



Ricerca di Sistema elettrico

Sviluppo di una camera di trattamento per l'applicazione di campi elettrici ad alta intensità a un fluido in quiete e in movimento

Paola Casti, Marcello Salmeri

SVILUPPO DI UNA CAMERA DI TRATTAMENTO PER L'APPLICAZIONE DI CAMPI ELETTRICI AD ALTA INTENSITÀ A UN FLUIDO IN QUIETE E IN MOVIMENTO

Paola Casti, Marcello Salmeri (Università degli Studi di Roma Tor Vergata)

Settembre 2017

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico - ENEA

Piano Annuale di Realizzazione 2016

Area: "Efficienza energetica e risparmio di energia negli usi finali elettrici e interazione con altri vettori energetici"

Progetto: "Processi e macchinari industriali"

Obiettivo: D "Applicazione di campi elettrici pulsati nei processi industriali"

Responsabile del Progetto: Ing. Ilaria Bertini, ENEA



Il presente documento descrive le attività di ricerca svolte all'interno dell'Accordo di collaborazione "Analisi quantitativa descrittiva dello stato dell'arte in materia di PEF applicati alla conservazione degli alimenti"

Responsabile scientifico ENEA: Ing. Francesca Bonfà

Responsabile scientifico Università degli Studi di Roma Tor Vergata: Prof. Marcello Salmeri



Indice

SOMMARIO.....	5
1 ANALISI DELL'INATTIVAZIONE DEI MICRORGANISMI IN FUNZIONE DELLA LORO STRUTTURA, DELLE CARATTERISTICHE DEL FLUIDO E DEI PEF APPLICATI, ATTRAVERSO UN MODELLO MATEMATICO GENERALIZZATO.	6
1.1 BREVE INTRODUZIONE E MOTIVAZIONI	6
1.2 ANALISI DEI MODELLI CINETICI.....	7
1.3 STUDIO DI UN NUOVO MODELLO CINETICO GENERALIZZATO	9
1.4 IL MODELLO CINETICO GENERALIZZATO	11
1.4.1 <i>Analisi della variabile dimensione dei microrganismi</i>	11
1.4.2 <i>Analisi della variabile conducibilità</i>	15
1.5 RISULTATI DELLA REGRESSIONE NON LINEARE PESATA.....	17
1.6 ANALISI DEI RESIDUI E RIMOZIONE DEGLI OUTLIERS	18
1.7 DEFINIZIONE DEL MODELLO GENERALIZZATO	24
1.8 MODELLO NON LINEARE AD EFFETTI MISTI	27
1.9 VALIDAZIONE DEL MODELLO GENERALIZZATO	29
1.9.1 <i>Cross-validazione holdout</i>	29
1.9.2 <i>Leave-one-out</i>	33
1.10 CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI	34
2 ANALISI DI ALCUNE CARATTERISTICHE FISICHE E CHIMICHE DI DIVERSI LIQUIDI AL VARIARE DELLA TEMPERATURA	36
2.1 BREVE INTRODUZIONE E MOTIVAZIONI	36
2.2 FENOMENI DI CONDUZIONE IN SOLUZIONI ELETTROLITICHE.....	36
2.3 IL CONDUTTIMETRO COND70.....	37
2.4 MISURE DI ALCUNI PARAMETRI CHIMICO/FISICI.....	39
2.5 RISULTATI DELLE MISURE.....	40
3 STUDIO E DIMENSIONAMENTO DEL PROTOTIPO DI CAMERA DI TRATTAMENTO.....	43
3.1 BREVE INTRODUZIONE E MOTIVAZIONI	43
3.2 STUDIO DELLA GEOMETRIA	43
3.3 DIMENSIONAMENTO.....	44
3.4 STUDIO DEI MATERIALI	46
4 STUDIO DEI PARAMETRI DINAMICI PER APPLICAZIONI PEF IN CAMERE DI TRATTAMENTO CONTINUO.	47
4.1 BREVE INTRODUZIONE E MOTIVAZIONE	47
4.2 CAMERE DI TRATTAMENTO CONTINUO.....	47
4.3 STUDIO DEI PARAMETRI DINAMICI.....	48
4.4 VINCOLI AGGIUNTIVI DI PROGETTAZIONE	49
5 SVILUPPO DI UN MODELLO COMPUTAZIONALE A ELEMENTI FINITI PER L'ANALISI DEI CAMPI ELETTRICI PULSATI APPLICATI A UN FLUIDO.	51
5.1 BREVE INTRODUZIONE E MOTIVAZIONI	51
5.2 CREAZIONE DEL MODELLO FISICO	51
5.3 REALIZZAZIONE DELLA GEOMETRIA 3D.....	52
5.4 IMPOSTAZIONE DEI MATERIALI	54
5.5 CONDIZIONI AL CONTORNO	55
5.6 REALIZZAZIONE DELLA MESH	56
6 ANALISI DELLA DISTRIBUZIONE DEL CAMPO ELETTRICO IN CONTENITORI NON CONVENZIONALI AL FINE DELL'APPLICAZIONE DEI PEF A FLUIDI CONFEZIONATI NON DIRETTAMENTE ACCESSIBILI.	58

7 CONCLUSIONI..... 61

8 BIBLIOGRAFIA..... 62

Sommario

Il presente lavoro si propone di approfondire alcuni aspetti legati alla progettazione di sistemi PEF (Pulsed Electric Field) per applicazioni in campo alimentare. In particolare, verrà presentata una trattazione relativa all'analisi della inattivazione dei microrganismi in funzione della loro struttura, delle caratteristiche del fluido e dei PEF applicati, attraverso un modello cinetico generalizzato ottenuto per regressione da dati sperimentali reperiti in letteratura. Le caratteristiche fisiche e chimiche dei fluidi selezionati per la sperimentazione sono state investigate mediante misure dei parametri non forniti in letteratura (in particolare la conducibilità elettrica). La seconda fase del lavoro ha riguardato lo studio ed il dimensionamento di un prototipo della camera di trattamento o porta campione destinato alla sperimentazione di piccole quantità di fluido (circa 0,2 litri). In aggiunta, alcuni parametri dinamici, in particolare la velocità di scorrimento, sono stati determinati per l'applicazione dei PEF in camere di trattamento continuo, in funzione della camera di trattamento, delle caratteristiche degli impulsi applicati ed in relazione ai microrganismi da inattivare. La fase finale ha riguardato lo sviluppo di un modello computazionale a elementi finiti per l'analisi dei campi elettrici pulsati applicati ad un fluido. Tale modello, realizzato in ambiente COMSOL Multiphysics ha permesso l'analisi della distribuzione del campo elettrico in contenitori non convenzionali al fine dell'applicazione dei PEF a fluidi confezionati non direttamente accessibili.

1 Analisi dell'inattivazione dei microrganismi in funzione della loro struttura, delle caratteristiche del fluido e dei PEF applicati, attraverso un modello matematico generalizzato.

1.1 Breve introduzione e motivazioni

Al fine di determinare i criteri di progettazione di sistemi PEF, è necessario stabilire i principali parametri di processo che garantiscano l'inattivazione dei diversi microrganismi presenti in funzione del fluido da trattare.

Tradizionalmente, alcuni parametri e modelli cinetici sono utilizzati per lo sviluppo dei processi di conservazione degli alimenti al fine di garantirne la sicurezza. Essi consentono di confrontare le diverse tecnologie di processo, tradizionali e/o alternative, sulla base della riduzione delle popolazioni microbiche presenti [1]. Nel caso dei PEF, i modelli cinetici riportati nel paragrafo 3.3 del rapporto sull'annualità precedente permettono una stima dell'inattivazione dei diversi microrganismi in determinati alimenti in funzione di alcune variabili di trattamento principali, come l'intensità di picco del campo elettrico applicato ed il tempo di trattamento. A differenza dei risultati riportati in letteratura relativamente ai metodi di conservazione tradizionali, come i metodi termici, nel caso dei PEF i coefficienti empirici determinati a partire da dati sperimentali e reperibili in letteratura, presentano forti limitazioni, riportate dalla *Food and Drug Administration* (FDA) in un report sulla cinetica di inattivazione microbica per tecnologie alternative di conservazione degli alimenti [1]. In particolare, i dati reperibili in letteratura sono troppo limitati e hanno bisogno di ulteriori validazioni per poter essere utilizzati in fase di progettazione. L'attività dell'annualità precedente ha portato alla raccolta di un campione di 194 dati relativi alle variabili di influenza in materia di PEF. I dati raccolti, dipendono fortemente dalle caratteristiche del mezzo e del microrganismo trattato. Le costanti di regressione riportate dai lavori pubblicati e relative a modelli cinetici esistenti dipendono, in aggiunta, anche dalle particolari condizioni sperimentali utilizzate per la loro stima e non sono utilizzabili per stimare in modo adeguato la riduzione microbica. Inoltre, alcuni degli articoli pubblicati forniscono informazioni incomplete sulle condizioni necessarie per garantire l'inattivazione microbica, con parametri di processo e prodotto spesso mancanti.

La *prima attività* di questo anno è stata quella di adattare un modello cinetico esistente [2, 3] al campione di 194 dati reperiti dalla letteratura scientifica, mediante regressione non lineare. L'obiettivo è stato quello di mitigare alcuni errori casuali, legati a variazioni non controllabili ed imprevedibili delle variabili di influenza nei diversi studi sull'inattivazione microbica in materia di PEF permettendo, al contempo, l'estrapolazione di dati non direttamente reperibili dalla letteratura scientifica esistente.

È importante sottolineare nuovamente che i coefficienti di regressione dei modelli esistenti in materia di PEF sono, per definizione, dipendenti dalla tipologia di microrganismo e dall'alimento da trattare. Non possono pertanto essere utilizzati *tout court* sull'intero campione di dati. A controprova di questo, non è stato ottenuto nessun risultato soddisfacente in fase di regressione utilizzando i modelli esistenti sull'intero campione di dati. D'altro canto, regressioni ottenute su sottocampioni di dati, ad esempio andando a selezionare alimenti e microrganismi specifici, non sarebbero scientificamente valide a causa della insufficiente numerosità del sottocampione considerato e genererebbero fenomeni di *overfitting*, inficiando così la capacità di generalizzazione del modello stesso e la sua applicabilità in fase di progettazione di nuovi sistemi PEF. Anche questo aspetto è stato facilmente verificato utilizzando tecniche di cross-validazione che non hanno generato risultati positivi per i diversi modelli considerati applicati a diversi sottocampioni di dati.

Queste considerazioni hanno motivato lo **sviluppo e la validazione di un nuovo modello cinetico** capace di operare con buona efficacia sulle diverse tipologie di alimento e sui diversi microrganismi da trattare. Il

modello cinetico risultante è stato validato mediante tecniche di cross-validazione in modo da verificare l'assenza di fenomeni di overfitting e, per questo, in seguito ad ulteriori validazioni, potrà essere utilizzato come criterio per definire due importanti parametri di progettazione dei dispositivi PEF applicati a liquidi alimentari: la durata del trattamento e l'intensità del campo elettrico, entrambi in funzione del microrganismo e del liquido da trattare. È bene sottolineare come i modelli di regressione ottenuti abbiano comunque bisogno di validazioni aggiuntive effettuate su un numero maggiore di misure per poter essere utilizzati come punti validi di partenza. Questo potrà permettere di definirne più chiaramente l'accuratezza e la loro capacità di generalizzazione.

Proseguiamo ora la trattazione con alcuni dettagli relativi all'analisi effettuata durante la prima attività.

1.2 Analisi dei modelli cinetici

È stato realizzato uno studio preliminare sui modelli cinetici esistenti in letteratura, che sono stati applicati al dataset raccolto e poi a diversi sottocampioni di dati al fine di evidenziarne le principali criticità.

I modelli esistenti sono stati testati in ambiente MATLAB [4] mediante regressione non lineare utilizzando l'algoritmo dei minimi quadrati Levenberg-Marquardt che consente di trovare i valori di un set di parametri β che minimizzano lo scarto quadratico medio tra le risposte osservate, y , e le previsioni di un dato modello teorico. Tale algoritmo utilizza un procedimento iterativo che necessita di un set iniziale per i valori di β (initial guess). In seguito è stata effettuata un'analisi comparativa attraverso la stima dei coefficienti di regressione e di diversi indici di performance. L'analisi ha evidenziato, come atteso, che nessuno dei modelli esistenti riesce a predire in modo adeguato la riduzione microbica nelle diverse tipologie di alimenti e popolazioni microbiche. In particolare, l'analisi sull'intero campione di dati, non ha restituito nessun risultato soddisfacente (coefficiente di determinazione, $R^2 < 0$; Root Mean Squared Error, $RMSE = 18,6$) perché il comportamento dei microrganismi in risposta ai PEF potrebbe dipendere dal mezzo di trattamento oltre che dalle caratteristiche del microrganismo stesso. Questo non permette ad un unico modello di adattarsi alle risposte osservate né sull'intero campione di dati né sui diversi sottocampioni selezionati.

Si riportano, a titolo di esempio, alcuni dei risultati ottenuti utilizzando il modello cinetico di Hülseger, che, come visto nel report sull'annualità precedente, introduce come parametri di input sia il valore di picco del campo elettrico, E , che la durata del trattamento, T , ed esprime il tasso di sopravvivenza dei microrganismi, S , secondo una legge esponenziale, e che qui riportiamo per convenienza.

$$S(E, t) = \left(\frac{t}{t_c}\right)^{-\frac{(E-E_c)}{k}} \quad [1.1]$$

Tramite l'algoritmo sopra descritto si sono stimati i tre parametri, $\beta = [T_c, E_c, k]$, ovvero il tempo di trattamento critico, il campo elettrico critico ed una costante k . L'analisi è stata effettuata andando a selezionare alimento e tipo di microorganismo così da poter effettuare regressioni efficaci. Relativamente alla disattivazione di *E. Coli* nel latte il modello cinetico di Hülseger ha ottenuto buoni risultati su un campione di 18 dati ($R^2 = 0,99$ ed $RMSE = 0,008$).

Nelle Figure 1.1 e 1.2 sono riportati i grafici relativi alla disattivazione di popolazioni di *Escherichia Coli* nel latte. Come si può osservare in Fig. 1.2, il modello permette di determinare un punto di lavoro (T, E) al fine di ottenere una riduzione logaritmica desiderata. (es. 0,5 ms di trattamento con un campo elettrico di picco di 40 kV/cm per ottenere una riduzione di 5 Log nella popolazione di *E. Coli*. Punto di lavoro indicato con il pallino rosso in Fig. 1.2). Un gravoso inconveniente, in questo caso, è dato dalla scarsità di dati disponibili, 18 dati, che pongono problemi relativi all'overfitting del modello e quindi al suo valore predittivo in contesti industriali, fenomeno confermato dal fallimento di metodologie di cross-validazione applicate al modello stesso.

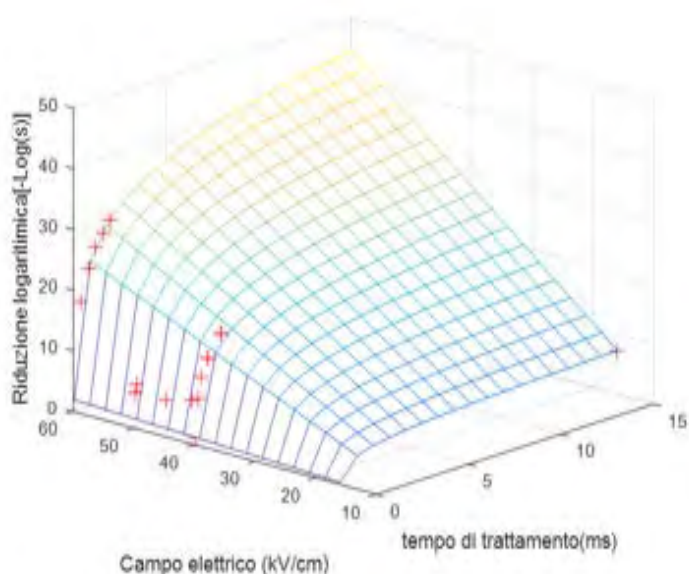


Figura 1.1 Modello di regressione ottenuto per la disattivazione di Escherichia Coli nel latte. Il simbolo '+' indica i dati sperimentali utilizzati per la regressione.

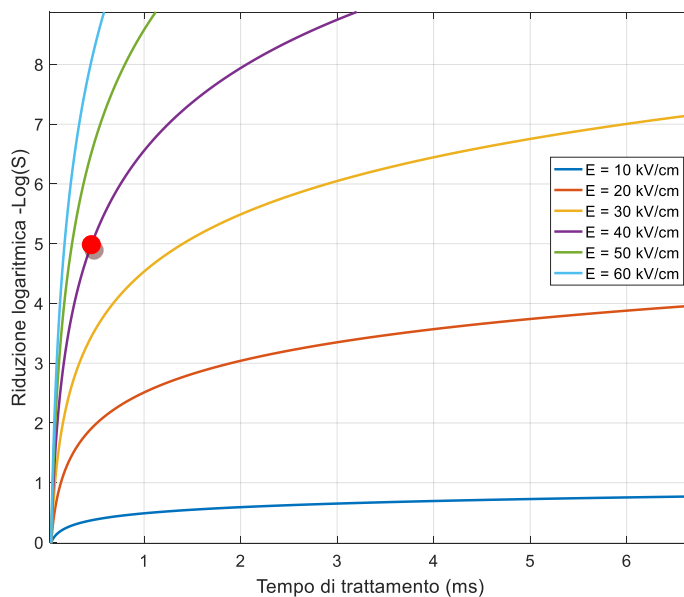


Figura 1.2 Riduzione logaritmica stimata in funzione del tempo di trattamento per valori discreti di intensità di campo elettrico.

Relativamente agli altri sottocampioni, i cui risultati sono riassunti in Tab. 1.1, il modello riuscirebbe a stimare la riduzione microbica solo in 46 dei 194 dati a disposizione (<24% del campione) relativi a latte, uova, mezzo di coltura, succo di frutta e birra ma solo per un sottoinsieme di organismi specifici.

Relativamente a uova liquide e succo di frutta si ottengono valori di $R^2 < 0$ (valori negativi del coefficiente di determinazione indicano che la semplice media delle uscite rappresenta meglio i dati rispetto al modello generato, confermando la non efficacia del modello).

In assenza di cross-validazioni efficaci, la scarsa quantità di dati disponibili lascia intuire la possibilità di overfitting sul modello e pone comunque forti limitazioni all'utilizzo dei dati ricavati.

Tabella 1.1 Risultati della regressione mediante il modello di Hülshager su sottocampioni di dati.

N. Dati	Alimento	Microorganismo	Tipo	R ²	RMSE	Bias Factor	Accuracy Factor
18	Latte	Escherichia Coli	Gram -	0,988	0,008	2,19	3,04
6	Latte	Listeria	Gram +	0,999	0,001	2,35	2,35
3	Uova liquide	Escherichia Coli	Gram -	-0,811	0,0001	3,06	3,06
4	Succo di frutta	Escherichia Coli	Gram -	-0,728	7,68E-06	1,64	1,73
12	Mezzo di coltura	Leuconostoc Mesenteroides	Gram +	0,597	0,17	0,48	4,64
3	Birra	Zygosaccharomyces bailii	Lievito	1	1,56E-07	1,13	1,15

Sono stati analizzati anche il modello di Peleg [5] ed il modello basato su distribuzione di Weibull [58, 59] su i diversi sottocampioni del dataset. Relativamente al modello di Peleg sono stati ottenuti valori di $R^2 < 0$ proprio nel caso del vino (prodotto selezionato per la fase di sperimentazione), mentre nel caso del modello basato su distribuzione di Weibull i risultati ottenuti non sono stati soddisfacenti perchè hanno riportato valori di RMSE troppo alti.

Per un'analisi più accurata bisognerebbe disporre di un data-set più ampio per ogni classe di alimento e microorganismo. Tale data-set può essere ottenuto solamente in fase sperimentale ma, in ogni caso, permetterebbe stime legate alle particolari condizioni sperimentali (di processo, di prodotto, e di microorganismo) analizzate.

Un approccio alternativo, che proponiamo in questo lavoro, consiste nello sviluppo di un nuovo modello cinetico che tenga conto di parametri di influenza addizionali e che possa, per questo, essere validato sull'intero campione di dati raccolto, in modo da poter essere utilizzato come strumento di supporto alla progettazione di dispositivi PEF anche per liquidi alimentari non sufficientemente esplorati dalla letteratura scientifica in materia di PEF (es. vino).

