini e aumentare la shelf-life delle nocciole. Il Regolamento europeo n. 1284 del 2002, stabilisce che il tenore di umidità delle nocciole non deve superare il 12% per il frutto intero e il 7% per il frutto sgusciato.

Le nocciole vengono convenzionalmente essiccate al sole, per un periodo di tempo fra i 4 giorni e le 2-3 settimane durante i periodi di pioggia (Baltaci *et al.*, 2012). Tempi molto prolungati possono favorire lo sviluppo di muffe, che possono rimanere latenti e svilupparsi in conservazione. L'essiccazione al sole è la tecnica più utilizzata in Turchia, dove le nocciole vengono poi conservate a temperatura ambiente fino a un anno (Turan, 2018).

L'utilizzo di essiccatori è preferibile, in quanto l'abbassamento dell'umidità del prodotto avviene in tempi molto più rapidi e in generale aumenta la sicurezza del prodotto finale (Ozay *et al.*, 2008).

Molti studi sono stati svolti per valutare l'influenza dei parametri di essiccazione sulla qualità delle nocciole, ed in particolare sulle proprietà nutrizionali della nocciole, come l'ossidazione dei lipidi, il profilo degli acidi grassi, l'attività enzimatica e l'imbrunimento del frutto (López *et al.*, 1997a,b,c; Özdemir e Devres, 1999; Turan, 2018),

mentre nel lavoro di Ozay e collaboratori (2008) è stato messo in luce come differenti metodologie di essiccazione possano risultare in una differente presenza di aflatossina nelle nocciole.

In un recente monitoraggio su nocciole essiccate in Italia, è stato possibile isolare numerose specie fungine, mentre pochi isolati sono stati ritrovati sui frutti freschi. Questi dati rafforzano la necessità di valutare un metodo di essiccazione efficace per garantire non solo la qualità nutrizionale delle nocciole, ma anche la riduzione della presenza di specie micotossigene e di micotossine nel prodotto.

Si è cercato pertanto di valutare l'effetto di diverse temperature di essiccazione sulla crescita di *A. flavus* e sulla produzione di aflatossine. Le nocciole fresche sono state inoculate con una sospensione di *A. flavus*, in grado di produrre aflatossine *in vivo* e *in vitro* (Prencipe *et al.*, 2018b) e sono state essiccate a 30°C, 40°C, 45°C e 50°C fino al raggiungimento del 6% di umidità relativa del frutto. Dopo 14 giorni di conservazione a temperatura ambiente, sono state valutate la crescita fungina e la produzione di aflatossine. Spore vitali di *A. flavus* sono state ritrovate su tutti i campioni di nocciole, tuttavia, all'aumentare della temperatura è stata osservata una diminuzione della carica fungina. Per quel che riguarda la produzione di aflatossine, *A. flavus* non è risultato in grado di produrre aflatossine a temperature di essiccazione di 45 e 50°C.

Sebbene il processo di essiccazione riduca il contenuto di umidità del frutto, sfavorendo la crescita dei ceppi fungini, i parametri di essiccazione, fra cui la temperatura e il tempo di essiccazione, influenzano significativamente la crescita fungina e la produzione di aflatossine. In particolare, temperature di essiccazione inferiori e conseguenti tempi più prolungati possono portare ad un maggiore sviluppo di *A. flavus* già presenti nelle nocciole e alla conseguente produzione di aflatossine.

Durante la conservazione inoltre, temperature non uniformi o una deumidificazione non efficiente in conservazione refrigerata, possono causare un rapido aumento dell'attività dell'acqua e una conseguente proliferazione dei funghi filamentosi (Özilgen e Özdemir, 2001; Fontana *et al.*, 2012). Le condizioni di conservazione, insieme a quelle di essiccazione, sono dunque essenziali per limitare lo sviluppo di funghi micotossigeni e l'eventuale produzione di micotossine.

Tostatura ed impiego del plasma a freddo per la detossificazione delle nocciole

La tostatura è uno dei principali metodi fisici impiegati per la detossificazione delle matrici alimentari, ma può provocare la degradazione, totale o parziale, di alcune sostanze nutritive (Park e Kim, 2006). Ad ogni modo, Siciliano *et al.* (2017) hanno dimostrato come l'utilizzo di un forno a infrarossi per la tostatura di nocciole trattate a 140°C sia in grado, con un tempo di esposizione di 40 minuti, di indurre una detossificazione per le quattro principali aflatossine senza indurre significativi cambiamenti nutrizionali.

Il plasma, il quarto stato della materia, è stato usato per la decontaminazione biologica di materiali sensibili alle alte temperature. La ionizzazione, provocata dalle collisioni di elettroni liberi e gas neutrali, rilascia specie chimiche reattive (ioni positivi, elettroni, fotoni,

atomi eccitati e radicali), che permettono di usare il plasma per la disinfezione di materiali (Laroussi, 1996), l'inattivazione di microrganismi (Fridman *et al.*, 2007; Selcuk *et al.*, 2008) e la riduzione di micotossine in diverse matrici alimentari (Siciliano *et al.*, 2016). Per queste applicazioni il plasma viene generato a freddo, a pressione atmosferica, una metodologia che ha il vantaggio di essere relativamente economica e di permettere la formazione di specie attive in grado di reagire con molte macromolecole contaminanti (Moreau *et al.*, 2008).