1.3 Studio di un nuovo modello cinetico generalizzato

Sulla base della ricerca effettuata durante l'annualità precedente sono state individuate due variabili di influenza importanti che verranno considerate per lo sviluppo del modello:

- 1) **Un fattore microbico**, ovvero una variabile dimensionale che tiene conto della dimensione media orientativa relativa alla popolazione microbica da trattare. Infatti, è noto, che sotto l'influenza di un campo elettrico esterno, il potenziale transmembrana (TMP) sviluppato attraverso la membrana di una cellula aumenta rapidamente in relazione al raggio della cellula stessa. In particolare, data una cellula di raggio r posta in un campo elettrico esterno di intensità, E , esso può essere stimato come [6]

$$TMP = \frac{2}{3} r E \cos(\theta), \quad [1.2]$$

dove θ è l'angolo tra il raggio di incidenza del campo e la perpendicolare alla superficie della membrana nel punto di incidenza. Le attuali teorie elettromeccaniche affermano che con l'aumento dell'intensità del campo esterno, il TMP aumenta fino a raggiungere una tensione critica di **1 V** attraverso la membrana. A questo punto la rottura della membrana si verifica a causa della

formazione di pori che aumentano la permeabilità e la conducibilità della membrana. Se il campo applicato esiste per un tempo maggiore o supera un valore di intensità critica del campo ($E > E_c$), si formano un gran numero di pori di grande dimensione causando una rottura irreversibile della membrana associata alla distruzione meccanica della cellula. Nel caso in cui le dimensioni sono molto piccole è necessario applicare campi elettrici più grandi in intensità per ottenere un TMP equivalente evidenziando una maggiore difficoltà di neutralizzazione dei microrganismi stessi. Al contrario, quando la dimensione dei microrganismi aumenta (come nel caso dei lieviti) sono sufficienti campi elettrici inferiori per ottenere lo stesso effetto. È evidente, quindi, che in fase di progettazione, potrà essere considerato il microrganismo patogeno di interesse per l'alimento da trattare (es. vino) che abbia dimensioni medie inferiori, in modo da garantire l'efficacia del trattamento anche sui restanti microrganismi patogeni. Questo aspetto potrà essere approfondito in studi futuri.

- 2) **Un fattore di prodotto**, ovvero la conducibilità elettrica del mezzo da trattare. La conducibilità elettrica di un mezzo è la capacità di condurre corrente elettrica. Questa variabile è molto importante nella tecnologia PEF perché all'aumentare di essa e a parità di tensione applicata si generano valori inferiori di picco del campo elettrico all'interno della camera di trattamento con conseguente diminuzione del tasso di inattivazione microbica. Quindi alimenti con elevata conducibilità elettrica necessitano di maggiore energia per il trattamento e ostacolano l'efficienza dei campi elettrici applicati.

Nel caso di soluzioni elettrolitiche, come il vino, correnti di perdita vengono generate in presenza di una differenza di potenziale a causa della presenza di elettroliti in soluzione. Questo, oltre ad avere effetti sul campo elettrico che è possibile generare all'interno del materiale date certe caratteristiche degli impulsi di tensione applicati, potrebbe avere conseguenze sulla capacità del sistema PEF di inattivare i microrganismi presenti in soluzione.

Di seguito, nella Tab. 1.2, sono riportati i valori della conducibilità, espressa in S/cm, di tutti quegli alimenti che disponevano di tale valore nel corrispondente articolo scientifico.

Tabella 1.2 Valori di conducibilità di alcuni alimenti reperiti in letteratura

Alimento	Conducibilità [S/cm]
Latte scremato	0,0055 - 0,0048 – 0,0032
Uova liquide	0,57
Succo di mela	0,0026
Succo d'arancia	0,0042
Tampone fosfato	0,0016 – 0,0017
Acqua	0,17 – 0,0002
Mezzo di coltura	0,004 – 0,0013
Birra	0,00158 - 0,002

Dalla tabella si può notare che alcuni alimenti presentano più di un valore di conducibilità e che il vino non è riportato perché nei rispettivi articoli i valori della conducibilità non erano espressi. Poiché questi erano mancanti e poiché le caratteristiche fisico-chimiche del vino possono variare molto in relazione allo stato della fermentazione, si è ritenuto di effettuare misure sperimentali di conducibilità su campioni di vino che saranno utili in fase di progettazione di sistemi PEF applicati appunto al vino. I risultati ottenuti saranno descritti nel paragrafo successivo.

Nella presente attività, dopo aver ricavato una dipendenza dell'inattivazione microbica dalla dimensione dei microrganismi e dalla conducibilità elettrica, esse verranno inserite nell'equazione dei modelli e questi verranno testati sull'intero dataset raccolto. Servendoci delle nuove stime dei coefficienti e degli indici di performance verrà quindi determinato un unico modello cinetico in grado di generalizzare e di predire l'intero insieme dei dati a disposizione.

Mediante analisi dei residui e metodo della distanza di Cook verranno inoltre identificati degli outliers, ovvero dei dati spuri che vedremo corrispondere a condizioni molto particolari di sperimentazione, nelle quali, ad esempio, venivano utilizzati incrementi di temperatura forzati dall'esterno per migliorare l'efficacia del trattamento.

Durante l'attività svolta si è inoltre voluto procedere all'ottimizzazione del modello generalizzato utilizzando due metodi diversi per la stima della regressione al fine di migliorare la sua predizione e ottenere migliori risultati. In base alle caratteristiche dei dati contenuti nel dataset si è deciso di utilizzare il metodo di regressione non lineare pesata ed il metodo ad effetti misti. Dopo l'analisi dei residui e la rimozione degli outliers, entrambi sono stati applicati al data-set e su questo sono stati validati utilizzando i metodi di cross-validazione holdout e leave-one-out. Alcuni dettagli del lavoro svolto vengono riportati nei paragrafi successivi.

1.4 Il modello cinetico generalizzato

Le analisi dei modelli esistenti ci hanno spinto a considerare il modello di Hülshager e il modello di Peleg come punto di partenza per determinare un nuovo modello capace di valutare e predire l'inattivazione microbica sugli alimenti di tipo liquido.

Le variabili d'influenza, nel caso di Hülshager, sono il campo elettrico di picco e il tempo di trattamento, mentre, nel caso di Peleg, sono il campo elettrico di picco e il numero degli impulsi, ma ulteriori sono le variabili in grado di condizionare l'inattivazione dei microrganismi utilizzando la tecnologia dei campi elettrici pulsati (PEF). In particolare, per l'espressione del nuovo modello, come spiegato nel paragrafo precedente, verranno utilizzate altre due variabili: la dimensione media del microorganismo trattato e la conducibilità dell'alimento.

1.4.1 Analisi della variabile dimensione dei microrganismi

La dimensione dei microrganismi incide molto sulla loro inattivazione. L'inserimento di questa variabile nei due modelli consente di eseguire un'analisi che si adatta al tipo di microorganismo trattato e che opera sull'intero insieme di dati raccolto. Nella Tabella 1.2, riportata nel paragrafo 1.2, sono state indicate, attraverso intervalli, le dimensioni dei principali microrganismi presenti negli alimenti e che fanno parte dei data-set descritti nel rapporto sull'attività svolta nell'annualità precedente.

Il primo passo che è stato fatto per determinare la funzione matematica per la dipendenza della riduzione logaritmica dalle dimensioni è stato quello di andare a verificare un'eventuale correlazione lineare tra le costanti dei modelli con la dimensione del batterio. I risultati che sono stati ottenuti hanno evidenziato una bassa correlazione e un p-value, cioè il parametro che indica la significatività del test, troppo alto quindi abbiamo deciso di inserire una dipendenza di tipo esponenziale negativa $e^{-w \cdot dim}$, dove w è una costante determinata dalla regressione del modello e dim è la dimensione media del microorganismo. Questa è stata calcolata considerando la mediana nel caso di una dimensione e la media delle due mediane nel caso di due dimensioni. Sono state calcolate anche le dimensioni minime facendo la media dei valori minimi dell'intervallo e le dimensioni massime facendo la media dei valori massimi dell'intervallo.

Il passo seguente è stato quello di inserire questo esponenziale in diversi punti nell'espressione dei due modelli per vedere in quale caso si otteneva un valore di regressione migliore. In totale sono stati realizzati sei modelli diversi con l'esponenziale inserito, nel caso di Hülshager, a moltiplicare il modello, a moltiplicare E_c e all'esponente di T/T_c , mentre in Peleg è stato inserito al numeratore, a moltiplicare $E_c(n)$ e a moltiplicare il denominatore. Di seguito sono riportate le espressioni dei sei modelli proposti:

Espressioni proposte (modello di Hülsheger modificato):

$$1. \quad S(E, T, dim) = e^{(-w*dim)} * \left(\frac{T}{T_c}\right)^{\frac{(E-E_c)}{k}} \quad [1.3]$$

$$2. \quad S(E, T, dim) = \left(\frac{T}{T_c}\right)^{\frac{(E-E_c * e^{(-w*dim)})}{k}} \quad [1.4]$$

$$3. \quad S(E, T, dim) = \left(\frac{T}{T_c}\right)^{\frac{(E-E_c)}{k} * e^{(-w*dim)}} \quad [1.5]$$

Espressioni proposte (modello di Peleg modificato):

$$4. \quad S(E, n, dim) = \frac{e^{(-w*dim)}}{1 + e^{\left[\frac{E-E_c(n)}{a(n)}\right]}} \quad [1.6]$$

$$5. \quad S(E, n, dim) = \frac{1}{1 + e^{\left[\frac{E-E_c(n) * e^{(-w*dim)}}{a(n)}\right]}} \quad [1.7]$$

$$6. \quad S(E, n, dim) = \frac{1}{(e^{(-w*dim)}) * 1 + e^{\left[\frac{E-E_c(n)}{a(n)}\right]}} \quad [1.8]$$

Per ogni modello sono state eseguite tre analisi relative alle dimensioni minime, medie e massime, ma di seguito saranno riportate solo le tabelle ottenute considerando le dimensioni medie dei microrganismi. Questo è stato fatto per avere una maggiore validità statistica.

Nelle Tabelle 1.3, 1.4 e 1.5 sono riassunti i risultati ottenuti per il valore di R², per RMSE, per le 4 costanti determinate dalla regressione e per gli indici di bontà nel caso dei tre modelli proposti (modello di Hülshger modificato) in funzione della dimensione media dei microrganismi. L'assenza di risultati relativi ad alcuni sottocampioni di alimenti corrisponde alla non convergenza dell'algoritmo di regressione.

Tabella 1.3 Risultati degli indici di bontà e dei coefficienti di regressione per il primo modello proposto (Hülsheger modificato) dipendente dalle dimensioni medie dei microrganismi.

N. Dati	Alimento	R ²	RMSE	Tc [ms]	Ec [kV/cm]	k	W [um ⁻¹]	Bias Factor	Accuracy Factor	β iniziale
37	Latte	0,9	0,0184	0,01	-38,37	17,41	-2,49	2,74	3,58	(0,9 30 1 10)
15	Latte scremato	0,899	0,0303	0,04	28,44	1,168	0,12	4,59	4,97	(0,9 30 1 10)
4	Uova liquide	0,898	5,89E-05	0,34	37,22	1,56	25,44	27,70	27,70	(0,9 30 1 10)
52	Succo di frutta	0,438	0,0396	0,001	10,65	18,84	0,54	0,61	2,67	(0,2 30 1 10)
37	Succo d'arancia	0,5	0,043	0,007	13,88	3,37	0,56	4,01	8,02	(0,2 30 1 10)
13	Succo di mela	0,999	0,00076	0,001	41,46	6,58	6,49	1,60	2,25	(0,1 30 1 10)
63	Mezzi di coltura	0,759	0,111	0,20	51,34	-19,80	2,85	0,87	4,20	(0,1 30 1 5)
4	Birra	1	1E-08	0,17	15,91	0,06	0,84	3,29	3,29	(0,4 30 1 5)
2	Vino	1	1E-08	1,14	28,37	1,19	12,33	1,69	1,69	(0,9 30 1 10)

La Tabella 1.3 mostra che i valori di R², di RMSE e delle costanti stimate sono abbastanza buoni per i vari alimenti, inoltre anche gli indici di performance, salvo il caso delle uova liquide, del latte scremato e del succo d'arancia, sono abbastanza vicini all'unità.

Tabella 1.4 Risultati degli indici di bontà e dei coefficienti di regressione per il secondo modello proposto (Hülsheger modificato) dipendente dalle dimensioni medie dei microrganismi.

N. Dati	Alimento	R ²	RMSE	Tc [ms]	Ec [kV/cm]	k	W [μm ⁻¹]	Bias Factor	Accuracy Factor	β iniziale
15	Latte scremato	0,899	0,0279	0,048	142,88	0,11	2,28	1838	1838	(0,5 30 2 1)
4	Uova liquide	0,902	0,0001	0,04	71,56	-0,13	0,37	3,64	3,64	(0,9 30 2 1)
37	Succo d'arancia	0,688	0,0034	0,02	14,86	0,02	-0,004	0,84	3,02	(0,2 30 1 3)
2	Vino	1	3,87E-14	5,38E-07	33,92	10,93	0,68	1	1	(0,8 30 2 1)

In Tabella 1.4, oltre ad una scarsità di dati analizzati per i quali si è ottenuta convergenza, rispetto al caso precedente, ci sono valori degli indici di performance molto lontani dall'unità, come per il caso del latte.

Tabella 1.5 Risultati degli indici di bontà e dei coefficienti di regressione per il terzo modello proposto (Hülsheger modificato) dipendente dalle dimensioni medie dei microrganismi.

N. Dati	Alimento	R ²	RMSE	Tc [ms]	Ec [kV/cm]	k	W [μm ⁻¹]	Bias Factor	Accuracy Factor	β iniziale
15	Latte scremato	0,9	0,0303	0,03	23,63	0,02	2,11	28,90	50,37	(0,2 30 1 1)
4	Uova liquide	0,898	7,21E-05	4,36	77,16	18,64	-0,28	3,17	3,18	(0,8 20 5 1)
11	Acqua	0,721	0,0291	0,006	114,56	-0,03	1,18	1,03	5,27	(0,4 20 1 1)
4	Birra	1	1E-08	0,14	-97,69	4,18	-0,08	1,50	1,50	(0,1 30 1 1)
2	Vino	1	1E-08	4,28	42,92	1,23	-0,67	12,91	12,91	(0,4 30 2 1)

Nella tabella sopra indicata ci sono valori di R², RMSE molto buoni ma non ci sono risultati inerenti ai succhi di frutta e ai mezzi di coltura, inoltre alcuni valori degli indici di bontà sono alti.

Nelle Tabelle 1.6, 1.7, e 1.8 sono riassunti i risultati ottenuti per l'R², per l'RMSE, e le 5 costanti determinate dalla regressione e per gli indici di bontà nel caso delle tre proposte di modello (Peleg modificato) dipendenti dalla dimensione media dei batteri.

Tabella 1.6 Risultati degli indici di bontà e dei coefficienti di regressione per il quarto modello proposto (Peleg modificato) dipendente dalle dimensioni medie dei microrganismi.

N. Dati	Alimento	R ²	RMSE	Ec ₀ [kV/cm]	k ₁	a ₀ [kV/cm]	K ₂	W [μm ⁻¹]	Bias Factor	Accuracy Factor	β iniziale
19	Latte ultrafiltrato	0,243	0,0068	84,033	0,05	652,30	0,01	1,81	2,48	4,13	(30 0,01 5 0,04 1)
4	Uova liquide	-0,565	0,0002	18,703	0,02	5,39	0,11	1,21	11,99	11,99	(20 0,02 10 0,1 1)
52	Succo di frutta	0,714	0,0283	13,964	0,04	1,57E+10	0,01	0,73	2,854	4,64	(30 0,04 4 0,03 1)
37	Succo d'arancia	0,762	0,0302	15,167	0,01	32,19	-0,02	0,62	4,027	5,16	(30 0,01 1 0,04 1)
13	Succo di mela	0,986	0,0037	24,243	-6E-07	2,68E-01	-0,002	0,77	0,67	2,54	(30 0,01 1 0,04 1)
11	Acqua	-0,417	0,0578	20,672	0,04	13,21	0,02	0,61	319,23	319,24	(20 0,04 10 0,04 1)
63	Mezzi di coltura	0,41	0,175	44,513	-0,01	0,005	0,57	1,43	0,42	5,77	(20 0,01 10 0,04 1)
4	Birra	1	1E-08	48,992	0,01	70,98	0,08	0,84	1,40	1,36	(30 0,01 10 0,04 1)
2	Vino	-1	0,1	30,594	0,01	12,59	0,08	0,878	33,45	33,45	(30 0,01 10 0,08 1)

La Tabella 1.6 precedente riporta valori di R^2 bassi nel caso del latte ultrafiltrato, dei mezzi di coltura e dell'acqua, indici di performance molto alti per l'acqua, vino e uova liquide e valori troppo alti o negativi per le costanti stimate.

Tabella 1.7 Risultati degli indici di bontà e dei coefficienti di regressione per il quinto modello proposto (Peleg modificato) dipendente dalle dimensioni medie dei microrganismi.

N. Dati	Alimento	R^2	RMSE	E_{c0} [kV/cm]	k_1	a_0 [kV/cm]	K_2	W [μm^{-1}]	Bias Factor	Accuracy Factor	β iniziale
15	Latte scremato	0,999	0,0037	20,00	0,02	3,9E-05	-0,05	12,92	4,76	5,63	(10 0,02 1 0,04 1)
4	Uova liquide	-0,565	0,0002	16,09	0,03	1,68	0,14	0,39	12,73	12,73	(20 0,02 10 0,1 1)
52	Succo di frutta	0,712	0,0283	14,64	0,004	528	-0,02	-2,98	4,51	5,18	(30 0,04 10 0,04 1)
37	Succo d'arancia	0,767	0,0298	18,58	0,004	11,89	-0,03	-3,07	4,42	5,32	(30 0,01 1 0,01 1)
13	Succo di mela	0,999	0,0009	79,13	0,01	2,6E+07	0,51	-12,21	2,68	3,14	(30 0,01 1 0,03 1)
11	Acqua	-0,417	0,0578	19,40	0,04	8,47	0,03	1,25	259,65	259,65	(20 0,04 10 0,04 1)
63	Mezzi di coltura	-0,595	0,287	16,534	1,9E-07	0,0562	0,700	3,03	12,31	88,32	(20 0,04 10 0,04 1)
4	Birra	1	1E-08	48,778	0,0098	101,75	0,0749	-0,84	1,36	1,36	(30 0,01 10 0,04 1)
2	Vino	-1	0,1	28,548	0,010	5,6190	0,0840	0,71	35,27	35,27	(30 0,01 10 0,08 1)

La Tabella 1.7 mette in evidenza valori di R^2 negativi per uova liquide, acqua, mezzi di coltura e vino, valori di costanti stimate elevate, in particolare nel caso di a_0 , o negative e indici di performance molto alti per acqua, vino e uova liquide.

Tabella 1.8 Risultati degli indici di bontà e dei coefficienti di regressione per il sesto modello proposto (Hülsheger modificato) dipendente dalle dimensioni medie dei microrganismi.

N. Dati	Alimento	R^2	RMSE	E_{c0} [kV/cm]	k_1	a_0 [kV/cm]	K_2	W [μm^{-1}]	Bias Factor	Accuracy Factor	β iniziale
15	Latte scremato	0,999	0,0038	19,81	0,02	4,6E-05	-0,05	-12,91	4,72	4,72	(10 0,03 1 0,03 1)
4	Uova liquide	-0,565	0,0002	18,71	0,02	5,40	0,11	1,22	11,99	11,99	(20 0,02 10 0,1 1)
52	Succo di frutta	0,712	0,0287	20,51	0,004	1,54	-0,03	3,01	4,53	4,53	(30 0,01 10 0,04 1)
37	Succo d'arancia	0,767	0,0294	16,57	0,004	86,98	-0,03	3,05	4,41	4,41	(30 0,02 1 0,02 1)
13	Succo di mela	0,997	0,0016	39,28	0,01	112,61	-0,01	5,48	1,69	1,69	(30 0,01 1 0,01 6)
11	Acqua	-0,417	0,0578	20,67	0,04	13,21	0,02	0,62	319,24	319,24	(20 0,04 10 0,04 1)
63	Mezzi di coltura	-0,854	0,309	47,04	0,013	13,77	0,60	1,83	1,17	73,38	(30 0,01 10 0,04 1)
4	Birra	1	1E-08	48,99	0,01	70,97	0,08	0,84	1,36	1,36	(30 0,01 10 0,04 1)
2	Vino	-1	0,1	30,59	0,01	12,59	0,08	0,87	33,45	33,45	(30 0,01 10 0,08 1)

Quest'ultima tabella riporta valori di R^2 accettabili anche se per l'acqua e le uova liquide sono bassi e negativi, valori di costanti stimate negative o alte e indici di performance troppo elevati nel caso di acqua, vino e uova liquide.

Sulla scorta delle considerazioni fatte alla fine di ogni tabella si può dedurre che i modelli basati su Hülshager sono migliori da un punto di vista dei coefficienti di regressione, delle costanti stimate e in alcuni casi anche degli indice di performance e quindi possono essere considerati come candidati per la determinazione del modello generalizzato. Tra i tre citati in precedenza quello che garantisce i risultati migliori in termini di quantità di dati analizzati, di indici di performance e di attendibilità delle costanti stimate è il primo modello, ovvero il seguente:

$$S(E, T, dim) = e^{(-w \cdot dim)} \cdot \left(\frac{T}{T_c}\right)^{-\frac{(E-E_c)}{k}} \quad [1.9]$$

Questa è l'espressione matematica che sarà presa in considerazione per ottenere l'equazione del modello finale. Il passo successivo sarà quello di aggiungere e legare a tale modello, attraverso una funzione, l'altra variabile d'influenza, cioè la conducibilità. Questo ci permetterà di eseguire un'unica analisi sull'intero data-set togliendo la dipendenza dal tipo di alimento. Nel paragrafo seguente verranno descritte le motivazioni di tale scelta, l'importanza di questa variabile e infine verrà determinato il modello generalizzato finale.

1.4.2 Analisi della variabile conducibilità

La dipendenza dalla variabile conducibilità all'interno del modello ricavato nel paragrafo precedente, diventa di fondamentale importanza perché ci permette di analizzare interi insiemi di dati senza suddividere per tipo di alimento.

L'obbiettivo ora è quello di trovare una funzione che esprime il legame tra il modello trovato in precedenza e la conducibilità stessa. Sono stati fatti perciò, diversi tentativi con altrettante diverse espressioni per cercare il modello migliore capace di generalizzare meglio il nostro data-set.

Le espressioni considerate sono state sia di tipo lineare che di tipo esponenziale e sono state inserite in diversi punti del modello in modo da ottenere le seguenti quattro proposte di modello:

$$i. \quad S(E, T, dim, \sigma) = (z \cdot \sigma) \cdot e^{(-w \cdot dim)} \cdot \left(\frac{T}{T_c}\right)^{-\frac{(E-E_c)}{k}} \quad [1.10]$$

$$ii. \quad S(E, T, dim, \sigma) = \left(\frac{\sigma}{z}\right) \cdot e^{(-w \cdot dim)} \cdot \left(\frac{T}{T_c}\right)^{-\frac{(E-E_c)}{k}} \quad [1.11]$$

$$iii. \quad S(E, T, dim, \sigma) = e^{-[(z \cdot \sigma) + (w \cdot dim)]} \cdot \left(\frac{T}{T_c}\right)^{-\frac{(E-E_c)}{k}} \quad [1.12]$$

$$iv. \quad S(E, T, dim, \sigma) = e^{(-w \cdot dim)} \cdot \left(\frac{T}{T_c}\right)^{-\frac{(E-E_c)}{k}} \cdot e^{(-z \cdot \sigma)} \quad [1.13]$$

Dove z è la costante che verrà stimata dalla regressione e σ è la conducibilità dell'alimento.

Per testare i modelli sopra indicati abbiamo selezionato i dati del nostro data-set, ovvero abbiamo considerato solo quelli che disponevano di tutti valori necessari per la nostra analisi. Quindi dei 194 dati iniziali siamo arrivati ad un totale di 145 perché abbiamo dovuto eliminare quelli relativi al vino e ad altri alimenti, visto che non conosceamo il valore della conducibilità e ulteriori dati di cui non si conoscevano le dimensioni dei microrganismi.

In Tabella 1.9 sono riportati i risultati ottenuti per i quattro modelli riguardanti i coefficienti di regressione, le costanti stimate e gli indici di bontà.

Tabella 1.9 Risultati degli indici di bontà e dei coefficienti di regressione per quattro modelli proposti (Hülsheger modificato) dipendente dalle dimensioni medie dei batteri e dalla conducibilità.

N. modello	R ²	RMSE	Tc [ms]	Ec [kV/cm]	k	W [um-1]	z [s/cm] ⁻¹	Bias Factor	Accuracy Factor	β iniziale
i	-0,789	0,212	0,06	20,99	3,03	5,003	-5,78E-18	165,59	1,54	(0,1 20 3 0.5 1)
ii	-0,395	0,189	0,04	22,05	7,76	-1,92	1,29E+12	10,52	16,31	(0,2 30 7 1 2)
iii	0,436	0,121	0,02	10,09	43,809	1,06	10,41	0,28	5,49	(0,1 30 2 1 1)
iv	0,428	0,122	0,01	6,96	63,475	0,93	-10,73	0,33	7,29	(0,3 30 5 1 1)

La tabella mostra che i risultati migliori in termini di coefficienti di regressione, cioè di R² e RMSE si ottengono per il terzo modello dove si raggiungono valori di 0,436 e 0,121, rispettivamente. Anche per le costanti stimate i valori di questo modello sono migliori perché non contengono termini negativi o troppo elevati. Per quanto riguarda gli indici di performance il quarto modello è leggermente migliore per il Bias Factor ma peggiore per l'Accuracy Factor. Le considerazioni appena fatte ci consentono di scartare i primi due modelli che forniscono valori poco attendibili sia per le costanti, sia per i coefficienti di regressione e sia per gli indici di performance. Da questo punto in poi si proseguirà con il terzo e il quarto modello e si cercherà di trovare delle soluzioni per arrivare a valori di R², RMSE e indici di bontà molto più soddisfacenti. In figura 6 sono mostrati i grafici dei modelli di regressione ottenuti utilizzando l'equazione del terzo e del quarto modello.

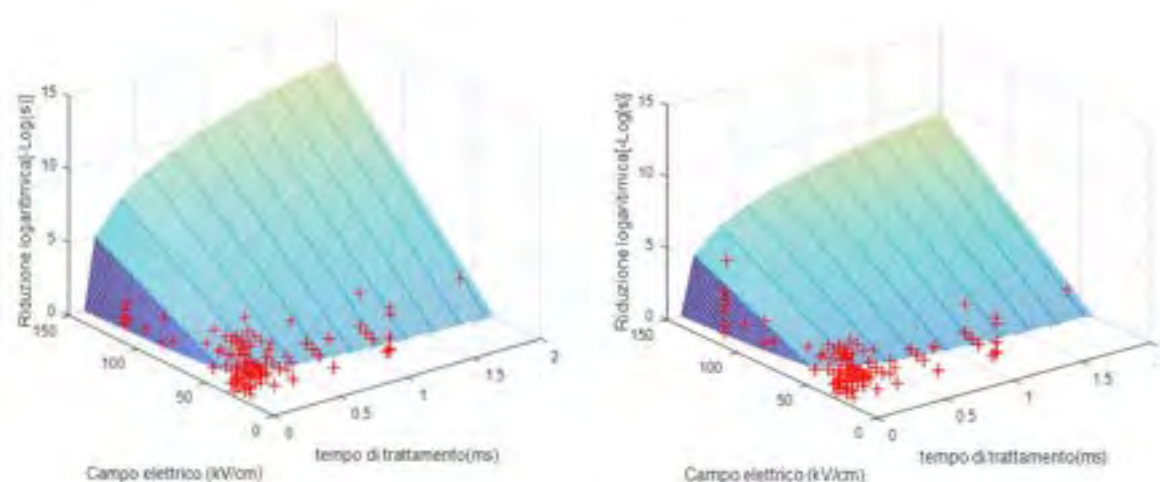


Figura 1.3 Modello di regressione non lineare ottenuto utilizzando il modello proposto iii (a sinistra) e iv (a destra). I '+' indicano i dati sperimentali utilizzati per la regressione.

Nei grafici l'uscita è sempre riportata in termini di riduzione logaritmica, -Log(S), mentre i dati sperimentali sono rappresentati con '+'. I dati considerati prevedono tempi di trattamento minori o al limite uguali a 2 ms, mentre i valori dei campi elettrici applicati si trovano sotto i 120 kV/cm.

Entrambi i grafici sono stati ricavati fissando i valori della conducibilità e della dimensione, nell'equazione del modello, con le medie delle conducibilità e delle dimensioni medie calcolate su tutti i dati in esame.

Nel paragrafo seguente verranno descritte e applicate diverse metodologie per migliorare i risultati ottenuti con questi due modelli, in particolare verrà introdotta la regressione non lineare pesata e verrà studiato il problema degli outliers.

1.5 Risultati della regressione non lineare pesata

Tutti le analisi che sono state fatte per arrivare alla determinazione di un modello generalizzato si sono basate sull'assunzione che ogni singolo dato del data-set fornisce le stesse informazione circa la variazione dell'inattivazione dei microorganismi, cioè ogni dato influisce sulla riduzione logaritmica allo stesso modo o in altre parole con lo stesso peso.

Questo modo di agire è però poco rappresentativo perché alcuni dati possono avere più influenza sulla stima dei parametri e altri meno (essendo stati estrapolati da lavori scientifici validati su un numero differente di dati sperimentali) e quindi ne va tenuto conto. In accordo con quanto detto ogni elemento del data-set deve avere un proprio peso sull'uscita del modello che può essere differente da un altro dato, in particolare se sarà maggiore questo avrà una più grande influenza, mentre se sarà minore avrà meno influenza.

Per poter applicare questa metodologia di regressione è stato necessario andare a recuperare, nei corrispondenti articoli scientifici, il numero di misure eseguite per ogni singolo dato ed utilizzare tale valore come peso per la regressione. Tale valore non sempre era indicato quindi il nostro data-set si è ridotto ulteriormente, arrivando ad un totale di 123 dati.

L'implementazione di questa regressione non lineare, come nei casi precedenti, è stata realizzata in ambiente MATLAB dove si è creato l'algoritmo dei minimi quadrati con l'aggiunta del parametro che tiene conto dei pesi dei dati.

I risultati ottenuti relativi ai coefficienti di regressione, alla stima delle costanti e agli indici di bontà riguardanti i due modelli considerati sono riportati in Tabella 1.10.

Tabella 1.10 Risultati degli indici di bontà e dei coefficienti di regressione per i modelli proposti iii e iv (Hülsheger modificato) dipendenti dalle dimensioni medie dei batteri e dalla conducibilità.

N. modello	R ²	RMSE	Tc [ms]	Ec [kV/cm]	k	W [um-1]	z [s/cm] ⁻¹	Bias Factor	Accuracy Factor	β iniziale
iii	0,48	0,247	0,0289	11,245	38,947	1,0864	17,199	0,2761	5,7092	(0,1 20 3 1 1)
iv	0,463	0,251	0,0091	7,034	69,602	0,9127	-14,506	0,2841	6,89	(0,3 30 5 1 1)

I risultati in tabella, rispetto al caso della regressione non lineare semplice, mostrano un leggero miglioramento per quanto riguarda R² ma un peggioramento per quanto riguarda l'RMSE, infatti i rispettivi valori sono: 0,48 e 0,247 per il terzo modello e 0,463 e 0,251 per il quarto modello. Quest'ultimo contiene una stima di una costante che è negativa e un Accuracy Factor peggiore del terzo modello.

In Fig. 1.3 sono mostrati i grafici dei modelli di regressione ottenuti utilizzando le equazioni dei due modelli sopra enunciati.

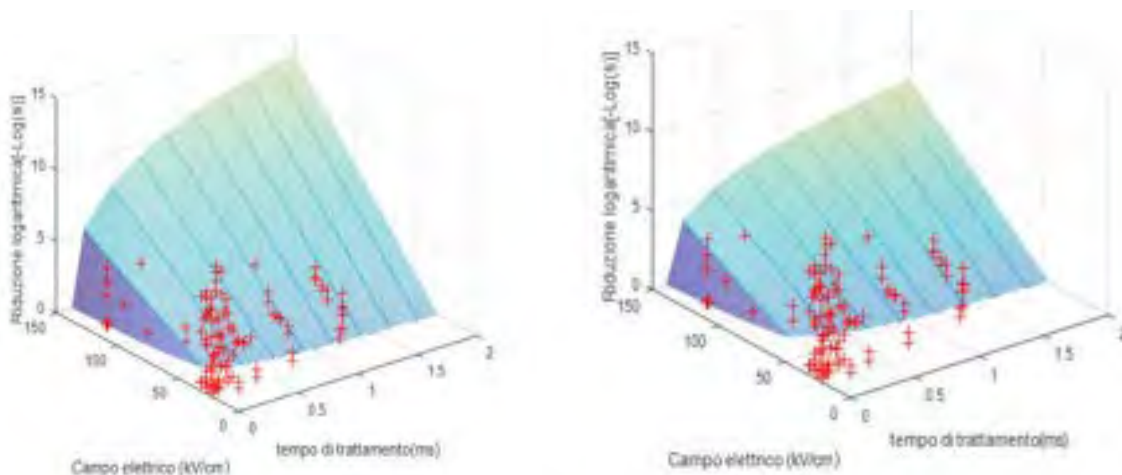


Figura 1.3 Modello di regressione non lineare pesata ottenuto utilizzando il modello proposto iii (a sinistra) e iv (a destra). I '+' indicano i dati sperimentali utilizzati per la regressione.

Questi grafici sono stati ottenuti nello stesso modo di quelli del paragrafo precedente, quindi valgono le stesse considerazioni fatte circa la conducibilità e la dimensione media dei microrganismi.

La differenza tra questi grafici e quelli della regressione non lineare non pesata è impercettibile e anche in questo caso il basso valore di R^2 non permette un'accurata generalizzazione del problema in esame.

Questo tipo di regressione è però molto sensibile agli outliers, cioè a quei dati che possono influenzare negativamente il data-set.

Quindi per ottimizzare il metodo della regressione pesata è essenziale fare un'analisi dei residui ed esaminare i dati per cercare eventuali outliers, questi saranno determinati utilizzando il metodo della distanza di Cook. Nel paragrafo seguente sarà spiegato più in dettaglio tale metodo.

1.6 Analisi dei residui e rimozione degli outliers

Al fine di valutare la bontà del modello e renderlo più efficiente si effettua l'analisi dei residui per individuare e rimuovere eventuali outliers, cioè dati che sono distanti dal resto dei dati raccolti e che possono forviare la regressione.

Il residuo dell'elemento i -esimo è definito come la differenza tra valore osservato e valore previsto:

$$e_i = y_i - \hat{y}_i \tag{1.14}$$

Esso rappresenta la componente dell'osservazione sperimentale che il modello non è in grado di descrivere, cioè a livello ideale descrive la parte aleatoria dell'esperimento.

Questo tipo di test ci permette di avere una conferma sulla validità del modello, in particolare ci permette di verificare se le assunzioni circa la distribuzione normale degli errori o dei residui, l'indipendenza degli errori dalle variabili indipendenti e l'omogeneità delle varianze d'errore sono soddisfatte. In altre parole la distribuzione dei residui deve avere una forma disordinata al fine di considerare questi ultimi errori casuali, altrimenti se hanno un pattern preciso la regressione non cattura correttamente la vera struttura dei dati.

Il metodo più semplice per effettuare l'analisi dei residui è utilizzare metodi grafici, cioè rappresentazioni che ci permettono di comprendere e di individuare più facilmente dati anomali che influenzano negativamente il modello di regressione.

Nel nostro caso verranno presi in considerazione tutti e due i modelli ricavati precedentemente e su questi verranno applicate tutte le metodologie necessarie per rimuovere, dal nostro data-set, i dati identificati come outliers.

Di seguito, in Fig. 1.4, è rappresentato il grafico inerente alla distribuzione dei residui in funzione dei valori predetti dal terzo modello.

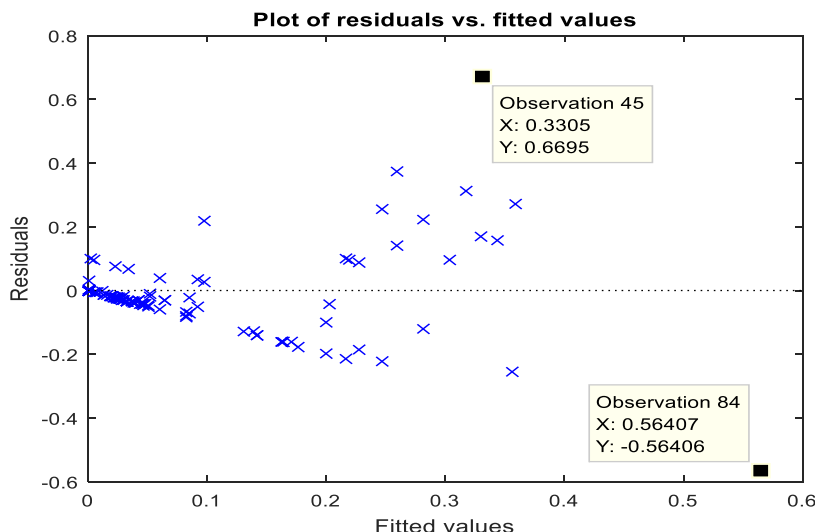


Figura 1.4 Distribuzione dei residui in funzione dei valori predetti nel caso del terzo modello.

La figura mostra che i residui sono distribuiti abbastanza casualmente intorno alla retta orizzontale che rappresenta un errore residuo pari a zero, tuttavia è evidente che le osservazioni 84 e 45 sono lontane da tale retta e quindi potrebbero rappresentare due possibili outliers.

Per verificare se la distribuzione dei residui rappresenta una gaussiana e se questi valori si concentrano vicino alla mediana della campana è stato realizzato in figura 9 il seguente grafico:

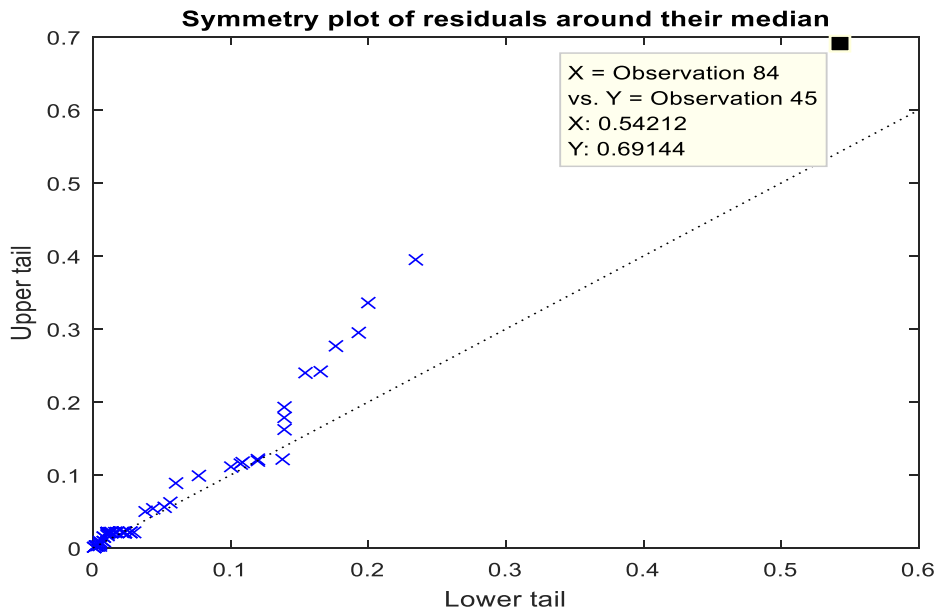


Figura 1.5 Rappresentazione dei residui intorno alla mediana delle distribuzione normale supposta come ipotesi.

Anche qui si nota che alcuni valori sono lontani dalla retta che corrisponde al valore centrale della distribuzione gaussiana e sono distribuiti vicino alla coda superiore della curva. Tra questi è possibile identificare ancora l'osservazione 84 dandoci un'ulteriore conferma circa la sua predisposizione ad essere un dato anomalo.

Tutto questo però non è abbastanza e non conferma in modo unanime che tale dato è un outliers, infatti per avere la certezza assoluta di quanto ipotizzato è necessario ricorrere ad un altro grafico che mostra il valore di leverage, cioè che esprime la lontananza di un dato rispetto al resto dei dati misurandone l'influenza. In Fig. 1.6 è rappresentato tale grafico.

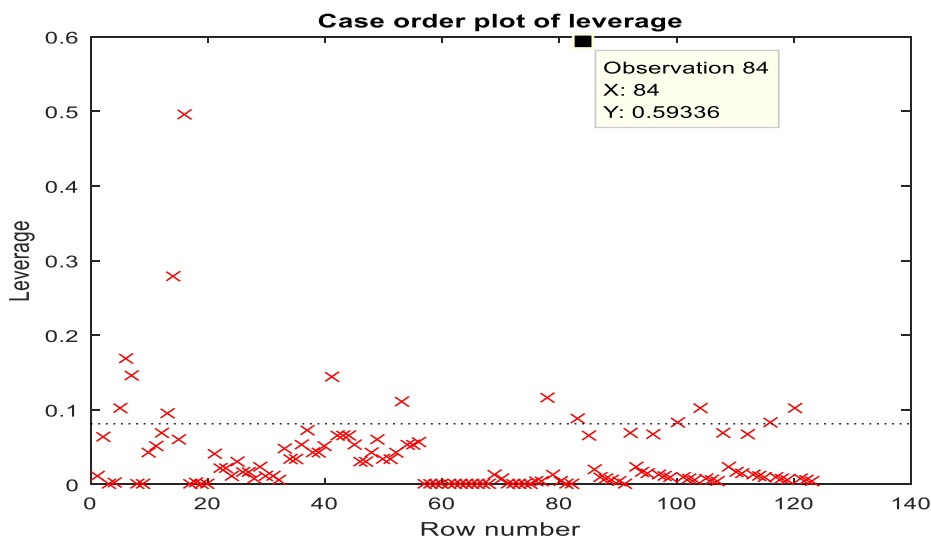


Figura 1.6 Rappresentazione del valore di leverage dei dati.