Il plasma a freddo è un metodo promettente in particolare per la decontaminazione da aflatossine sulle nocciole, specialmente se si considera il suo impatto minimo sulle caratteristiche organolettiche del prodotto. L'applicazione di questo metodo su nocciole sgusciate ha portato a una decontaminazione da aflatossine superiore al 70% (Siciliano *et al.*, 2016), senza incrementare in maniera significativa la temperatura della matrice alimentare.

***Penicillium* spp. e le relative micotossine sulle castagne**

La contaminazione da funghi del genere *Penicillium* su castagna è stata studiata alla raccolta, in conservazione e in campioni commerciali (Wells e Payne, 1975; Overy *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2013). Lo studio di Bertuzzi e colleghi (2015) riporta la contaminazione da alcune tossine di *Penicillium* in vari prodotti della filiera castanicola. Il genere *Penicillium* è ubiquitario, necessita di valori di a_w non minori di 0,78-0,80 ed è composto da specie in grado di sopravvivere sia a basse sia ad alte temperature, con una temperatura ottimale compresa tra 25-30°C (Gürses, 2006).

Differenti specie di *Penicillium* sono inoltre in grado di causare marciumi su frutti e agiscono come contaminanti in post-raccolta e negli ambienti di lavorazione (Washington *et al.*, 1997; Nielsen, 2003).

Recentemente, è stata investigata la presenza di specie di *Penicillium* alla raccolta, lungo la catena di produzione della castagna e nell'ambiente di produzione (Prencipe *et al.*, 2018c): 124 ceppi sono stati caratterizzati attraverso prove biologiche, molecolari e chimiche, concentrandosi sul potenziale micotossigeno e sulla patogenicità su castagna. L'identificazione è avvenuta tramite approccio multidisciplinare comprendente un'analisi di sequenze di più loci genici, l'analisi della produzione di micotossine e l'analisi macromorfologica, secondo quanto riportato da Visagie e colleghi (2014).

L'identificazione molecolare è stata ottenuta tramite amplificazione di tre regioni conservate. Attraverso l'amplificazione del gene per la beta-tubulina è stato possibile identificare 108 su 124 isolati. Per i 16 isolati la cui identificazione è rimasta ambigua, la specie è stata determinata tramite il sequenziamento del gene della calmodulina e l'analisi macromorfologica su tre diversi terreni. La filogenesi basata sulle sequenze concatenate delle tre regioni in esame ha evidenziato un'elevata variabilità intraspecifica per alcune delle specie, tra cui *P. bialowiezense*, *P. commune* e *P. glabrum*, come osservato dagli studi di Scott *et al.* (2008), Barreto *et al.* (2011), Houbraken *et al.* (2012) e Visagie *et al.* (2014). Sulla base dell'attuale tassonomia riportata in Houbraken e Samson (2011), Visagie *et al.* (2014) e Houbraken *et al.* (2016), sono state identificate 20

specie, che corrispondono parzialmente a quelle già riportate in letteratura (Donis-Gonzales *et al.*, 2016; Magan 2006; Overy *et al.*, 2003; Pietri *et al.*, 2012; Sieber *et al.*, 2007), con *P. crustosum*, *P. glabrum* e *P. bialowiezense* come specie predominanti (57% degli isolati). Altre specie rinvenute meno frequentemente in questo studio, ma isolate spesso da altre specie di frutta secca, sono *P. expansum*, *P. palitans*, *P. chrysogenum* e *P. discolor* (Mujica e Vergara, 1945; Frisvad e Samson, 2004; Donis-Gonzalez *et al.*, 2016).

Le specie *P. bialowiezense*, *P. brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. commune*, *P. glandicola*, *P. manginii*, *P. pancosmium*, *P. polonicum*, *P. solitum*, *P. viridicatum*, *P. verrucosum*, *P. nordicum* e *P. palitans* sono state segnalate per la prima volta come patogene su castagna. Il 70% dei ceppi analizzati si è mostrato virulento su castagna, inclusi i ceppi isolati dall'ambiente di produzione, con risultati simili a quanto precedentemente riportato dallo studio di Louw e Korsten (2014) su mele e pere. Le specie maggiormente virulente sono risultate *P. expansum* e *P. crustosum*, che sono riportati in letteratura come virulenti e in grado di adattarsi a diversi ambienti (Louw e Korsten 2014; Scholtz e Korsten, 2016).