È evidente che l'osservazione 84 ha un valore distante dal resto dei dati, cioè ha un alto leverage e quindi avrà un maggiore peso sulla regressione finale. La certezza assoluta per la classificazione di questo dato come outliers viene fornita attraverso l'utilizzo della stima della distanza di Cook. Essa è definita in questo modo:

$$D_i = \frac{|\hat{y} - \hat{y}_i|}{p \cdot \hat{\sigma}^2} \tag{1.15}$$

Dove \hat{y} sono le uscite stimate dal modello, \hat{y}_i sono quelle stimate senza l'uso del dato i-esimo, p è l'ordine della regressione e $\hat{\sigma}^2$ è la varianza degli errori calcolata con l'espressione seguente:

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n e_i^2 \tag{1.16}$$

dove n è il numero dei residui.

Tale distanza permette di determinare quali dati sono anomali, infatti alti valori di D identificano un elevato residuo ed un elevato leverage. Vengono considerati outliers quei dati che hanno una distanza D maggiore dell'unità. In Fig. 1.7 è riportato il grafico che rappresenta la distanza di Cook.

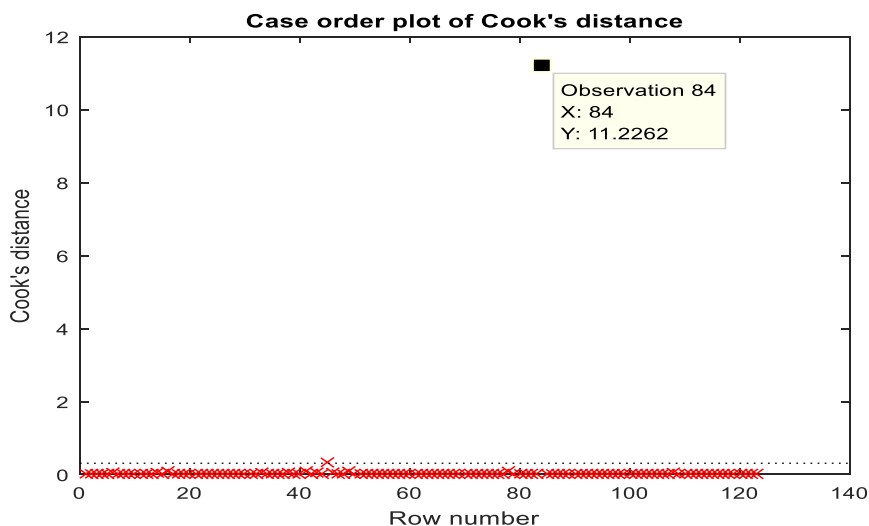


Figura 1.7 Rappresentazione dei dati in termini di distanza di Cook.

L'osservazione 84 si trova ad una distanza molto più grande dell'unità, quindi questo dato è decisamente un outliers e verrà rimosso dal data-set. Una volta eliminato tale dato è stata riapplicata la metodologia sopra descritta e sono stati così individuati altri outliers.

In Fig. 1.8 sono rappresentati i nuovi grafici relativi ai valori di leverage e alla distanza di Cook. Dai grafici risulta chiaro che l'osservazione 83 è un altro outliers perché in termini di leverage ha un valore distante dagli altri e in termini di distanza di Cook ha un valore maggiore di 1.

In realtà nella rappresentazione dei valori di leverage c'è il dato in alto a sinistra che è molto lontano rispetto agli altri, però considerando la stima della distanza questo non compare al di fuori del limite quindi non può essere classificato come dato anomalo.

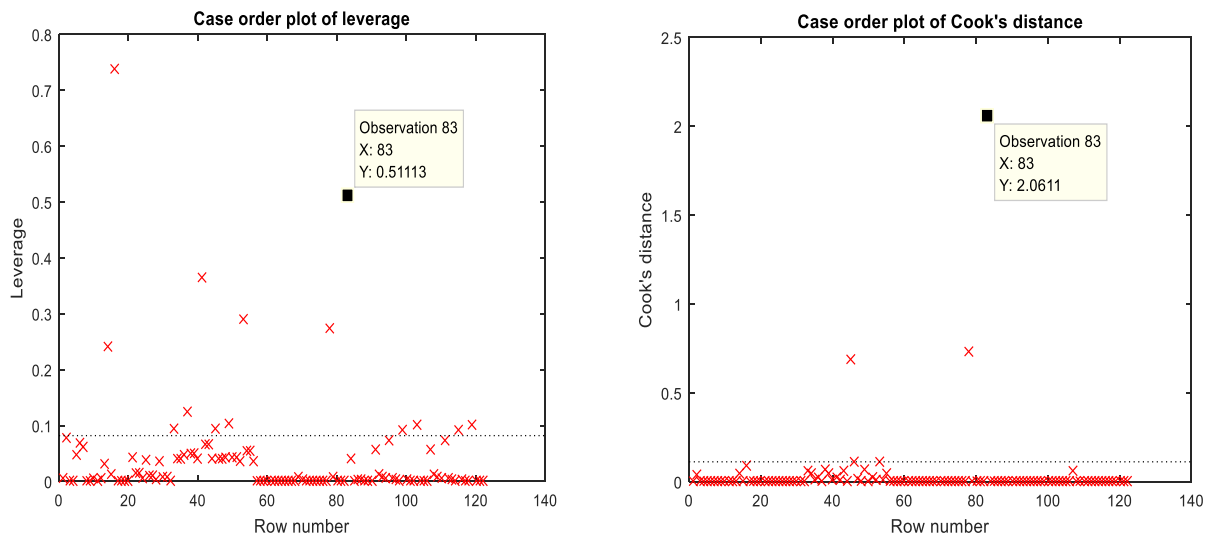


Figura 1.8 Rappresentazione dei valori di leverage (a sinistra) e della distanza di Cook (a destra) e localizzazione dell'outliers relativo all'osservazione 83.

Sia l'osservazione 84 che l'osservazione 83 sono stati rimossi sia per le considerazioni fatte precedentemente e sia perché sono stati ricavati utilizzando un aumento della temperatura d'uscita in aggiunta al metodo dei PEF. Un ultimo outliers relativo al terzo modello è mostrato nella Fig. 1.9.

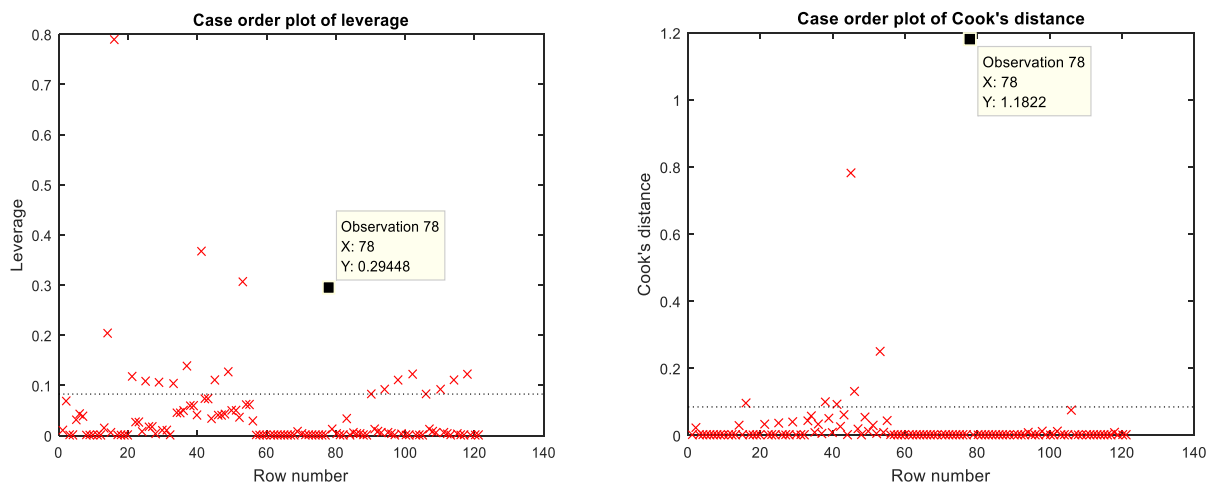


Figura 1.9 Rappresentazione dei valori di leverage (a sinistra) e della distanza di Cook (a destra) e localizzazione dell'outliers relativo all'osservazione 78.

È possibile notare che l'osservazione 78 si trova ad una distanza maggiore dell'unità e quindi è un outliers, tuttavia nel grafico inerente ai valori del leverage c'è il dato in alto a sinistra che, data la sua grande distanza dal resto dei dati, potrebbe anch'esso essere considerato come tale.

Anche l'osservazione 78 è stata eliminata dal data-set, essa faceva riferimento all'articolo scientifico [70] che descriveva l'inattivazione di *Listeria Monocytogenes* nel latte scremato in camera statica utilizzando, in aggiunta ai PEF, un gel tra gli elettrodi, il quale influiva ulteriormente sulla riduzione microbica.

Gli ultimi due outliers sono stati individuati attraverso l'utilizzo del quarto modello utilizzando sempre la stessa tecnica e nelle Fig. 1.10 e 1.11 sono riportati i grafici corrispondenti ai valori del leverage e alla distanza di Cook per entrambi i dati.

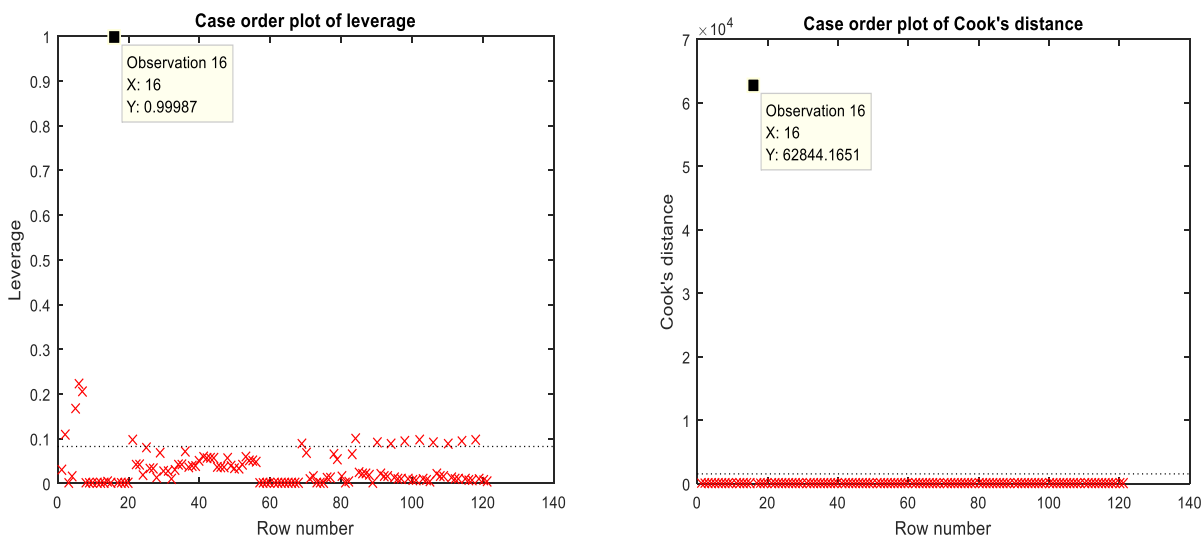


Figura 1.10 Rappresentazione dei valori di leverage (a sinistra) e della distanza di Cook (a destra) e localizzazione dell'outliers relativo all'osservazione 16.

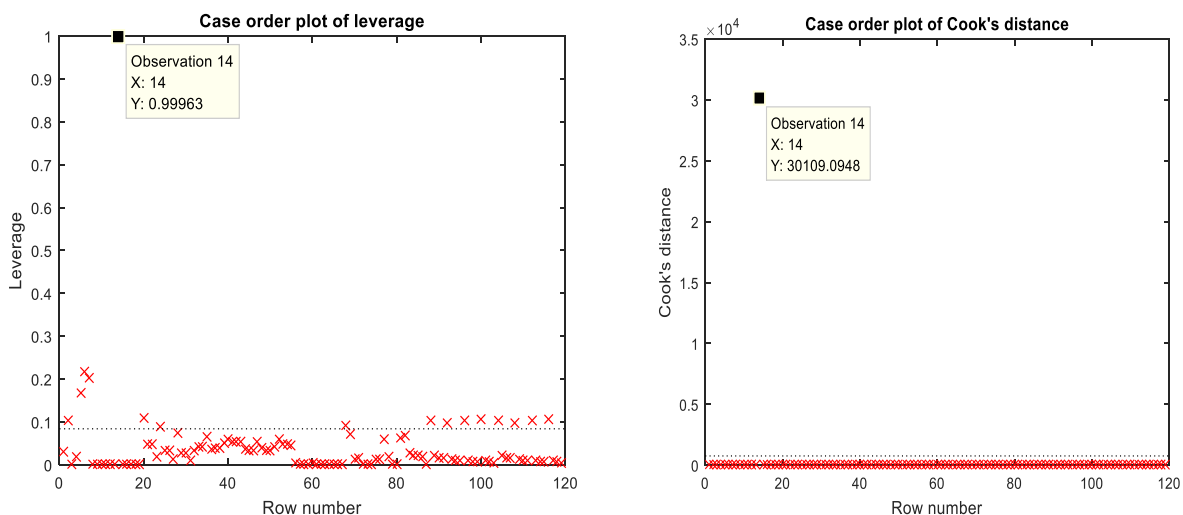


Figura 1.11 Rappresentazione dei valori di leverage (a sinistra) e della distanza di Cook (a destra) e localizzazione dell'outliers relativo all'osservazione 14.

Dai grafici è possibile dedurre che le osservazioni 14 e 16 rappresentano due outliers perché entrambi hanno un valore della distanza di Cook maggiore dell'unità e un alto valore di leverage rispetto al resto dei dati. Tutti e due si riferiscono ad un lavoro scientifico che descrive l'inattivazione batterica nell'acqua utilizzando, in aggiunta ai PEF, una tecnologia ad impulsi magnetici. Quest'ultima rimozione dei dati ha portato ad avere un data-set di 118 elementi e i grafici finali, per il terzo e il quarto modello, inerenti sempre ai valori di leverage e alla distanza di Cook sono rappresentati in Figura 1.12 e 1.13, rispettivamente.

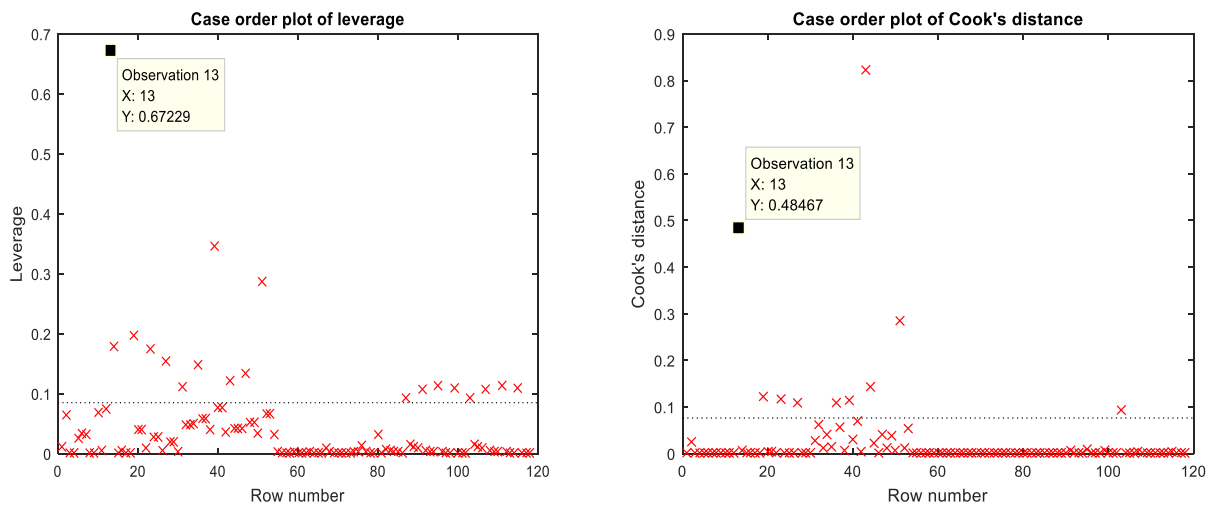


Figura 1.12 Rappresentazione finale dei valori di leverage (a sinistra) e della distanza di Cook (a destra) nel caso del terzo modello.

L'osservazione 13 è evidenziata perché rappresenta il caso di un possibile outliers, dal punto di vista del leverage, ma tale ipotesi è rigettata perché in base alla distanza di Cook esso si trova al di sotto dell'unità e quindi non rappresenta un dato anomalo.

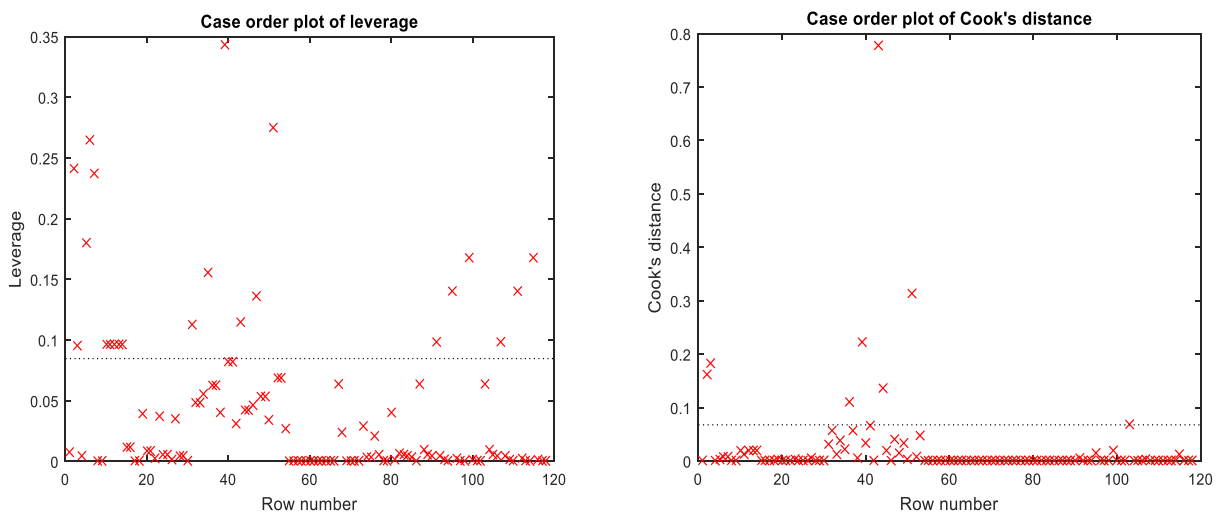


Figura 1.13 Rappresentazione finale dei valori di leverage (a sinistra) e della distanza di Cook (a destra) nel caso del quarto modello.

Con questi ultimi grafici abbiamo concluso l'analisi dei residui, la localizzazione e la rimozione di dati che sono fuorvianti per la regressione dei due modelli, quindi adesso è possibile riapplicare questi ultimi al data-set e vedere gli eventuali miglioramenti.

In Figura 1.14 è riportato l'istogramma finale dei residui che fa trasparire una forma gaussiana, indice di una distribuzione normale, cioè di un fitting abbastanza corretto.

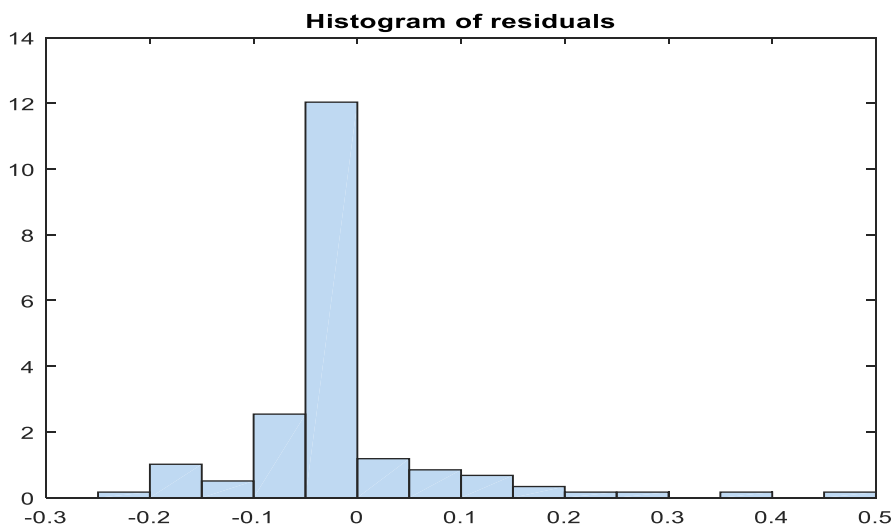


Figura 1.14 Rappresentazione dell’istogramma dei residui.

Nel paragrafo successivo verranno eseguite, con le stesse modalità dei casi precedenti alla rimozione degli outliers, le regressioni per i due modelli cercando ottenere un miglioramento dei risultati e arrivando alla definizione del modello generalizzato finale.

1.7 Definizione del modello generalizzato

In questo paragrafo verrà determinato il modello finale generalizzato capace di operare e descrivere in modo abbastanza esaustivo l’intero data-set indipendentemente dal tipo di alimento e dal tipo di batterio. Nel paragrafo precedente abbiamo descritto le tecniche che ci hanno consentito di eliminare tutti quei dati che rappresentavano erroneamente l’intero insieme, siamo quindi giunti ad un totale di 118 elementi e su questi verranno applicati i due modelli considerati fino ad ora.

I risultati ottenuti sono indicati nella Tabella 1.11.

Tabella 1.11 Risultati ottenuti per gli indici di performance ed i coefficienti di regressione nel caso della regressione non lineare pesata e con la rimozione degli outliers per i due modelli proposti.

N. modello	R ²	RMSE	Tc [ms]	Ec [kV/cm]	k	W [um-1]	z [s/cm] ⁻¹	Bias Factor	Accuracy Factor	β iniziale
iii	0,694	0,193	0,0463	7,659	17,101	0,7221	54,106	0,3146	5,2262	(0,1 20 3 1 1)
iv	0,672	0,2	0,04932	12,4	10,183	1,0860	62,111	0,3445	4,2714	(0,3 30 2 1 1)

La tabella mostra che il terzo modello è migliore dal punto di vista dei coefficienti di regressione, cioè di R² e RMSE con valori di 0,694 e di 0,193, rispettivamente. Per quanto concerne il quarto modello si sono ottenuti valori di 0,672, per R² e 0,2 per RMSE. Le costanti stimate dai modelli sono, per entrambi i casi, congruenti e non presentano valori negativi o troppo elevati. L’ultima considerazione va fatta per gli indici di performance, dove si ha un migliore risultato per il quarto modello ma comunque, in entrambi i casi, sono un po’ lontani dall’unità.

In Figura 1.15 è riportato il grafico di regressione relativo al modello iii, mentre in Fig. 1.16 è riportato quello relativo al modello iv.

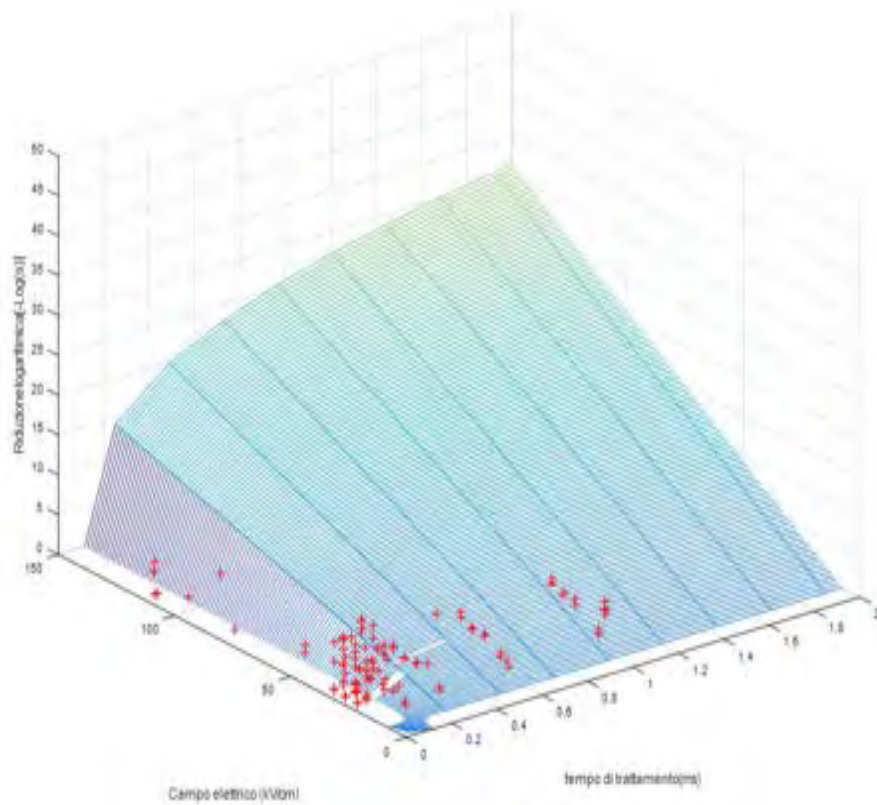


Figura 1.15 Modello di regressione non lineare pesata e con rimozione degli outliers ottenuto utilizzando il modello proposto iii. I '+' indicano i dati sperimentali utilizzati per la regressione.

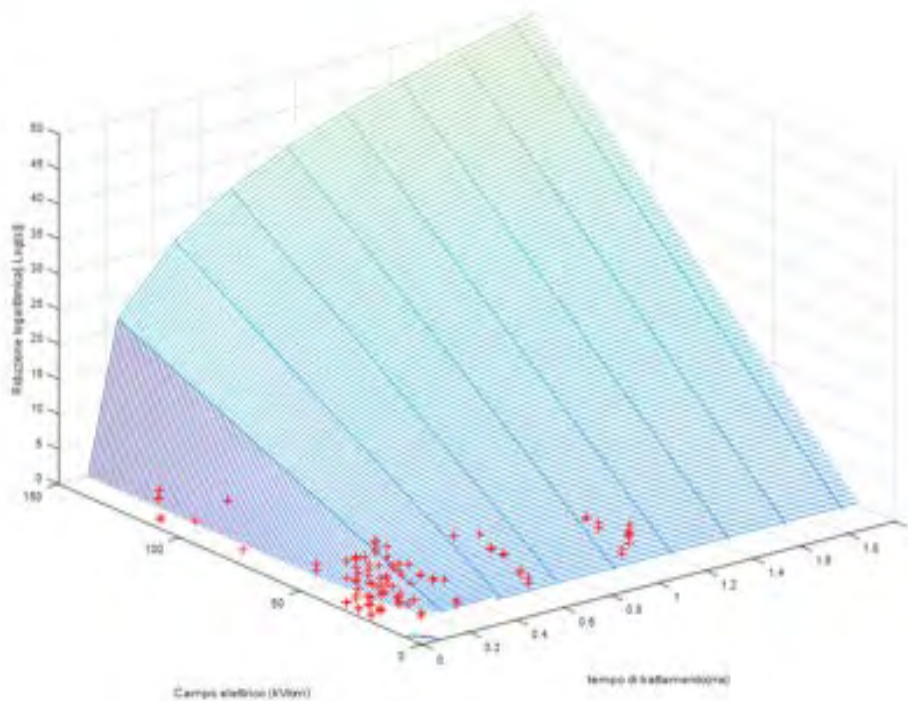


Figura 1.16 Modello di regressione non lineare pesata e con rimozione degli outliers ottenuto utilizzando il modello proposto iv. I '+' indicano i dati sperimentali utilizzati per la regressione.

Entrambi i grafici evidenziano un notevole miglioramento rispetto ai casi delle regressioni senza rimozione degli outliers, i '+' indicano i valori sperimentali ed è possibile notare come questi siano posizionati fino ad un tempo di trattamento massimo di 1 ms.

Sulla base di tutte le considerazioni fatte, il modello iii è quello che rappresenta in modo migliore l'intero insieme di dati e perciò l'espressione finale del modello generalizzato sarà quella dell'equazione 1.12 definita nel paragrafo 1.4.2.

Siccome i dati sono classificati anche in base al tipo di camera, cioè se il trattamento è stato fatto in camera continua o in camera statica, è stata fatta un'ulteriore analisi differenziando i dati in accordo con questa classificazione per verificare la bontà del modello.

Attuando questo tipo di divisione del data-set il risultato ottenuto è stato quello di avere 13 dati per la camera statica e 101 per la camera continua. I dati mancanti sono dovuti al fatto che nei rispettivi articoli non veniva specificato il tipo di trattamento.

In Tabella 1.12 sono mostrati i risultati ottenuti per i due tipi di camera.

Tabella 1.12 Risultati ottenuti per gli indici di performance ed i coefficienti di regressione nel caso della regressione non lineare pesata e con la rimozione degli outliers per i due modelli proposti per trattamento statico e trattamento continuo.

Tipo camera	R ²	RMSE	Tc [ms]	Ec [kV/cm]	k	W [um-1]	z [s/cm] ⁻¹	Bias Factor	Accuracy Factor	β iniziale
Statico	0,982	0,0005	0,0507	25,177	0,317	45,981	9664,9	203,61	203,64	(0,2 30 1 1 1)
Continuo	0,695	0,207	0,0462	8,3148	16,957	0,7207	54,103	0,2877	5,5218	(0,1 20 3 1 1)

La tabella mostra che nel caso della camera statica si hanno ottimi valori dei coefficienti di regressione ma pessimi valori per gli indici di performance. A causa della scarsità dei dati considerati questa analisi non ha una valenza statistica e quindi per essere approfondita è necessario disporre di una quantità di dati molto maggiore.

Per il caso della camera continua si sono ottenuti valori di 0,695 e 0,207 per l'R² e per l'RMSE, rispettivamente e valori delle costanti abbastanza congrui con le aspettative. Gli indici di performance, anche in questo caso, sono lontani dall'unità.

In Fig. 1.17 è riportato l'andamento della regressione del modello nel caso di camera continua, quello relativo al caso della camera statica non è stato realizzato per la scarsa disponibilità dei dati.

La figura mostra una regressione leggermente migliore rispetto al caso senza distinzione di tipo di camera e anche in questo caso i dati sperimentali prevedono un tempo di trattamento al più pari ad 1 ms.

Abbiamo quindi trovato un modello capace di predire l'inattivazione microbica, sull'intero insieme di dati a disposizione, senza la necessità di operare classificazioni per alimento o tipo di microorganismo. I risultati ottenuti sono abbastanza buoni sia in termini di parametri di regressione e sia in termini di costanti stimate, ovviamente tutto ciò avrà una maggiore validità nel caso di una maggiore quantità di dati a disposizione oppure, come verrà illustrato nel capitolo successivo, in seguito a cross-validazione dei risultati ottenuti.

Nel paragrafo seguente verrà introdotto e spiegato il modello non lineare ad effetti misti, in particolare saranno descritte le sue proprietà, le motivazioni riguardo al suo utilizzo e l'applicazione al data-set.

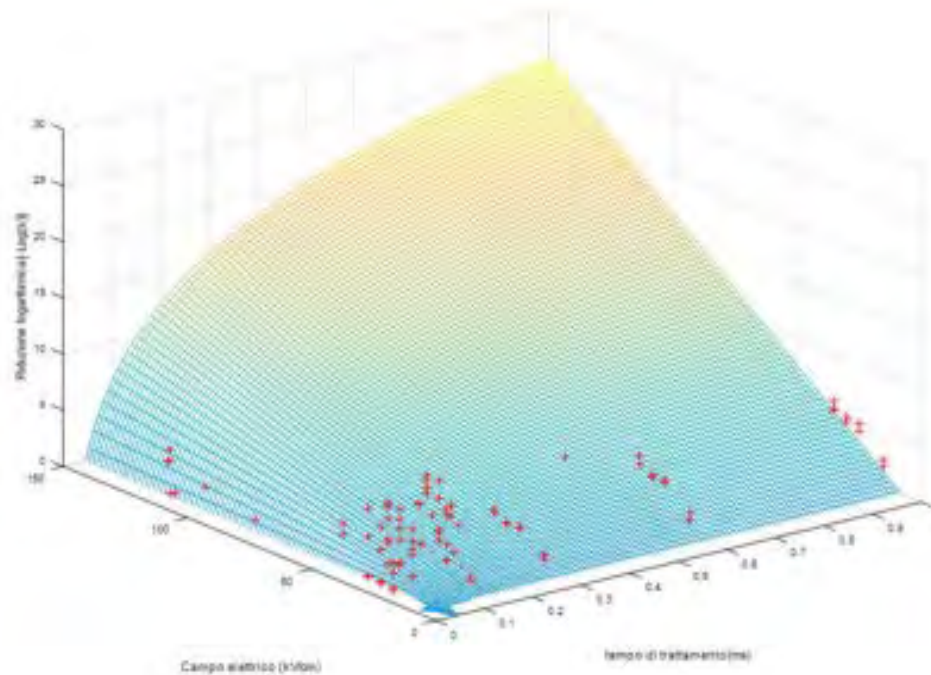


Figura 1.17 Modello di regressione non lineare pesata e con rimozione degli outliers ottenuto utilizzando il modello iii nel caso di camera continua. I '+' indicano i dati sperimentali utilizzati per la regressione.

1.8 Modello non lineare ad effetti misti

Il modello non lineare ad effetti misti è un modello statistico che incorpora gli effetti fissi e gli effetti random. I primi, come suggerisce la parola, non cambiano, cioè sono parametri della popolazione d'interesse che non variano per ogni dato raccolto, i secondi sono variabili random associate ad ogni campione della popolazione. Questo tipo di modello opera bene su data-set di piccola ampiezza e viene utilizzato principalmente quando si ha a che fare con misure ripetute di dati che fanno parte di diversi gruppi all'interno di una popolazione.

Come tutti gli altri modelli di regressione il suo scopo è quello di descrivere una variabile di risposta in funzione delle variabili indipendenti.

Esso è in grado di riconoscere eventuali correlazioni dei campioni all'interno dei sottogruppi, di fornire un ragionevole compromesso con i dati mancanti in un gruppo (si perdono informazioni preziose) eseguendo regressioni dei gruppi separatamente.

I parametri che costituiscono il modello ad effetti misti sono ottenuti sommando gli effetti fissi e gli effetti random. Per concludere questa breve descrizione possiamo dire che tale modello può essere molto utile quando si ha a che fare con data-set che possono essere divisi per gruppi e che sono costituiti da dati ottenuti con misure ripetute. Ogni dato appartenente ad un gruppo è indipendente dagli altri appartenenti a gruppi diversi e fornisce, perciò, un'influenza diversa sul modello, per questo è possibile effettuare tante regressioni quanti sono i gruppi.

Il modo di operare di questo modello permette il suo utilizzo soprattutto in campo farmaceutico ma può essere applicato ogni volta che i data-set presentano le caratteristiche sopra descritte.

Nel primo capitolo sono state elencate tutte le variabili d'influenza per il metodo di conservazione che prevede l'utilizzo dei PEF, tra queste è stata discussa la forma dell'impulso applicato all'alimento. Le varie forme utilizzate, come abbiamo visto, possono essere rettangolari, esponenziali decrescenti, oscillatorie, o bipolari. I dati che costituiscono il data-set sono classificati anche in base alla forma dell'impulso, perciò

vista l'importanza di tale variabile si è pensato di tenerne conto e prenderla in considerazione per garantire una maggiore bontà del modello.

L'insieme dei dati di partenza è stato quello ottenuto dopo la determinazione del modello generalizzato e dopo la rimozione degli outliers, ovvero quello formato da 118 elementi. Essi possono essere distinti e classificati in base alla forma dell'impulso e in particolare può essere fatta una divisione in tre gruppi:

- 1) Forma d'onda quadra,
- 2) Forma d'onda esponenziale,
- 3) Forma d'onda bipolare.

Abbiamo adesso a che fare con un data-set che non è ampio e con i dati divisi per gruppi di appartenenza, inoltre l'inattivazione dei microorganismi e quindi la riduzione all'interno degli alimenti è una variabile che può dipendere dal singolo dato e che può differenziarsi con altri dati, cioè i parametri che la descrivono possono essere dati dalla somma di due effetti: fissi e random.

Le considerazioni appena fatte ci portano a pensare di poter applicare il modello ad effetti misti al nostro data-set raggruppato per forme d'onda.

Tale modello è stato implementato sempre in ambiente Matlab e come quello relativo alla regressione non lineare stima le costanti e fornisce valori d'uscita che comprendono l'RMSE, la matrice di covarianza degli effetti random e il valore di massima verosimiglianza.

I risultati ottenuti sono riportati in Figura 1.18 dove: beta1 è il vettore delle cinque costanti stimate dal modello, cioè Tc, Ec, k, w, z, PSI1 è la matrice di covarianza degli effetti random che rappresenta la variazione di ognuno di essi rispetto agli altri e a se stesso e stats è una struttura che fornisce una panoramica sulla bontà del modello.

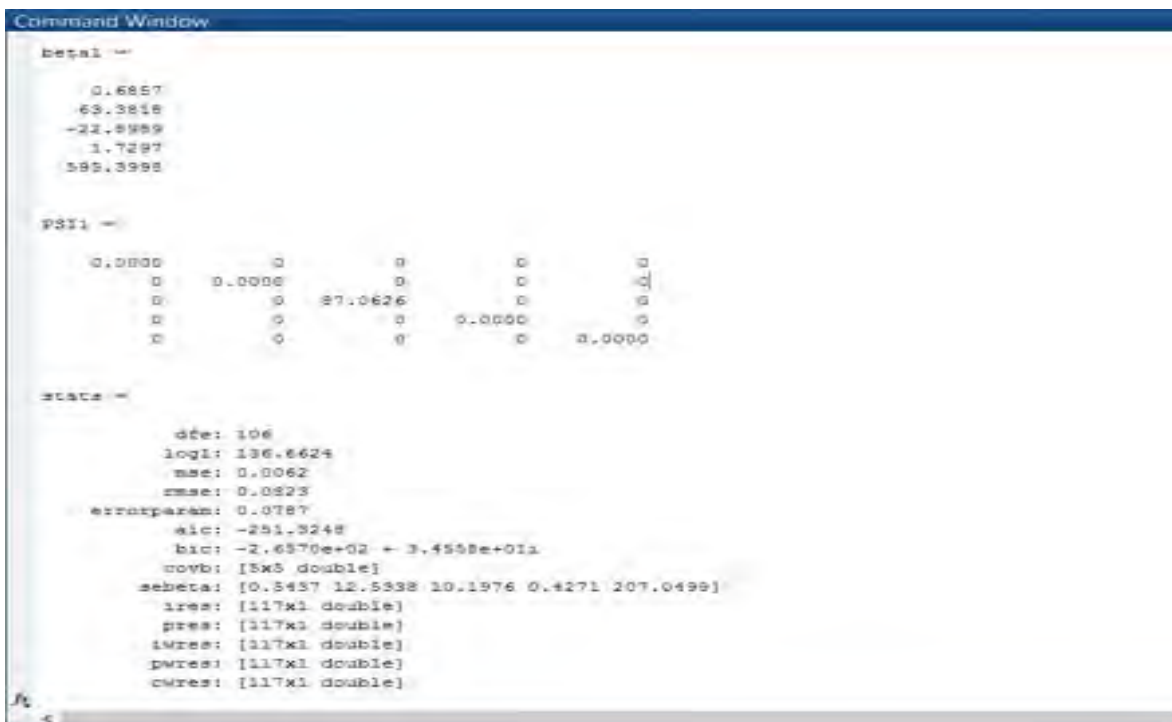


Figura 1.18 Risultati dei valori d'uscita del modello ad effetti misti implementato in Matlab.

La figura mostra che le costanti stimate da questo modello hanno valori diversi da quelli ricavati con il metodo della regressione non lineare pesata, infatti qui compare un valore negativo per k e un valore molto elevato per z evidenziando un totale disaccordo tra i due.

La matrice di covarianza indica che le costanti Tc, Ec, w, z hanno una varianza trascurabile, cioè tali costanti non sono soggette ad effetti random.

Nella struttura relativa a *stats* il valore più importante è quello relativo all'RMSE che in questo caso è di 0,00823, cioè abbastanza buono.

Per migliorare il modello è possibile eliminare gli effetti random che hanno varianza bassa o nulla e quindi rendere indipendenti le costanti relative ad essi.

I risultati ottenuti sono visibili in Figura 23.

```

Command Window

betal =

    0.6857
   63.3806
  -22.8984
    1.7297
   595.3973

PSI1 =

    86.9877

stats =

    dfe: 110
    logl: 136.6623
    mse: 0.0062
    rmse: 0.0808
    errorparam: 0.0787
    aic: -259.3246
    bic: -2.6847e+02 + 2.1991e+01i
    covb: [5x5 double]
    sebeta: [0.5437 12.5331 10.1961 0.4271 207.0455]
    ires: [117x1 double]
    pres: [117x1 double]
    iwres: [117x1 double]
    pwres: [117x1 double]
    cwres: [117x1 double]

fx >>
<

```

Figura 1.19 Risultati dei valori d'uscita del modello ad effetti misti implementato in Matlab dopo la rimozione degli effetti random.