Il potenziale micotossigeno di alcune delle specie isolate è stato indagato andando a variare alcuni parametri di crescita. In particolare, i ceppi selezionati sono stati fatti crescere in due terreni liquidi, CYA (Czapek Yeast Autolysate) e YES (Yeast Extract Sucrose), a 25°C e 55% di umidità relativa, con 12 ore di luce e di buio. Le micotossine sono state estratte sia dal micelio fungino sia dal terreno colturale a 3, 7, 10 e 14 giorni dopo l'inoculazione. La capacità degli isolati fungini selezionati di produrre patulina, ocratossina A, penitrem A, roquefortina C, meleagrina, glandicolina A e B, acido micofenolico, verrucosidina, andrastina A e acido penicillico *in vitro*, è stata verificata utilizzando cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata a un rivelatore di massa (HPLC-MS).

Dai risultati ottenuti è emerso che in CYA sono stati prodotti più metaboliti secondari, specialmente dopo 10 e 14 giorni dall'inoculazione. Dal micelio fungino inoltre sono state ritrovate un maggior numero e una maggiore quantità di micotossine rispetto a quelle presenti nel terreno di crescita.

Le analisi svolte *in vitro* hanno dunque confermato la capacità di alcuni isolati di *Penicillium* spp. di produrre micotossine e hanno permesso di valutare l'influenza del terreno di crescita, del metodo estrattivo e del tempo di incubazione.

È opportuno considerare che diversi fattori oltre all'umidità, alla luce e al terreno di crescita, possono influenzare la biosintesi dei metaboliti secondari, la quale spesso non viene attivata nelle normali condizioni di crescita *in vitro* (Brakhage, 2013).

Il 59% dei ceppi analizzati è stato in grado di produrre almeno una micotossina su castagna, ed, in totale, sono stati ritrovati 14 metaboliti secondari su castagne inoculate. Inoltre, in un ulteriore esperimento, in 24 campioni di castagne conservate per sei mesi è stata osservata la presenza di penitrem A, roquefortina C, patulina, andrastina A, ciclopenina, ciclopenolo e chetoglobosina A, confermando il potenziale rischio

di contaminazione per le castagne. Va sottolineato il fatto che nessuna di queste molecole è attualmente regolamentata dalla legislazione europea.

Anche le nocciole sono contaminate da *Penicillium* spp. produttori di micotossine

Le nocciole a partire dal campo fino alla conservazione possono essere soggette a diverse contaminazioni fungine. I generi fungini principalmente isolati dalle nocciole nelle diverse fasi produttive appartengono a *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus* (Özilgen e Özdemir, 2001; Özdemir e Devres, 2009). La letteratura si concentra sulla presenza di *A. flavus* e *A. parasiticus*, principali produttori di aflatossine. Tuttavia, molte altre specie appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium* sono in grado di produrre micotossine e sono stati ritrovati su frutta secca (Prencipe *et al.*, 2018a,b). Sulle nocciole *Penicillium* è uno dei generi fungini più presenti, infatti dal 93,3 % dei campioni di nocciole turche sono stati isolati funghi appartenenti a questo genere (Şimşek *et al.*, 2002).

Anche da nocciole turche ed italiane delle annate 2016 e 2017, sono stati ritrovati e identificati 65 isolati di *Penicillium* spp.. La maggior parte dei funghi sono stati isolati dalle nocciole essiccate, mentre solamente 7 isolati sono stati ottenuti dalle nocciole fresche. Il 28,6% dei funghi è stato ottenuto dalle nocciole sane, 36 isolati sono stati ottenuti dai campioni di nocciole con guscio e i restanti 14 ceppi erano presenti nelle nocciole ammuffite. La specie più abbondante è rappresentata da *P. crustosum*, potenziale produttore di numerose micotossine tra cui penitrem A, roquefortina C, andrastina A, meleagrina e altri metaboliti secondari tossici come ciclopenolo, ciclopenina, viridicatolo e viridicatina (Frisvad *et al.*, 2004; Bräse *et al.*, 2009). Fra le altre specie più abbondanti, sono state ritrovate *P. citrinum*, che può produrre *in vitro* e *in vivo* citrinina (Houbraken *et al.*, 2014), *P. brevicompactum*, noto produttore di acido micofenolico (Visagie *et al.*, 2014) e infine *P. viridicatum* potenziale produttore di ocratossina, acido penicillico e verrucosidina (Bräse *et al.*, 2009).

Il sequenziamento dei genomi e la ricerca di cluster genici per la biosintesi di micotossine in *Penicillium* spp.