La figura mostra che le costanti stimate sono rimaste quasi invariate subendo una variazione del loro valore trascurabile. La matrice di covarianza si è ridotta ad un solo elemento e l'RMSE è diminuito raggiungendo un valore pari a 0,0808. Nonostante l'ottimo valore ottenuto per l'RMSE l'applicazione del modello ad effetti misti non ha portato risultati incoraggianti per la stima delle costanti di regressione che non rientrano nei range attesi. Un'ulteriore analisi verrà fatta in fase di validazione dove si testeranno le performance e l'accuratezza del modello.

1.9 Validazione del modello generalizzato

Durante questa attività è stato validato il modello generalizzato, precedentemente determinato, attraverso diversi metodi di cross-validazione: holdout e leave-one-out. Tale procedimento è stato applicato al data-set finale composto da 118 elementi e privo di outliers.

La validazione è di fondamentale importanza perché permette di dare un giudizio sulla qualità del modello, in particolare ci permette di confrontare i dati stimati da esso con quelli sperimentali e verificare se c'è un accordo o un disaccordo. In altre parole determina le prestazioni del modello ponendo attenzione sulla riproducibilità dei risultati.

Nei paragrafi seguenti verranno descritti e applicati i due metodi di validazione ponendo particolare attenzione sui risultati ottenuti e facendo un confronto tra i due.

1.9.1 Cross-validazione holdout

Questa metodologia di validazione prevede la suddivisione del data-set in due parti: una destinata all'addestramento del modello (training-set) e una utilizzata per testare il modello (test-set). La partizione dell'intero data-set è stata fatta, sia considerando l'80% dei dati come training e il restante 20% come test e sia considerando il 90% dei dati come training e il restante 10% come test.

Al fine di ottenere una buona partizione dei dati il data-set è stato suddiviso, nel modo sopra descritto, sia per tipo di alimento e sia per tipo di microorganismo. In questo modo ogni elemento relativo ad un particolare alimento o microorganismo è stato considerato sia in training che in test.

Infine è stata eseguita la validazione facendo 100 partizioni diverse in modo da ottenere 100 predizioni diverse al fine di testare e verificare la bontà del modello.

Questo procedimento è stato implementato in ambiente MATLAB eseguendo, prima la partizione random 80/20 e 90/10 dell'insieme dei dati suddivisi per alimento e tipo di microorganismo, poi il training del modello sull' 80% e sul 90% di tutti dati ricongiunti insieme e infine il test sul restante 20% e sul restante 10%.

I risultati ottenuti sono stati espressi attraverso dei Box-Plot che ci permettono di capire univocamente la distribuzione dei coefficienti di regressione R^2 e RMSE nel caso della divisione per alimento e per microorganismo.

In Fig. 1.20 sono riportati i Box-Plot relativi alla partizione 80/20, a sinistra c'è quello inerente a R^2 e a destra quello inerente a RMSE.

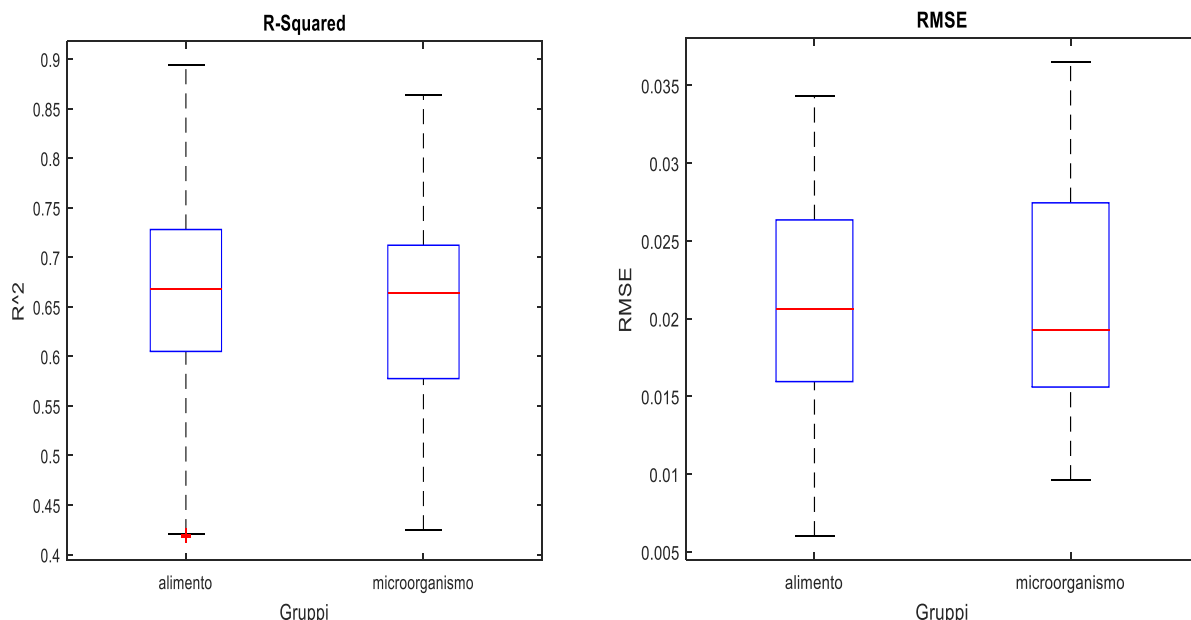


Figura 1.20 Box-Plot dell' R^2 (a sinistra) e dell'RMSE (a destra) ottenuti per le diverse classificazioni di alimento e microorganismo relativo alla partizione 80/20.

Nei grafici sopra riportati, la linea rossa rappresenta la mediana, gli estremi superiori e inferiori del rettangolo rappresentano il primo e il terzo quartile, cioè il 25° percentile e il 75° percentile e le linee in alto e in basso rappresentano il massimo e il minimo valore. Il Box-Plot di sinistra, in particolare quello riferito agli alimenti, presenta due valori estremi, così detti "eccezionali" o semplicemente outliers.

Si nota che nel caso dei Box-Plot relativi ai microorganismi c'è un'asimmetria della distribuzione molto più evidente rispetto a quello relativo agli alimenti, infatti nel caso dell' R^2 la mediana è più spostata verso il terzo quartile mentre nel caso dell'RMSE è spostata verso il primo quartile.

Per dare una maggiore completezza dei risultati ottenuti dalla validazione sono stati calcolati il valore massimo, minimo, la media, la deviazione standard e gli intervalli di confidenza del 95% e del 99% per i due coefficienti di regressione.

Per il calcolo del valore massimo è stato preso il valore maggiore delle 100 validazioni fatte, per il minimo è stato preso il minore, per il valore medio è stata eseguita la media sulle 100 validazioni, mentre per la deviazione standard o scarto quadratico medio S l'equazione utilizzata è stata questa:

$$S = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{(x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \tag{1.17}$$

Dove \hat{x} è la media dei valori, N è il numero di validazioni e x_i è il valore i -esimo.
Per quanto riguarda gli intervalli di confidenza le formule utilizzate per il loro calcolo sono state:

$$\hat{x} \pm z_{\alpha/2} \cdot \frac{s}{\sqrt{N}} \quad [1.18]$$

dove $z_{\alpha/2}$ corrisponde al valore critico, e afferma con probabilità $1 - \alpha$ (livello di confidenza) che l'intervallo di confidenza $\left[\hat{x} - z_{\alpha/2} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}, \hat{x} + z_{\alpha/2} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \right]$ contiene il valore medio vero delle validazioni. In Tabella 1.13 sono riportati i risultati ottenuti per gli intervalli di confidenza relativi alle probabilità di 95% e 99%, il range totale dei valori, la media, la deviazione standard e i valori massimi e minimi nel caso della partizione 80/20.

Tabella 1.13 Sintesi dei risultati ottenuti e stime delle medie, delle deviazioni standard e degli intervalli di confidenza per i coefficienti di regressioni relativi alla partizione 80/20 e classificati per alimento e microorganismo.

Tipo di suddivisione		Numero delle validazioni N	Media \hat{x}	Scarto quadratico medio s	Intervallo di confidenza $I_{95\%}$	Intervallo di confidenza $I_{99\%}$	Range totale [min - max]
Alimento	R^2	100	0,6612	0,1026	[0,6411 – 0,6813]	[0,6347 – 0,6877]	[0,4179 – 0,894]
	RMSE	100	0,0212	0,0063	[0,0199 – 0,0224]	[0,0195 – 0,0228]	[0,006 – 0,0343]
Microorganismo	R^2	100	0,6557	0,108	[0,6345 – 0,6768]	[0,6278 – 0,6835]	[0,4244 – 0,8636]
	RMSE	100	0,021	0,0066	[0,0197 – 0,0222]	[0,0192 – 0,0227]	[0,0096 – 0,0365]

La tabella mostra che il valore medio di R^2 , nel caso degli alimenti, è di 0,6612 ed è leggermente superiore a quello relativo ai microorganismi che è invece di 0,6557, per l'RMSE i due valori sono più o meno simili e sono di 0,0212 e 0,021, rispettivamente. Il range totale ci indica che il valore massimo di R^2 è stato di 0,894 per gli alimenti e di 0,8636 per i microorganismi mentre i valori minimi sono stati di 0,4179 e 0,4244, rispettivamente. Per quanto riguarda l'RMSE i valori massimi sono stati di 0,0343 per gli alimenti e 0,0365 per i microorganismi, mentre i minimi sono stati di 0,006 e 0,0096. Gli intervalli di confidenza con probabilità del 95% ci indicano che per i valori medi veri di R^2 e RMSE il range è inferiore rispetto a quelli con probabilità del 99%, in accordo con le aspettative. Il valore dello scarto quadratico medio esprime la dispersione dei valori di R^2 e di RMSE intorno alla stima della loro media e nel caso degli alimenti è di 0,1026 per l' R^2 e 0,0063 per l'RMSE, mentre per i microorganismi risultano essere di 0,108 e 0,0066.

Facendo riferimento ai risultati ottenuti il modello riesce a descrivere abbastanza bene i dati del nostro data-set anche se esso non è molto ampio, infatti in alcuni casi si sono ottenute regressioni con R^2 vicini a 0,9 e in altri regressioni con R^2 dell'ordine dello 0,4, indicando in quest'ultima circostanza uno scarso training del modello e quindi una più difficile predizione per i dati in test. Questo si è verificato per tutti quegli insiemi di alimenti o microorganismi che contenevano pochi elementi e che quindi non consentivano, con questo tipo di partizione, una buona divisione per i dati di training e per quelli di test.

Per cercare di migliorare i risultati e quindi evitare che la verifica dei dati in test venisse fatta su un training-set di pochi dati, è stata fatta una partizione di 90/10 in modo da avere più dati per l'addestramento del modello e quindi ottenere risultati migliori in fase di test. Laddove i dati di una particolare classe di alimento o di microorganismo erano pochi, questi sono stati inseriti tutti in training al fine di valutare la bontà e le performance su un training-set almeno sufficiente.

Anche in questo caso, come quello della partizione 80/20, sono stati realizzati i grafici dei Box-Plot relativi ai coefficienti di regressione, R^2 e RMSE, per gli alimenti e per i microorganismi. Essi sono rappresentati in FIG. 1.21 dove a sinistra c'è quello inerente a R^2 , mentre a destra c'è quello inerente a RMSE.

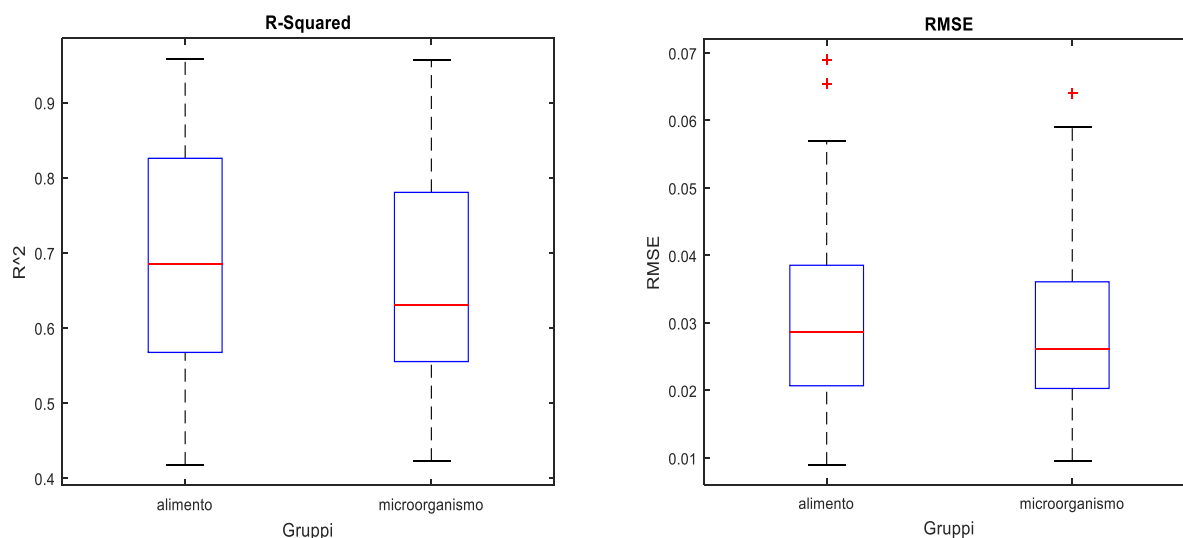


Figura 1.21 Figura 25. Box-Plot dell'R² (a sinistra) e dell'RMSE (a destra) ottenuti per le diverse classificazioni di alimento e microorganismo relativo alla partizione 90/10.

I Box-Plot sopra riportati mostrano che la variabilità di R² per gli alimenti e per i microorganismi si estende verso valori più alti rispetto ai Box-Plot relativi alla partizione 80/20 e così anche quelli relativi alla variabilità di RMSE. Si deduce quindi che c'è un miglioramento rispetto ai casi precedenti in termini di R² mentre c'è un lieve peggioramento in termini di RMSE. Prendendo in considerazione i Box-Plot relativi ai microorganismi si osserva che questi presentano un'asimmetria maggiore rispetto a quelli degli alimenti, inoltre andando ad analizzare la figura che riguarda l'RMSE si osserva la presenza di 3 valori estremi o outliers: 2 per gli alimenti e uno per i microorganismi.

Come nel caso della partizione precedente anche in questa situazione si sono calcolati i valori massimi, minimi, le medie, le deviazioni standard o scarti quadratici medi S, i range totali e gli intervalli di confidenza con probabilità del 95% e 99% dei coefficienti di regressione nei due casi riguardanti gli alimenti e i microorganismi.

La Tabella 1.14 riporta la sintesi dei risultati ottenuti con le stesse metodologie ed equazioni presentate e discusse precedentemente.

Tabella 1.14 Sintesi dei risultati ottenuti e stime delle medie, delle deviazioni standard e degli intervalli di confidenza per i coefficienti di regressioni relativi alla partizione 90/10 e classificati per alimento e microorganismo

Tipo di suddivisione		Numero delle validazioni N	Media \hat{x}	Scarto quadratico medio s	Intervallo di confidenza I _{95%}	Intervallo di confidenza I _{99%}	Range totale [min - max]
Alimento	R ²	100	0,6945	0,14513	[0,666 – 0,7229]	[0,657 – 0,7319]	[0,4175 – 0,958]
	RMSE	100	0,03035	0,0129	[0,0278 – 0,0329]	[0,027 – 0,0337]	[0,009 – 0,069]
Microorganismo	R ²	100	0,6642	0,1417	[0,6364 – 0,692]	[0,6276 – 0,7008]	[0,4227 – 0,956]
	RMSE	100	0,0297	0,0126	[0,0272 – 0,0322]	[0,0264 – 0,0329]	[0,0096 – 0,064]

La tabella mostra che il valore medio di R², nel caso degli alimenti, è di 0,6945 cioè maggiore di quello ottenuto nella partizione 80/20, mentre quello corrispondente ai microorganismi è di 0,6642, cioè minore di quello della partizione precedente. Per quanto concerne il valore medio di RMSE, questo è aumentato ed è dell'ordine dello 0,003 per entrambi i casi. Gli scarti quadratici medi sono anch'essi aumentati leggermente evidenziando una maggiore dispersione dei valori di R² e RMSE intorno alla stima della loro media. Gli intervalli di confidenza sono anch'essi più ampi con limiti superiori, nel caso di R², che toccano e

superano lo 0,7. Come ci si aspettava quelli relativi alla probabilità del 99% sono più estesi rispetto a quelli del 95%.

I valori massimi di R^2 ottenuti sono stati di 0,958 per gli alimenti e di 0,956 per i microorganismi, mentre i valori minimi sono stati di 0,4175 e di 0,4227, rispettivamente. I valori massimi di RMSE sono stati di 0,069 per gli alimenti e 0,064 per i microorganismi, mentre i minimi sono stati di 0,009 e 0,0096, rispettivamente. Questi risultati evidenziano maggiori performance del modello e una maggiore bontà in termini di R^2 , infatti esso mediamente riesce ad arrivare ad un valore di 0,7 fino a raggiungere un massimo di 0,95 per la divisione riguardante gli alimenti, mentre peggiora rispetto al caso 80/20 per i microorganismi. Questo è dovuto al fatto che nel data-set c'è una maggiore varietà di microorganismi rispetto a quella degli alimenti e quindi le partizioni possono portare ad una quantità di dati abbastanza scarsa in fase di training.

Tuttavia anche in questa situazione si sono ottenuti, in alcuni casi, valori di R^2 dell'ordine di 0,4 evidenziando ancora l'insufficienza di dati disponibili su cui effettuare il training del modello.

Questo tipo di validazione non è stato applicato al modello ad effetti misti visto che una partizione dei gruppi caratterizzava una scarsa quantità dei dati in training e in test.

Nel paragrafo seguente verrà descritto un altro tipo di validazione che verrà applicata ad entrambi i modelli in modo da avere una stima della loro accuratezza e poter effettuare un eventuale confronto.

1.9.2 Leave-one-out

Un altro metodo che ci permette di testare la bontà del modello e le sue performance è il metodo del leave-one-out, letteralmente "lasciane uno fuori". Esso ci permetterà di avere un'altra stima sul modo di operare del modello e ci permetterà di fare un confronto tra i risultati che otterremo e quelli che abbiamo ottenuto nel paragrafo precedente.

Prima di applicare tale metodo bisogna descrivere il suo funzionamento che consiste nel calcolare il modello con l'esclusione di un dato alla volta, predicendo i valori della risposta per tutti i dati esclusi dal modello. Prendendo in considerazione il nostro data-set costituito da 118 elementi i passi eseguiti per applicare questo tipo di validazione sono i seguenti:

- Si elimina il primo elemento,
- Si applica il modello ai 117 elementi restanti e si stimano così le sue costanti,
- Attraverso l'utilizzo dell'equazione del modello e della stima delle costanti si calcola il valore dell'uscita dell'elemento eliminato,
- Si reinserisce il primo elemento nel data-set e si elimina il secondo elemento,
- Si riapplica il modello ai 117 elementi restanti e si stimano le sue costanti,
- Si calcola il valore d'uscita del secondo elemento e lo si reinserisce di nuovo nel data-set,
- Si prosegue eliminando uno alla volta tutti gli elementi del data-set fino al 118° e si calcolano il loro valore d'uscita reinserendoli di volta in volta nell'insieme

Questa procedura è stata implementata in MATLAB attraverso un opportuno codice che iterava sul data-set.

Una volta ricavate le uscite di tutti gli elementi lasciati fuori sono stati calcolati i coefficienti di regressione R^2 e RMSE attraverso l'applicazione delle formule 2.6 e 2.7.

I valori ottenuti sono stati di 0,6418 per R^2 e 0,0094 per RMSE.

Confrontando questi risultati con quelli ottenuti con il metodo di cross-validation per le partizioni 80/20 e 90/10 si nota un peggioramento dei valori, infatti l' R^2 è diminuito, mentre l'RMSE è aumentato.

Le motivazioni di questi esiti possono essere ricondotte al fatto che la validazione del modello è fatta su un dato alla volta e il training sui restanti dati, in altre parole considerando che il nostro data-set non è molto ampio quello che può succedere è che la stima delle costanti può non essere congrua con il dato validato e quindi possono fornire una predizione sbagliata e lontana dal valore sperimentale.

Questo metodo è stato applicato anche al modello ad effetti misti, in particolare è stato testato ogni gruppo del data-set seguendo i passi descritti precedentemente.

Inizialmente si è partiti con l'intento di testare tutti e tre i gruppi relativi alle diverse forme d'onda ma nella maggior parte dei casi, anche cambiando i parametri della funzione che implementa il modello, non si riusciva ad ottenere una convergenza, per questo sono stati considerati solo due gruppi.

Nonostante ciò i valori di R^2 ricavati erano molto bassi e altre volte erano privi di significato statistico a causa della bassa numerosità del campione, perciò non è stato possibile effettuare un confronto tra le validazioni dei due modelli.

Basandoci sui risultati ottenuti possiamo dedurre che il modello generalizzato riesce a descrivere abbastanza bene i dati del nostro data-set, infatti i valori ottenuti in fase di validazione sono un indice di buon accordo tra le uscite predette dal modello e quelle misurate sperimentalmente.

1.10 Conclusioni e sviluppi futuri

Con la prima attività della presente annualità è stato determinato e validato un nuovo modello cinetico generalizzato, basato sulla tecnologia PEF, capace di predire in modo abbastanza esaustivo ed accurato la riduzione logaritmica dei microorganismi all'interno degli alimenti in fase liquida, in funzione della durata del trattamento, del valore di picco del campo elettrico applicato, della dimensione media dei microorganismi da trattare e della conducibilità dell'alimento.

L'idea di considerare altre variabili d'influenza oltre a quelle standard, utilizzate dai modelli esistenti, è stata determinante per il risultato finale, infatti l'inserimento della dimensione dei microorganismi e della conducibilità degli alimenti, all'interno dell'equazione del modello di Hülshager, ci ha consentito di svolgere un'analisi univoca dei dati a nostra disposizione e di determinare l'equazione definitiva.

La presenza di dati anomali all'interno del data-set ha influito molto sui primi risultati dei coefficienti ottenuti con la regressione non lineare e perciò per individuarli è stata eseguita l'analisi dei residui. Essa ha permesso una prima localizzazione degli outliers che è stata poi confermata attraverso il metodo della distanza di Cook. Dopo analisi dei lavori in letteratura corrispondenti ai dati identificati come outliers è stato possibile verificare che questi corrispondevano a condizioni di trattamento particolari, come ad esempio trattamenti misti PEF e termici. Una volta rimossi i dati anomali e ottenuto un nuovo data-set, sono stati studiati e utilizzati due metodi di regressione non lineari diversi per ottenere valori più alti di R^2 e valori più bassi di RMSE, in particolare sono stati applicati il metodo della regressione non lineare pesata e il metodo degli effetti misti.

Il primo è stato implementato andando a considerare, nella regressione non lineare, il numero di misure effettuate dai diversi lavori scientifici per ogni valore della riduzione logaritmica e riportato nel data-set, cioè è stato dato un peso ad ogni dato. Il secondo è stato implementato considerando effetti fissi ed effetti random applicati alle costanti da stimare.

I risultati ottenuti con la regressione pesata sono stati soddisfacenti, infatti i valori di 0,694 per R^2 e di 0,193 per RMSE indicano una buona approssimazione dei dati con la curva di regressione, inoltre i valori delle costanti stimate sono stati congrui con le aspettative, diverso è stato il caso del modello ad effetti misti che ha riportato valori delle costanti di regressione elevati o negativi e quindi poco attendibili. Le costanti di regressione, infatti, hanno significato fisico e devono rientrare entro certi range di valori.

La stima della bontà e delle performance del modello sono state effettuate utilizzando i metodi di validazione esistenti, ovvero la cross-validazione holdout ed il leave-one-out. La prima è stata applicata al modello generalizzato con il metodo della regressione pesata e i risultati finali sono stati buoni, infatti per la partizione del data-set con 80/20 si sono ottenuti valori medi di R^2 di 0,6612 e di 0,6557 per gli alimenti e per i microorganismi, rispettivamente, e valori di RMSE di 0,0212 e 0,021, mentre per la partizione 90/10 i valori di R^2 sono stati di 0,6945 per gli alimenti e di 0,6642 per i microorganismi e valori di RMSE di 0,03035 e 0,0297.

La validazione tramite l'uso del metodo leave-one-out è stata applicata ad entrambi i metodi e i risultati ottenuti hanno evidenziato ancora una buona accuratezza del metodo con la regressione pesata che ha raggiunto valori di 0,6418 per R^2 e 0,0094 per RMSE, mentre i risultati per il modello ad effetti misti hanno evidenziato una predizione sbagliata dei dati stimati e quindi una scarsa bontà del metodo.

Tali valori evidenziano la bontà del modello generalizzato con il metodo della regressione non lineare pesata mentre d'altra parte forniscono una bassa efficienza per il modello ad effetti misti.

In conclusione siamo riusciti a trovare e a testare, partendo da modelli esistenti, un modello cinetico generalizzato, per la tecnologia dei campi elettrici pulsati, in grado di studiare l'inattivazione dei microorganismi all'interno degli alimenti.

Il modello ricavato può essere ulteriormente testato e valutato considerando altri data-set, in particolare insieme di dati più grandi e più vari, inoltre in questo caso sarebbe possibile riapplicare il modello ad effetti misti per vedere possibili miglioramenti. Inoltre, sarà possibile testare espressioni diverse del modello cinetico sulla base, ad esempio, di espressioni descritte nel paragrafo 1.3 (punto 1), verificandone eventuali miglioramenti in termini di bontà della regressione ottenuta.

2 Analisi di alcune caratteristiche fisiche e chimiche di diversi liquidi al variare della temperatura

2.1 Breve introduzione e motivazioni

Abbiamo quantificato nel paragrafo precedente, due parametri di processo fondamentali: l'intensità di picco del campo elettrico e la durata totale del trattamento, mediante regressione di dati empirici raccolti. Un campo elettrico, E , applicato per un tempo, T determina l'inattivazione microbica, ma come può essere sostenuto un campo elettrico nei prodotti da trattare? Sappiamo che la risposta a questa domanda, nel caso di alimenti liquidi (equiparabili a soluzioni elettrolitiche) consiste nell'applicazione di un campo elettrico variabile nel tempo ($f > 0$). Ma qual è la frequenza del campo elettrico che dobbiamo applicare? Dal punto di vista applicativo, è importante verificare la risposta del prodotto proprio a questo campo elettrico variabile, questa risposta ne definisce le cosiddette caratteristiche dielettriche. Per sostenere un campo elettrico immagazzinando energia (e non dissipandola come nel caso di materiali conduttivi), al livello microscopico è necessario manifestare, in risposta ad esso, prevalentemente fenomeni di polarizzazione (posizionamento di cariche mediante rotazione, traslazione limitata e/o deformazione) rispetto ai fenomeni di conduzione (moto medio di cariche reali o virtuali) che invece causerebbero dissipazione di energia.

Le equazioni di campo di Maxwell descrivono il rapporto tra i campi elettrici e magnetici che variano nel tempo. Poiché entrambi i campi possono comportare l'immagazzinamento o la dissipazione di energia nel materiale, sono necessarie due coppie di parametri per caratterizzare una proprietà dielettrica di un materiale. Nell'intervallo di frequenza di interesse e nel caso di materiali lineari, omogenei e isotropi, si fa riferimento alla permittività complessa ϵ^* e alla permeabilità μ^* come parametri fondamentali per la descrizione macroscopica delle proprietà dielettriche di mezzi esposti a campi sinusoidali.

Nella pratica, ad eccezione dei materiali ferromagnetici, la polarizzazione magnetica è generalmente molto debole, in modo tale che la permeabilità complessiva μ^* possa essere sostituita dalla permeabilità magnetica dello spazio libero μ_0 . Nel caso di interesse, la maggior parte dei prodotti biologici e agricoli sono materiali diamagnetici con una risposta molto bassa ai campi magnetici. Tuttavia essi, a basse frequenze, presentano un comportamento di tipo conduttivo. Fortunatamente, per i nostri scopi, anche un materiale conduttore o semiconduttore ad alta frequenza può presentare proprietà dielettriche significative.

Per quantificare l'effetto di fenomeni conduttivi all'interno del liquido da trattare è necessario valutarne la conducibilità. Questa, soprattutto nel caso del vino, potrebbe variare in relazione a variabili di influenza come la temperatura e, soprattutto nel caso del vino, in relazione allo stato di vinificazione del vino stesso. In letteratura non sono presenti studi che hanno effettuato analisi di conducibilità su campioni di vino. Questo studio è stato affrontato durante la presente annualità utilizzando campioni di vino locali calabresi ottenuti mediante fermentazione naturale in botti di vino. Come interesse aggiuntivo, i valori di conducibilità ricavati potranno essere utili per aggiungere, al modello cinetico realizzato, i dati relativi al vino, ed ottenere così delle stime di valori di picco del campo elettrico e della durata del trattamento in relazione al microrganismo da inattivare.

2.2 Fenomeni di conduzione in soluzioni elettrolitiche

In generale, la conducibilità si definisce definita come l'inverso della resistività, ρ , che appare nella seconda legge di Ohm, $R = \rho l / S$, dove R indica la resistenza elettrica del conduttore, l la sua lunghezza e S la sezione. I materiali possono essere classificati in conduttori, semiconduttori e isolanti, secondo la loro conducibilità elettrica, σ . I conduttori presentano un valore di σ dell'ordine di $10^6 \div 10^7 \text{ (ohm}\cdot\text{m)}^{-1}$, per i semiconduttori σ è dell'ordine di $10^1 \div 10^5 \text{ (ohm}\cdot\text{m)}^{-1}$ mentre gli isolanti sono caratterizzati da $\sigma \leq 10^{-10} \text{ (ohm}\cdot\text{m)}^{-1}$. La conducibilità di un materiale dipende dalla temperatura. Per materiali isolanti e

semiconduttori essa aumenta con l'aumentare della temperatura. Nel caso dei superconduttori, questa aumenta enormemente al di sotto di una specifica temperatura critica.

La conducibilità elettrica può anche essere definita per soluzioni d'elettroliti: in questo caso la corrente è data dal moto di ioni positivi e negativi che sottoposti a un campo elettrico si muovono ordinatamente nella soluzione. La conduzione di ioni si osserva anche allo stato solido, come, per es., nei cristalli ionici e negli elettroliti solidi. La conduzione di corrente è osservata, in determinate condizioni, anche in alcuni gas. Mentre nei metalli i fenomeni di conduzione non comportano modificazioni dello stato chimico, ciò avviene per le soluzioni elettrolitiche. Nel caso di presenza in un circuito di tratti costituiti da soluzioni elettrolitiche siamo di fronte a meccanismi di conduzione differenti: prevalentemente ionica nella soluzione, elettronica negli altri tratti. La conducibilità di un elettrolita è legata alla presenza di ioni, quindi alla loro concentrazione e grado di mobilità. Gli elettroliti possono essere classificati in due macrogruppi [7]:

- a) elettroliti forti: comprendono sia gli acidi forti che le basi forti che hanno una conducibilità dell'ordine di 10 S/m. Questa risulta essere proporzionale alla concentrazione di soluto in modo evidente. La deviazione dalla legge lineare è generalmente ascrivibile alle interazioni ioniche;
- b) elettroliti deboli: comprendono sia gli acidi deboli che le basi deboli che hanno una conducibilità dell'ordine di 0,01 S/m. In questo caso, la conducibilità risulta essere poco variabile con la concentrazione.

2.3 Il conduttimetro COND70

La conducibilità di soluzioni elettrolitiche può essere misurata applicando una corrente alternata (I), fra due elettrodi immersi in una soluzione e misurando la relativa tensione (V). Durante il processo, i cationi migrano verso l'elettrodo negativo, e gli anioni verso quello positivo. La soluzione agisce come un conduttore elettrico.

Utilizzando il conduttimetro XS COND70 [8] sono state effettuate misure di conducibilità elettrica (EC, electric conductivity) al variare della temperatura. Oltre alla conducibilità, lo strumento permette ottenere misure di residuo fisso (o TDS, total dissolved solid), salinità (S), e temperatura.

La conducibilità elettrica abbiamo detto essere un parametro che indica il contenuto di sali disciolti nell'acqua, mentre per TDS si intende il grado di mineralizzazione della soluzione, cioè il quantitativo di sostanza solida perfettamente secca che rimane dopo l'evaporazione di una quantità nota di acqua. La salinità di riferisce alla quantità totale di sali disciolti in soluzione.

I solidi totali disciolti costituiscono le sostanze disciolte come i sali minerali, le sostanze chimiche aggiunte, la polvere, la terra e, ad esempio, nell'acqua delle piscine, le sostanze introdotte dai bagnanti (sudore, urine, creme, ecc.).

Nel caso dell'acqua, si possono distinguere in base alla quantità di sali presenti:

- acque minimamente mineralizzate: ≤ 50 mg/l
- oligominerali: da 50 a 500 mg/l
- mediamente mineralizzate: da 500 a 1500 mg/l
- ricche di sali: ≥ 1500 mg/l (valore limite per il consumo umano)

Una volta immersa la parte con la sonda di lettura in acqua i valori che verranno visualizzati potranno essere espressi, a seconda dello strumento, in due modi:

- EC con unità di misura espressa in micro- o milliSiemens per centimetro ($\mu\text{S}/\text{cm}$ o mS/cm spesso abbreviati con il solo μS o mS)
- TDS con unità di misura espressa in parti per milione (ppm)

La misura del residuo fisso è in realtà una misura indiretta, perché il suo valore è proporzionale alla conducibilità. Per ricavarla lo strumento opererà una conversione automatica secondo un rapporto

solitamente equivalente a $1 \mu\text{S}/\text{cm} = 0,5 \text{ ppm}$ ossia $1 \text{ ppm} = 2 \mu\text{S}/\text{cm}$ (il fattore di conversione non è uguale per tutti gli strumenti, e può variare da 0,5 a 0,7 a seconda dell'impostazione dello strumento e dalla zona di commercializzazione – Europa/America).

Il valore di TDS è quindi un valore calcolato e approssimativo (per quanto verosimile) in quanto in una soluzione possono essere presenti vari tipi di sali che presentano diverse capacità di condurre in soluzione.

Ecco dei valori indicativi di EC/TDS di alcuni tipi di acque

- Acqua distillata: quasi $0 \mu\text{S}/\text{cm}$; quasi 0 ppm
- Acqua da Osmosi/demineralizzata/deionizzata: 0 - $5 \mu\text{S}/\text{cm}$; 0 – 2.5 ppm
- Acqua piovana: 5 – $20 \mu\text{S}/\text{cm}$; 2.5 - 10 ppm
- Acqua potabile: 150 – $400 \mu\text{S}/\text{cm}$; 75 – 200 ppm
- Acqua oligominerale : 50 – $200 \mu\text{S}/\text{cm}$; 25 – 100 ppm

Anche nel caso della salinità, lo strumento opera una conversione attraverso il valore noto di EC.

Alcuni dettagli dello strumento sono mostrati in Fig. 2.1



Figura 2.1 Conduttimetro COND70 – breve descrizione [8].

Il display mette in evidenza tutte le informazioni necessarie riguardanti la misura, lo stato della cella e la memoria dello strumento facilitandone l'utilizzo.

Tutti i parametri funzionali della cella collegata, durante le misure o durante la taratura, sono costantemente tenuti sotto controllo e informano l'operatore in caso di errore. Sei tasti consentono di gestire tutte le funzioni in modo semplice ed intuitivo mentre un'uscita USB permette di scaricare i dati dalla memoria.

Riportiamo ora alcune caratteristiche tecniche dello strumento relative alla EC:

- Campo di misura: 0,00...20,00-200,0-2000 $\mu\text{S}/20,00-200,0 \text{ mS}$
- Risoluzione: 0,01/0,1/1 μS 0,01/0,1 mS
- Accuratezza relativa: $\pm 2\%$ f.s.
- Punti di taratura: 1...4 1...4
- Costante di cella selezionabile: 0,1 – 1 – 10 cm^{-1}

- Coefficiente di temperatura: 0,00...10,00 %/°C
- Temperatura di riferimento: 15...30 °C
- Funzione GLP: Sì
- Timer Calibrazione: Sì
- Indicazione dei tamponi usati per la calibrazione: Sì

e al TDS:

- Campo di misura: 0...100 g/l
- Risoluzione: 1% f.s.
- Fattore TDS: 0,4...1,0

Il sistema di misura nel suo complesso è mostrato in Fig. 2.2; esso è costituito da:

1. Software di interfaccia
2. Cavo USB
3. COND 70
4. Sonda



Figura 2.2 Sistema di misura

2.4 Misure di alcuni parametri chimico/fisici

Attraverso il COND 70 sono state effettuate tre diverse misurazioni, ognuna delle quali al variare della temperatura:

- Conducibilità;
- TDS;
- Salinità.

Successivamente, tramite la funzione “Esporta in Excel” fornita dal software, sono stati riportati i valori sul foglio elettronico. Tramite il software MATLAB, invece, sono stati tracciati i grafici delle misure in funzione della temperatura. Le misure sono state effettuate riscaldando le soluzioni fino ad una temperatura di circa 54 °C. Le misure sono state quindi acquisite inizialmente ogni due minuti e poi ogni minuto in modo da permettere un raffreddamento graduale della soluzione al passare del tempo. Le misure sono state acquisite, quindi, entro un range di temperatura pari a [36°C - 53,9°C] nel caso del vino bianco e [35,4 °C - 49,7 °C] nel caso del vino rosso.

2.5 Risultati delle misure

Sono state eseguite diverse serie di misurazioni su campioni di vino bianco e di vino rosso. I risultati qui presentati sono relativi, come esempio a un campione di bianco ed uno di rosso. Gli altri dati sono assolutamente analoghi a questi.

I dati empirici relativi alla conducibilità sono indicati in Fig. 2.1 e 2.2 con le croci, rispettivamente, per il campione di vino bianco ed il campione di vino rosso. Le misure di conducibilità sono, in questo caso, ottenute con il metodo a lettura diretta, pertanto uno dei principali contributi di incertezza legati alle misure stesse è legato alle specifiche del COND70 [8] fornite dal costruttore stesso [9]. Si tratta quindi di una valutazione di categoria B dell'incertezza in assenza di misure ripetute. Tale contributo di incertezza è stato quindi quantificato mediante l'accuratezza relativa percentuale fornita nel manuale del COND70 ed è stato riportato nelle Fig. 2.1 e 2.2 con le barre di errore. In aggiunta, i grafici riportano la regressione lineare ottenuta utilizzando i dati sperimentali. Nel caso del vino bianco, la regressione è stata ottenuta utilizzando 37 dati sperimentali con un RMSE di 0,0057 ed un R^2 di 0,99. Nel caso del vino rosso sono stati 38 i dati sperimentali raccolti ed è stato ottenuto un RMSE di 0,0113 ed un R^2 di 0,97. Nel caso del vino rosso si osservano infatti fluttuazioni maggiori dei valori di conducibilità per temperature elevate, ipotizziamo che questi siano dovuti ad errori di misura. In entrambi i casi, comunque, l'andamento lineare crescente, come atteso per soluzioni elettrolitiche, esprime bene il comportamento del vino in termini di conducibilità in funzione della temperatura.

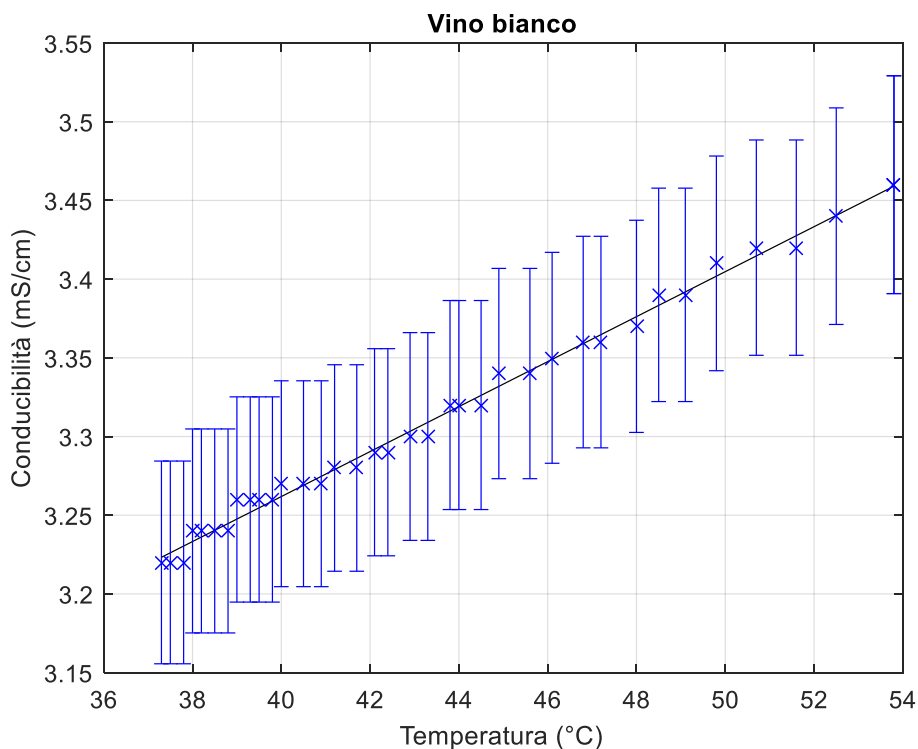


Figura 2.2 Misure di conducibilità in funzione della temperatura relative al campione di vino rosso.