Otto delle specie di *Penicillium* rinvenute in castagna sono state sequenziate: *P. bialowiezense*, *P. crustosum*, *P. discolor*, *P. glandicola*, *P. manginii*, *P. palitans*, *P. pancosmium* e *P. viridicatum*. Le specie considerate sono state sottoposte a sequenziamento *High Throughput* Illumina MySeq e assemblate con il programma SPAdes (Bankevich *et al.*, 2012), ottenendo genomi di dimensioni comprese tra 28,4 Mb (*P. glandicola*) e 36,8 Mb (*P. manginii*). Il numero di scaffold ottenuti è compreso tra 113 e 1219 per ogni specie, un numero adatto a condurre analisi di genomica comparativa. La predizione genica, eseguita con MAKER (Cantarel *et al.*, 2008), ha individuato, in ogni genoma, un numero compreso tra i 9090 e i 10583 geni. Nei funghi spesso i metaboliti secondari, micotossine incluse, sono sintetizzati da proteine codificate da geni posizionati uno vicino all'altro nei genomi, a formare unità note come "cluster genici". L'utilizzo del programma

"antiSMASH" (Weber *et al.*, 2015) ha permesso di predire tra i 110 e 149 cluster per ogni genoma, rivelando come queste specie siano potenzialmente in grado di produrre un altissimo numero di metaboliti, noti e non noti.

Dall'analisi dei metaboliti secondari prodotti dalle specie di *Penicillium* isolate da castagne, è stato possibile osservare la produzione di micotossine non caratteristiche delle specie in esame. In particolare, i ceppi di *P. crustosum*, *P. bialowiezense* e *P. manginii* hanno prodotto verrucosidina *in vitro*. La verrucosidina è una neurotossina isolata per la prima volta da *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* e di cui è nota la produzione da parte di alcune altre specie di *Penicillium* (Burka *et al.*, 1983; Frisvad *et al.*, 2004). Questa micotossina agisce a livello del sistema nervoso centrale causando disordini neurologici e tremori. Fra le micotossine tremorgeniche viene considerata la più citotossica e genotossica (Núñez *et al.*, 2000; Sabater-Vilar *et al.*, 2003).

Nonostante l'importanza della verrucosidina, il suo meccanismo di sintesi non è ancora noto. Alcuni studi hanno caratterizzato la biosintesi di composti simili, come citreoviridina e aurovertina, che condividono con la verrucosidina la struttura alfa-pirronica (Lin *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018). Poiché l'afla-pirrone è la prima parte della citreoviridina a essere sintetizzata, è probabile che questo avvenga anche per la verrucosidina e che quindi ci siano somiglianze nei primi geni coinvolti nella sintesi dei due metaboliti.

Partendo da queste informazioni, sono stati analizzati i genomi di *Penicillium* precedentemente ottenuti, alla ricerca dei cluster genici potenzialmente responsabili della biosintesi della verrucosidina. In particolare, sono stati analizzati e confrontati tutti i cluster genici, predetti con antiSMASH, comuni alle specie di cui è nota la capacità di produrre verrucosidina (*P. polonicum*, *P. aurantiogriseum* e *P. expansum*) e alle specie produttrici identificate in questo studio (*P. crustosum*, *P. bialowiezense* e *P. manginii*). L'analisi ha portato all'identificazione di due cluster genici putativi che dovranno essere verificati mediante caratterizzazione molecolare.

Conclusioni

L'isolamento di un elevato numero di specie potenzialmente produttrici di micotossine dalla frutta secca evidenzia la necessità di implementare procedure per il contenimento della crescita fungina e la conseguente riduzione del rischio di contaminazione da micotossine. Probabilmente l'ambiente ha favorito la crescita fungina, causando la possibile contaminazione lungo tutta la catena di produzione della castagna. Le informazioni sulle specie di *Aspergillus* e di *Penicillium* isolate, e le micotossine da esse prodotte, potrebbero essere utili ai produttori per sviluppare procedure da applicare sia in campo sia durante la fase di produzione e conservazione, con il fine di ottenere prodotti sani e privi di micotossine.

Ringraziamenti

Il presente lavoro è stato svolto con il contributo del progetto "FDM – Food Digital Monitoring", finanziato dalla Regione Piemonte.

Lavori citati:

- ABDEL-GAWAD K. M., ZOHRI A. A. (1993) - Fungal flora and mycotoxins of six kinds of nut seeds for human consumption in Saudi Arabia. *Mycopathologia*, 124, 55-64.
- ABRAR M., ANJUM F. M., BUTT M. S., PASHA I., RANDHAWA M. A., SAEED F., WAQAS K. (2012) - Aflatoxins: Biosynthesis, Occurrence, Toxicity, and Remedies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 862-874.
- ALASALVAR C., SHAHIDI F. (2008) - Tree Nuts: Composition, Phytochemicals, and Health Effects. CRC Press Taylor & Francis Group.
- ATEHNKENG J., OJIAMBO P. S., COTTY P. J., BANDYOPADHYAY R. (2014) - Field efficacy of a mixture of atoxigenic *Aspergillus flavus* Link:Fr vegetative compatibility groups in preventing aflatoxin contamination in maize (*Zea mays* L.). *Biological Control*, 72, 62-70.
- ATTANASIO G., CINQUANTA L., ALBANESE D., DI MATTEO M. (2004) Effects of drying temperatures on physico-chemical properties of dried and rehydrated chestnuts (*Castanea sativa*). *Food Chemistry*, 88, 583-590.
- AYCICEK H., AKSOY A., SAYGI S. (2005) - Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. *Food Control*, 16, 263-266.
- BALTACI C., ILYASOĞLU H., CAVRAR S. (2012) - Aflatoxin levels in raw and processed hazelnuts in Turkey. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 5, 83-86.
- BANKEVICH A., NURK S., ANTIPOV D., GUREVICH A. A., DVORKIN M., KULIKOV A. S., LESIN V. M., NIKOLENKO S. I., PHAM S., PRIBELSKI A. D., PYSHKIN A. V., SIROTKIN A. V., VYAHHI N., TESLER G., ALEKSEYEV M. A., PEVZNER P. A. (2012) - SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19, 455-477.
- BARREIRA J. C., CASAL S., FERREIRA I. C., OLIVEIRA M. B. P., PEREIRA J. A. (2009) - Nutritional, fatty acid and triacylglycerol profiles of *Castanea sativa* Mill. cultivars: a compositional and chemometric approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2836-2842.
- BARRETO M. C., HOUBRAKEN J., SAMSON R. A., FRISVAD J. C., SAN-ROMÃO M. V. (2011) - Taxonomic studies of the *Penicillium glabrum* complex and the description of a new species *P. subericola*. *Fungal Diversity*, 49, 23-33.
- BARROS A. I. R. N. A., NUNES F. M., GONÇALVES B., BENNETT R. N., SILVA A. P. (2011) - Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chemistry*, 128, 165-172.
- BERTUZZI T., RASTELLI S., PIETRI A. (2015) - *Aspergillus* and *Penicillium* toxins in chestnuts and derived produced in Italy. *Food Control*, 50, 876-880.
- BORGES O., GONÇALVES B., DE CARVALHO J. L. S., CORREIA P., SILVA A. P. (2008) - Nutritional quality of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars from Portugal. *Food Chemistry*, 106, 976-984.
- BOTTA R., GIANOTTI C., RICHARDSON D., SUWANAGUL A., SANZ, C. L. (1994) - Hazelnut variety organic acids sugars and total lipid fatty acids. *Acta Horticulturae*, 351, 693-699.
- BRÄKHAGE A. A. (2013) - Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 21-32.
- BRÄSE S., ENCINAS A., KECK J., NISING C. F. (2009) - Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chemical Reviews*, 109, 3903-3990.
- BURKA L. T., GANGULI M., WILSON B. J. (1983) - Verrucosidin, a Tremorgen from *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 9, 544-545.
- CANTAREL B. L., KORF I., ROBB S. M., PARRA G., ROSS E., MOORE B., HOLT C., SÁNCHEZ ALVARADO A., YANDELL M. (2008) - MAKER: an easy-to-use annotation pipeline designed for emerging model organism genomes. *Genome Research*, 18, 188-196.
- CAST (2003) - Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. Council for Agricultural Science and Technology, Iowa, USA. Printed in the United States of America. Task Force Report No. 139.
- CORREIA P., LEITÃO A., BEIRÃO-DA-COSTA M. L. (2009) - The effect of drying temperatures on morphological and chemical properties of dried chestnuts flours. *Journal of Food Engineering*, 90, 325-332.
- DONIS-GONZÁLEZ I. R., GUYER D. E., FULBRIGHT D. W. (2016) - Quantification and identification of microorganisms found on shell and kernel of fresh edible chestnuts in Michigan. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 4514-4522.
- DORNER J. W., COLE R. J. (2001) - Effect of application of nontoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on subsequent aflatoxin contamination of peanuts in storage. *Journal of Stored Products Reserch*, 38, 329-339.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2007) - Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *The EFSA Journal*, 446, 1-127.
- FAO (2004) - Proposed draft code of practice for the prevention and reduction of aflatoxin contamination in tree nuts.
- FAOSTAT (2014) - <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QC/E>.
- FONTANA M., SOMENZI M., TESIO A. (2012) - Cultivation, harvest and postharvest aspects that influence quality and organoleptic properties of hazelnut production and related final products. VIII International Congress on Hazelnut, 1052, 311-314.
- FRIDMAN G., BROOKS A. D., BALASUBRAMANIAN M., FRIDMAN A., GUTSOL A., VASILETS V. N., AYAN H., FRIEDMAN G. (2007) - Comparison of Direct and Indirect Effects of Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma on Bacteria. *Plasma Processes and Polymers*, 4, 370-37.
- FRISVAD J. C., SAMSON R. A. (2004) - Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49, 1-174.
- FRISVAD J. C., SMEDSGAARD J., LARSEN T. O., SAMSON R. A. (2004) - Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 49, 201-241.
- GALLO A., STEA G., BATTILANI P., LOGRIECO A. F., PERRONE G. (2012) - Molecular characterization of an *Aspergillus flavus* population isolated from maize during the first outbreak of aflatoxin contamination in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 51, 198-206.
- GOLGE O., HEPSAG F., KABAK B. (2016) - Determination of aflatoxins in walnut sujuk and Turkish delight by HPLC-FLD method. *Food Control*, 59, 731-736.
- GONÇALVES B., BORGES O., COSTA H. S., BENNETT R., SANTOS

- M., SILVA A. P. (2010) - Metabolite composition of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) upon cooking: proximate analysis, fibre, organic acids and phenolics. *Food Chemistry*, 122, 154-160.
- GÜRSERES M. (2006) - Mycoflora and aflatoxin content of hazelnuts, walnuts, peanuts, almonds and roasted chickpeas (LEBLEBI) sold in Turkey. *International Journal of Food Properties*, 9, 395-399.
- HELL K., CARDWELL K. F., SETAMOU M., POEHLING H. M. (2000) - The influence of storage practices on aflatoxin contamination in maize in four agroecological zones of Benin, West Africa. *Journal of Stored Product Research*, 36, 365-382.
- HOUBRAKEN J., FRISVAD J. C., SEIFERT K. A., OVERY D. P., TUTHILL D. M., VALDEZ J. G., SAMSON R. A. (2012) - New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section *Chrysogena*. *Persoonia*, 29, 78-100.
- HOUBRAKEN J., SAMSON R. A. (2011) - Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Study in Mycology*, 70, 1-51.
- HOUBRAKEN J., VISAGIE C. M., MEIJER M., FRISVAD J. C., BUSBY P. E., PITT J. I., SEIFERT K. A., LOUIS-SEIZE G., DEMIREL R., YILMAZ N., JACOBS K., CHRISTENSEN M., SAMSON R. A. (2014) - A taxonomic and phylogenetic revision of *Penicillium* section *Aspergilloides*. *Studies in Mycology*, 78, 373-451.
- HOUBRAKEN J., WANG L., LEE H. B., FRISVAD J. C. (2016) - New sections in *Penicillium* containing novel species producing patulin, pyripyropens or other bioactive compounds. *Persoonia* 36, 299-314.
- ISMAIEL A., PAPANBROCK J. (2015) - Mycotoxins: Producing Fungi and Mechanisms of Phytotoxicity. *Agriculture*, 5, 492-537.
- JERMINI M., CONEDERA M., SIEBER T. N., SASSELLA A., SCHÄRER H. (2006) - Influence of fruit treatments on perishability during cold storage of sweet chestnuts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 877-885.
- KABAK B. (2016) - Aflatoxins in hazelnuts and dried figs: Occurrence and exposure assessment. *Food Chemistry*, 211, 8-16.
- KÖKSAL A. I., ARTIK N., ŞİMŞEK A., GÜNEŞ N. (2006) - Nutrient composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties cultivated in Turkey. *Food Chemistry*, 99, 509-515.
- LAHOUAR A., MARIN S., CRESPO-SEMPERE A., SAID S., SANCHIS V. (2016) - Effects of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and aflatoxin B1 production by toxinogenic *Aspergillus flavus* isolates on sorghum seeds. *Revista Argentina de Microbiología*, 48, 78-85.
- LAROUSHI M. (1996) - Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 24, 128-135.
- LI W., MA Z., CHEN L., YIN W. B. (2018) - Synthesis and production of the antitumor polyketide aurovertins and structurally related compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 6373-6381.
- LIN T. S., CHIANG Y. M., WANG C. C. C. (2016) - Biosynthetic Pathway of the Reduced Polyketide Product Citreoviridin in *Aspergillus terreus* var. *aureus* Revealed by Heterologous Expression in *Aspergillus nidulans*. *Organic Letters*, 18, 1366-1369.
- LIU X., GUAN X., XING F., DAI X., LIU Y. (2017) - Effect of water activity and temperature on the growth of *Aspergillus flavus*, the expression of aflatoxin biosynthetic genes and aflatoxin production in shelled peanuts. *Food Control*, 82, 325-332.
- LÓPEZ A., PIQUÉ M. T., BOATELLA J., PARCERISA J., ROMERO A., FERRÁ A., GARCÍA J. (1997a) - Influence of Drying Conditions on the Hazelnut Quality. I. Lipid Oxidation. *Drying Technology*, 15, 965-977.
- LÓPEZ A., PIQUÉ M. T., FERRÁN A., ROMERO A., BOATELLA J., GARCÍA J. (1997b) - Influence of drying conditions on the hazelnut quality: II. Enzymatic activity. *Drying Technology*, 15, 979-988.
- LÓPEZ A., PIQUÉ M. T., BOATELLA J., PARCERISA J., ROMERO A., FERRÁ A., GARCÍA J. (1997c) - Influence of drying conditions on the hazelnut quality: III. Browning. *Drying Technology*, 15, 979-988.
- LOUW J. P., KORSTEN L. (2014) - Pathogenic *Penicillium* spp. on apples and pears. *Plant Disease*, 98, 590-598.
- MAGAN N. (2006) - Mycotoxin contamination of food in Europe: early detection and prevention strategies. *Mycopathologia*, 162, 245-253.
- MARIN S., RAMOS A. J., SANCHIS V. (2012) - Modelling *Aspergillus flavus* growth and aflatoxins production in pistachio nuts. *Food Microbiology*, 32, 378-388.
- MÍGUELEZ J. D. L. M., BERNARDEZ M. M., QUEIJEIRO J. G. (2004) - Composition of varieties of chestnuts from Galicia (Spain). *Food Chemistry*, 84, 401-404.
- MOREIRA R., CHENLO F., CHAGURI L., VÁZQUEZ G. (2011) - Air drying and colour characteristics of chestnuts pre-submitted to osmotic dehydration with sodium chloride. *Food Bioprocesses*, 89, 109-115.
- MOREAU M., ORANGE N., FEUILLOLEY M. G. J. (2008) - Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination. *Biotechnology Advances*, 26, 610-617.
- MUJICA F., VERGARA C. (1945) - Flora fungosa Chilena. Índice preliminar de los huespedes de los hongos chilenos y sus referencias bibliograficas. Imprenta Stanley, 199.
- NAZZARO M., BARBARISI C., LA CARA F., VOLPE M. G. (2011) - Chemical and biochemical characterisation of an IGP ecotype chestnut subjected to different treatments. *Food Chemistry*, 128, 930-936.
- NIELSEN K. F. (2003) - Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genetics and Biology*, 39, 103-117.
- NIELSEN (2017) - Sezione Osserva Italia di Repubblica. www.repubblica.it/economia/rapporti/osserva-italia/.
- NÚÑEZ F., DÍAZ M. C., RODRÍGUEZ M., ARANDA E., MARTÍN A., ASENSIO M. A. (2000) - Effects of substrate, water activity, and temperature on growth and verrucosidin production by *Penicillium polonicum* isolated from dry-cured ham. *Journal of food protection*, 63, 231-236.
- OVERY D. P., SEIFERT K. A., SAVARD M. E., FRISVAD J. C. (2003) - Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 69-77.
- OZAY G., SEYHAN F., PEMBECCI C., SAKLAR S., YILMAZ A. (2008) - Factors influencing fungal and aflatoxin levels in Turkish hazelnuts (*Corylus avellana* L.) during growth, harvest, drying and storage: A 3-year study. *Food Additives and Contaminants*, 25, 209-218.
- ÖZDEMİR M., DEVRES O. (1999) - Turkish hazelnuts: Properties and effect of microbiological and chemical changes on quality. *Food Reviews International*, 15, 309-333.
- ÖZILGEN M., ÖZDEMİR M. (2001) - A review on grain and nut deterioration and design of the dryers for safe storage with special reference to Turkish hazelnuts. *Critical reviews in*

- food science and nutrition, 41, 95-132.
- PARK J. W., KIM Y. B. (2006) - Effect of pressure cooking on aflatoxin B₁ in rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2431-2435.
- PEÑA-MÉNDEZ E. M., HERNÁNDEZ-SUÁREZ M., DÍAZ-ROMERO C., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ E. (2008) - Characterization of various chestnut cultivars by means of chemometrics approach. *Food Chemistry*, 107, 537-544
- PIETRI A., RASTELLI S., MULAZZI A., BERTUZZI T. (2012) - Aflatoxins and ochratoxin A in dried chestnuts and chestnut flour produced in Italy. *Food Control*, 25, 601-606.
- Pitt J. I., Hocking A. D. (1997) - *Fungi and Food Spoilage*, second ed. Blackie Academic and Professional, London.
- PRELLE A., SPADARO D., GARIBALDI A., GULLINO M. L. (2012) - Aflatoxin monitoring in Italian hazelnut products by LC-MS. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 5, 279-285.
- PRENCIPE S., SICILIANO I., CONTESSA C., BOTTA R., GARIBALDI A., GULLINO M. L., SPADARO D. (2018a) - Characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from fresh chestnuts and along the chestnut flour process. *Food Microbiology*, 69, 159-169.
- PRENCIPE S., SICILIANO I., GATTI I., GULLINO M. L., GARIBALDI A., SPADARO D. (2018b) - Chestnut drying is critical in determining *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin contamination. *Toxins*, 10, 530.
- PRENCIPE S., SICILIANO I., GATTI C., GARIBALDI A., GULLINO M. L., BOTTA R., SPADARO D. (2018c) - Several species of *Penicillium* isolated from chestnut flour processing are pathogenic on fresh chestnuts and produce mycotoxins. *Food Microbiology*, 76, 396-404.
- RACHAPUTI N. R., WRIGHT G. C., KROSCHI S. (2002) - Management practices to minimise pre-harvest aflatoxin contamination in Australian groundnuts. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 42, 595-605.
- RODRIGUES P., VENÂNCIO A., KOZAKIEWICZ S., LIMA N. (2009) - A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 187-193.
- RODRIGUES P., VENÂNCIO A., LIMA N. (2012) - Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts with special reference to aflatoxins. *Food Research International*, 48, 76-90.
- RODRIGUES P., VENÂNCIO A., LIMA N. (2013) - Incidence and diversity of the fungal genera *Aspergillus* and *Penicillium* in Portuguese almonds and chestnuts. *European Journal of Plant Pathology*, 137, 197-209.
- ROS E. (2010) - Health Benefits of Nuts Consumption. *Nutrients*, 2, 652-682.
- SABATER-VILAR M., NIJMEIJER S., FINK-GREMMELS J. (2003) - Genotoxicity assessment of five tremorgenic mycotoxins (fumitremorgen B, paxilline, penitrem A, verruculogen, and verrucosidin) produced by molds isolated from fermented meats. *Journal of Food Protection*, 66, 2123-2129.
- SAMSON R. A., VISAGIE C. M., HOUBRAKEN J., HONG S.-B., HUBKA V., KLAASSEN C. H. W., PERRONE G., SEIFERT K. A., SUSCA A., TANNEY J. B., VARGA J., KOCSUBÉ S., SZIGETI G., YAGUCHI T. Y., FRISVAD J. C. (2014) - Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78, 141-173.
- SCHMIDT-HEYDT M., RÜFER C. E., ABDEL-HADI A., MAGAN N., GEISEN R. (2010) - The production of aflatoxin B₁ or G₁ by *Aspergillus parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of *aflS* to *aflR* expression. *Mycotoxin Research* 26, 241-246.
- SCHOLTZ I., KORSTEN L. (2016) - Profile of *Penicillium* species in the pear supply chain. *Plant Pathology*, 65, 1126-1132.
- SCOTT J. A., WONG B., SUMMERBELL R. C., UNTEREINER W. A. (2008) - A survey of *Penicillium brevicompactum* and *P. bialowiezense* from indoor environments, with commentary on the taxonomy of the *P. brevicompactum* group. *Canadian Journal of Botany*, 86, 732-741
- SELÇUK M., OKSUZ L., BASARAN P. (2008) - Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. *Bioresource Technology*, 99, 5104-5109.
- SICILIANO I., DAL BELLO B., ZEPPA G., SPADARO D., GULLINO M. L. (2017) - Static hot air and infrared rays roasting are efficient methods for aflatoxin decontamination on hazelnuts. *Toxins*, 9, 72
- SICILIANO I., SPADARO D., PRELLE A., VALLAURI D., CAVALLERO M. C., GARIBALDI A., GULLINO M. L. (2016) - Use of Cold Atmospheric Plasma to Detoxify Hazelnuts from Aflatoxins. *Toxins* 8, 125.
- SIEBER T. N., JERMINI M., CONEDERA M. (2007) - Effects of the harvest method on the infestation of chestnuts (*Castanea sativa*) by insects and moulds. *Journal of Phytopathology*, 155, 497-504.
- ŞİMŞEK O., ARICI M., DEMİR C. (2002) - Mycoflora of hazelnut (*Corylus avellana* L.) and aflatoxin content in hazelnut kernels artificially infected with *Aspergillus parasiticus*. *Food/Nahrung*, 46, 194-196.
- TRENK H. L., HARMAN P. A. (1970) - Effects of Moisture Content and Temperature on Aflatoxin Production in Corn. *Applied Microbiology*, 19, 781-784.
- TURAN A. (2018) - Effect of drying methods on fatty acid profile and oil oxidation of hazelnut oil during storage. *European Food Research and Technology*, 244, 2181-2190.
- ÜSTÜN N., TOSUN, Y., SERDAR, U. (1999) - Technological properties of chestnut varieties grown in Erfelek district of Sinopy city. *Acta Horticulturae*, 494, 107-110.
- VISAGIE C. M., HIROOKA Y., TANNEY J. B., WHITFIELD E., MWANGE K., MEIJER M., AMEND A. S., SEIFERT K. A., SAMSON R. A. (2014) - *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from in house dust samples collected around the world. *Study in Mycology*, 78, 63-139.
- VISAGIE C. M., HOUBRAKEN J., FRISVAD J. C., HONG S. B., KLAASSEN C. H. W., PERRONE G., SEIFERT K. A., VARGA J., YAGUCHI T., SAMSON R. A. (2014) - Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in mycology*, 78, 343-371.
- WASHINGTON W. S., ALLEN A. D., DOOLEY L. B. (1997) - Preliminary studies on *Phomopsis castanea* and other organisms associated with healthy and rotted chestnut fruit in storage. *Australasian Plant Pathology*, 26, 37-43.
- WEBER T., BLIN K., DUDELA S., KRUG D., KIM H. U., BRUCCOLERI R., LEE S. Y., FISCHBACH M. A., MULLER R., WOHLLEBEN W., BRETLING R., TAKANO E., MEDEMA M. H. (2015) - antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research*, 43, 237-243.
- WELLS J. M., PAYNE J. A. (1975) - Toxicogenic *Aspergillus* and *Penicillium* isolates from Weevil-Damaged chestnuts. *Applied Microbiology*, 30, 536-540.
- ZHU F. (2011) - Effect of processing on quality attributes of chestnut. *Food Biotechnology*, 9, 1429-1443.