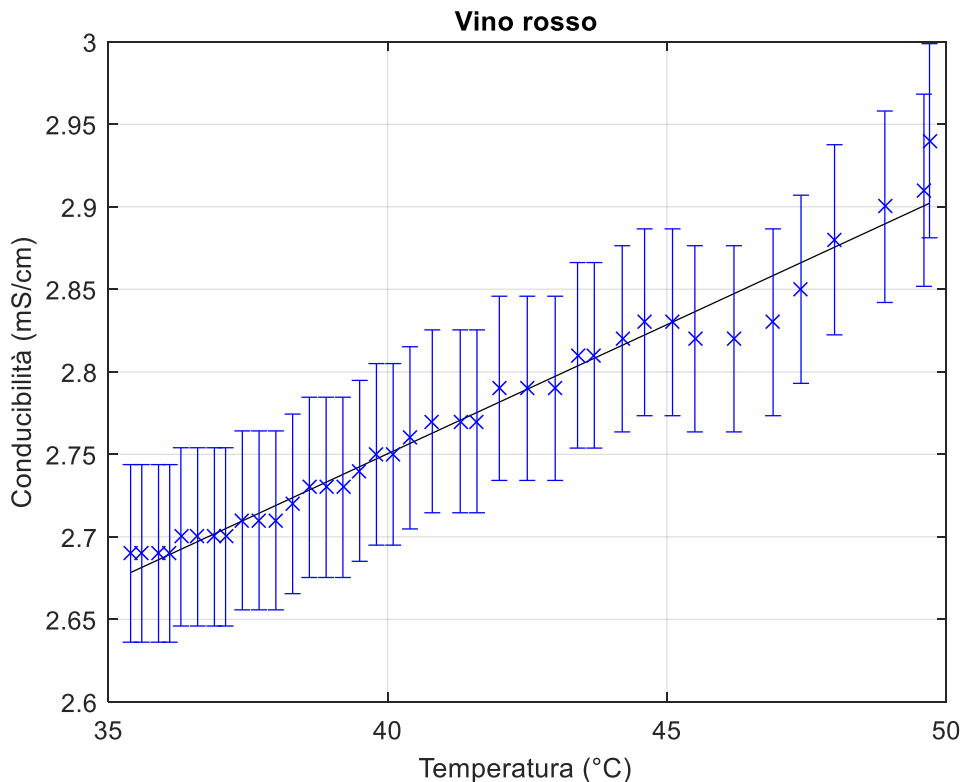


Figura 2.3 Misure di conducibilità in funzione della temperatura relative al campione di vino rosso.

Riportiamo in Tabella 2.1 alcune statistiche relative alle misure raccolte nel range di temperatura analizzato.

Tabella 2.1 Statistiche sui valori di conducibilità nel range di temperatura per il vino bianco di [36°C - 53,9°C] e di [35,4 °C - 49,7 °C] per il vino rosso in mS/cm.

Campione	Media $\hat{\sigma}$	Scarto quadratico medio s_{σ}	Mediana $\tilde{\sigma}$	Range totale [min - max]
Vino bianco	3,30	0,07	3,30	[3,22 - 3,46]
Vino rosso	2,77	0,07	2,77	[2,68 - 2,90]

La variabilità della conducibilità nel range di temperature studiato è contenuta. Se estrapoliamo i valori di conducibilità alla temperatura di 20 °C utilizzando le leggi lineari stimate mediante regressione otteniamo valori di $2,97 \pm 0,06$ mS/cm per il vino bianco e di $2,43 \pm 0,05$ mS/cm per il vino rosso, che ha una conducibilità leggermente inferiore.

Sono state eseguite anche misure indirette di TDS e salinità, si riportano le statistiche dei valori ottenuti nelle Tabelle 2.2 e 2.3. Si può notare che nel caso del TDS è stato utilizzato dallo strumento un fattore di conversione pari a circa 0,75, ovvero $1 \mu\text{S/cm} \approx 0,75 \text{ ppm}$ (ovvero, $1 \text{ mS/cm} \approx 0,75 \text{ g/L}$). Infatti, in prima approssimazione, la conducibilità delle soluzioni elettrolitiche è direttamente proporzionale ai sali in esse disciolti.

Tabella 2.2 Statistiche sui valori di TDS nel range di temperatura per il vino bianco di [36°C - 53,9°C] e di [35,4 °C - 49,7 °C] per il vino rosso in g/L.

Campione	Media $\hat{\sigma}$	Scarto quadratico medio s_{σ}	Mediana $\tilde{\sigma}$	Range totale [min - max]
Vino bianco	2,48	0,06	2,47	[2,40 - 2,63]
Vino rosso	2,02	0,04	2,02	[1,98 - 2,10]

Tabella 2.1 Statistiche sui valori di salinità nel range di temperatura per il vino bianco di [36°C - 53,9°C] e di [35,4 °C - 49,7 °C] per il vino rosso in ppt (parti per mille).

Campione	Media $\hat{\sigma}$	Scarto quadratico medio s_{σ}	Mediana $\tilde{\sigma}$	Range totale [min - max]
Vino bianco	2,04	0,03	2,03	[2,01 - 2,13]
Vino rosso	1,41	0,08	1,37	[1,33 - 1,62]

3 Studio e dimensionamento del prototipo di camera di trattamento

3.1 Breve introduzione e motivazioni

Una componente fondamentale per lo sviluppo di sistemi PEF è la camera di trattamento, utilizzata per trasferire gli impulsi di tensione elettrica al prodotto da trattare. Queste possono essere statiche (batch) o continue. Per sperimentazioni in scala di laboratorio per trattamenti PEF su prodotti solidi o liquidi sono sufficienti camere statiche (assenza di moto del prodotto da trattare). Le camere continue, invece, sono più adatte per impianti pilota e/o applicazioni industriali (a meno di utilizzare contenitori non convenzionali al fine dell'applicazione dei PEF su prodotti già confezionati e non direttamente accessibili).

La corretta progettazione della camera di trattamento è importante per assicurare una efficace inattivazione dei microrganismi durante il processo. Gli aspetti da considerare in fase di progettazione della camera sono i seguenti:

1. geometria;
2. dimensioni;
3. materiali.

Vogliamo ora procedere alla progettazione di una camera di trattamento destinata alla sperimentazione di piccole quantità di fluido, ovvero a volumi di fluido di circa 0,2 l.

3.2 Studio della geometria

La camera di trattamento è sostanzialmente costituita da un porta campione contenente il fluido da trattare e da due elettrodi collegati alla sorgente di tensione, ovvero al generatore di impulsi. Per motivi di sicurezza è preferibile collegare un elettrodo al generatore di impulsi e l'altro a terra.

Due sono le condizioni di progettazione che definiscono la geometria della camera:

- I. Uniformità del campo elettrico all'interno della camera di trattamento;
- II. Riduzione dell'emissione di elettroni all'interfaccia elettrodo/fluido indotta da un campo elettrostatico.

Affinché il campo elettrico generato all'interno del porta campione sia il più possibile uniforme (ipotesi di condensatore a lastre piane infinite), la scelta più pratica è rappresentata dall'utilizzo di **elettrodi a piastre parallele separati da una distanza l relativamente piccola**. L'uniformità del campo all'interno del porta campione evita la necessità di dover variare la tensione del generatore, V_g , per garantire il campo desiderato, E , sull'intero volume di fluido.

L'emissione di elettroni all'interfaccia con l'elettrodo è una delle principali cause di scariche elettriche che possono potenzialmente verificarsi durante il trattamento. Questa può essere causata da piccole protuberanze superficiali a forma d'ago che, in virtù della loro geometria, diventano localmente conduttive (in quanto diminuisce localmente la loro superficie). Per far fronte a questo fenomeno è necessario arrotondare e levigare le superfici degli elettrodi che potrebbero generare correnti di emissione elettronica di campo non desiderate. Per questo, **elettrodi a forma di disco e arrotondati** possono minimizzare sia l'emissione di elettroni all'interfaccia (riducendo la possibilità di rottura dielettrica) che incrementi locali di campo elettrico.

Nel caso di elettrodi circolari di raggio r posti a distanza l , è possibile approssimare il contributo degli effetti di bordo sulla capacità effettiva del mezzo trattato [10] come

$$C_{eff} = C_{teo} + C_{edge} = \varepsilon_0 \varepsilon_r \left[\pi \frac{r^2}{l} + r \ln \left(16\pi \frac{r}{l} - 1 \right) \right] = \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{S}{l} \left[1 + \left(\frac{r}{l} \right)^{-1} \ln \left(16\pi \frac{r}{l} - 1 \right) \right] \quad (3.1)$$

dove C_{edge} è il contributo alla capacità teorica per lastre piane infinite, C_{teo} , generato dall'utilizzo di elettrodi piani di dimensione finita. Dalla formula si evince che l'effetto su C_{eff} si annulla per $\frac{r}{l} \rightarrow \infty$, ovvero per $r \gg d$.

3.3 Dimensionamento

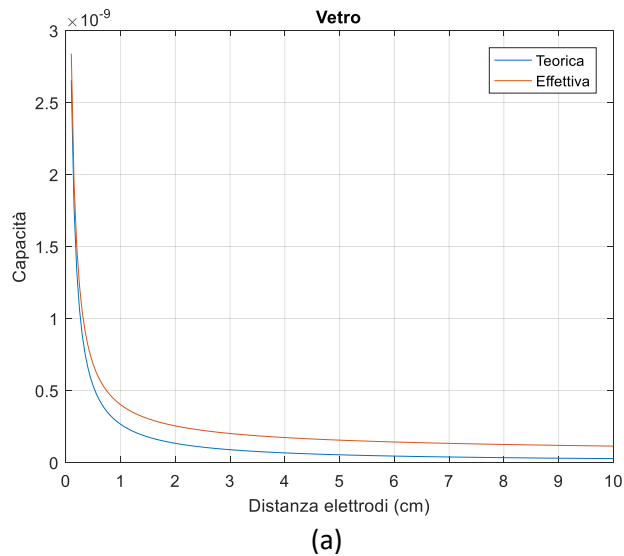
Ipotizzata una geometria cilindrica del porta campione e noti il volume del fluido, $V=0.2 \text{ l}$ (2000 cm^3) e l'intensità del campo elettrico desiderato, $E=20\text{kV/cm}$, questo sarà generato da due elettrodi piani circolari di superficie S posti ad una distanza l . Possiamo, ad esempio, applicare una tensione $V_g= 80 \text{ kV/cm}$ ad una distanza di 4 cm. La superficie circolare del fluido dato il volume V sarà quindi pari a

$$S = V/l = (2000 \text{ cm}^3)/(4 \text{ cm}) = 500 \text{ cm}^2,$$

che corrisponde ad un diametro

$$d = 2 \cdot \sqrt{S/\pi} = 2 \cdot \sqrt{\frac{500\text{cm}^2}{\pi}} \approx 25 \text{ cm}.$$

Utilizzando la formula 3.1, è possibile stimare l'aumento della capacità effettiva (misurata) rispetto alla capacità teorica a cui corrisponde un discostamento dall'uniformità del campo dovuto alla geometria finita degli elettrodi, quindi la presenza di valori di campo elettrico inferiori sui bordi (effetto di bordo). In Fig. 3.1 sono mostrati (a) i valori di capacità effettiva e teorica per la geometria ipotizzata, nel caso del vetro e (b) il rapporto C_{eff}/C_{teo} in funzione del fattore di forma r/l , con $r=d/2$.



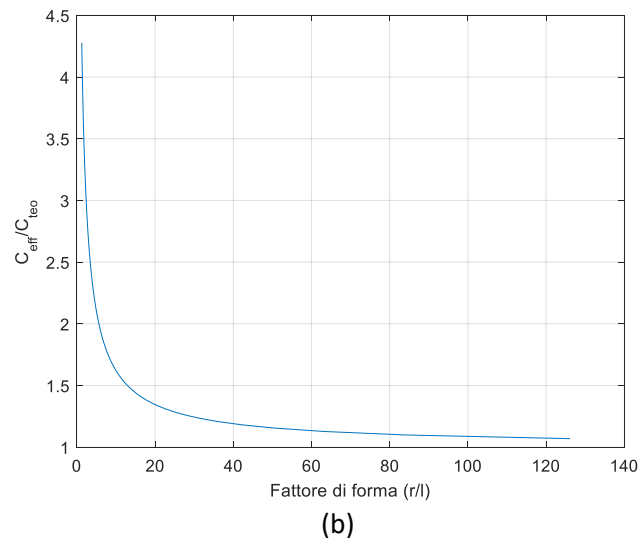


Figura 3.1. (a) Capacità effettiva e teorica relativa al porta campione per sperimentazioni di piccole quantità di fluido (2000 cm²) nel vuoto e (b) rapporto C_{eff}/C_{teo} in funzione del fattore di forma r/l , con $r=d/2$.

Con la geometria ed il dimensionamento effettuati, abbiamo $r/l=3.15$ e $\frac{C_{eff}}{C_{teo}} = 2.6$.

Per minimizzare gli effetti di bordo è possibile aumentare la superficie degli elettrodi (a parità di volume di fluido trattato) aumentando il diametro (quindi r) degli elettrodi di una quantità Δd , posizionando così anche un distanziatore isolante tra gli elettrodi (come mostrato in Fig.3.2). Inoltre è possibile aumentare la tensione applicata per ridurre la distanza tra gli elettrodi e ottenere lo stesso campo desiderato E . Fissata la geometria, la riduzione del campo elettrico può essere compensata comunque da un aumento della tensione applicata a parità di distanza tra gli elettrodi. Le ultime due soluzioni comportano entrambe un aumento della potenza erogata dal generatore di tensione sul volume di fluido.

Il dimensionamento della camera di trattamento destinata alla sperimentazione di piccole quantità di fluido è riportato in Fig. 3.1.

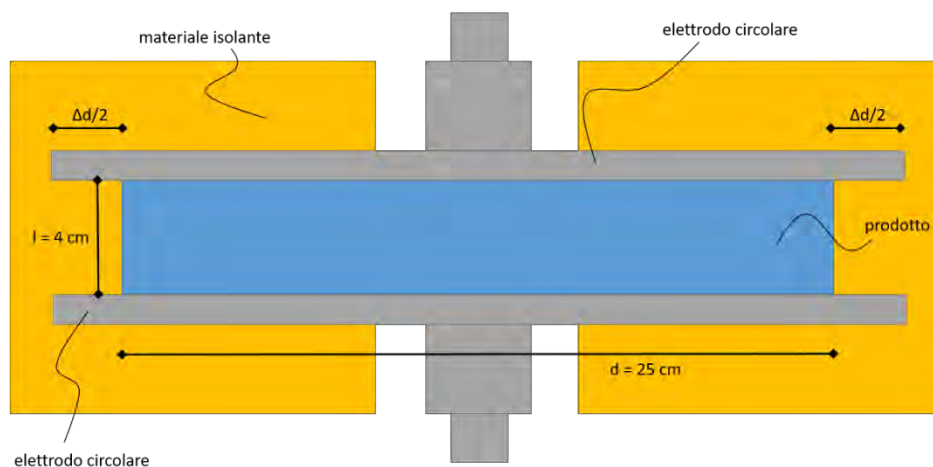


Figura 3.2. Visione laterale della geometria della camera di trattamento, o porta campione, destinato alla sperimentazione di piccole quantità di fluido. $d+\Delta d$: diametro degli elettrodi; l : distanza tra gli elettrodi.

3.4 Studio dei materiali

L'**acciaio inossidabile** è stato ampiamente utilizzato in letteratura come materiale per gli elettrodi. Anche se materiali come l'**oro**, il **platino**, o il **carbonio** potrebbero essere usati per prevenire fenomeni di elettrolisi all'interfaccia elettrodo/fluido. Avere superfici degli elettrodi lucidate può ridurre ulteriormente il rischio di rottura dielettrica del materiale a seguito di aumenti locali dell'intensità di campo.

Gli elettrodi, come detto, possono essere tenuti in posizione da un materiale isolante che deve formare anche la camera contenente il prodotto da lavorare. L'isolante, oltre a fungere da distanziatore tra gli elettrodi, protegge il cibo dagli effetti indesiderati degli elettrodi e, ancor più importante, svolge la funzione di minimizzare le perdite ohmiche. Per essere in grado di sostenere il trattamento, il materiale utilizzato come isolante dovrebbe avere una rigidità dielettrica superiore all'intensità del campo elettrico applicata in modo da evitare che gli atomi o le molecole del materiale subiscano un processo di ionizzazione a valanga, in grado di provocare un arco elettrico attraverso il materiale e l'alterazione permanente dello stesso. (La rigidità dielettrica dell'aria è di circa 30 kV/cm e non sarebbe sufficiente a sostenere campi elettrici elevati). La stessa condizione vale ovviamente anche per il prodotto da trattare. Più banalmente, tutti i materiali selezionati per costruire la camera di trattamento devono essere lavabili (pulizia in posizione) o autoclavabili e chimicamente inerti rispetto al prodotto da trattare.

Date queste condizioni, possibili scelte per il materiale isolante sono: **polietilene, polipropilene, polisolfone, plexiglas e PVC**.

4 Studio dei parametri dinamici per applicazioni PEF in camere di trattamento continuo.

4.1 Breve introduzione e motivazione

Come anticipato nel paragrafo 4, camere di trattamento continuo sono più adatte per impianti pilota orientati ad applicazioni industriali, dove è richiesto il trattamento di maggiori volumi di fluido.

In aggiunta alle considerazioni fatte relativamente a geometria, dimensionamento e materiali, queste necessitano lo studio della velocità di scorrimento del prodotto, che può essere espressa in termini di portata volumica.

4.2 Camere di trattamento continuo

Ci sono molte configurazioni di camera di trattamento continuo che sono state sviluppate e brevettate negli ultimi 20 anni [11]. Le principali soluzioni realizzative sono mostrate in Fig. 4.1. Il materiale isolante necessario a garantire la sicurezza ed il funzionamento delle camere non è illustrato per semplicità.

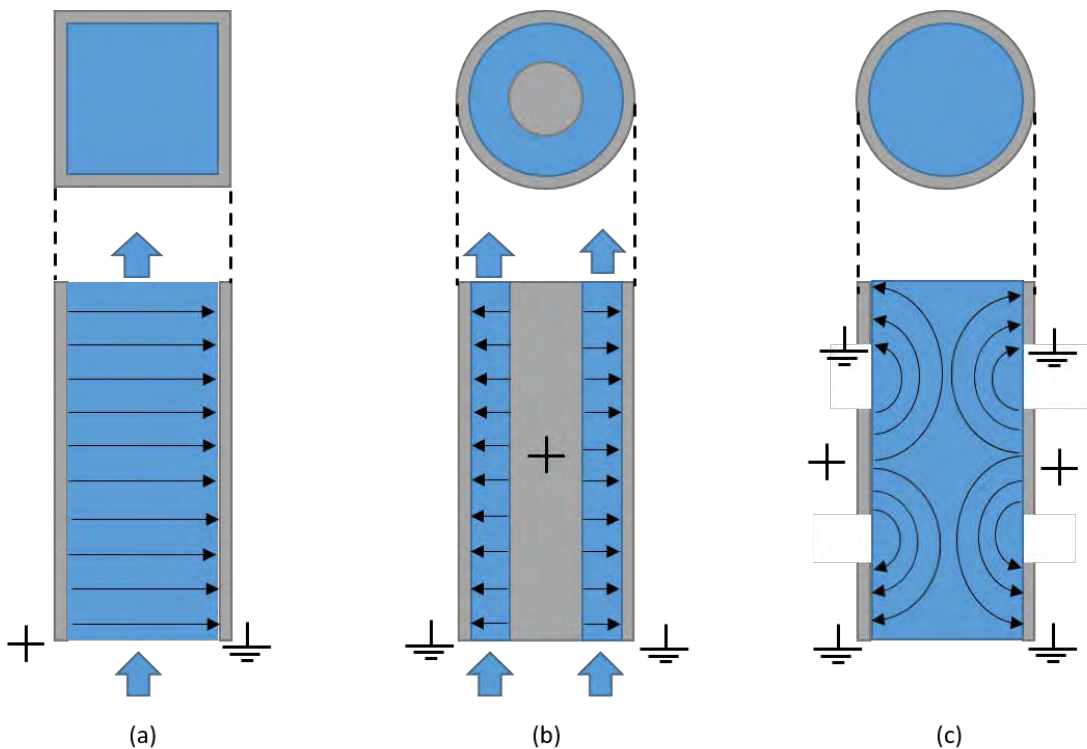


Figura 4.1. Configurazioni delle camere di trattamento continuo. (a) A facce parallele. (b) Coassiale. (c) Co-lineare.

Consideriamo la configurazione a camera co-lineare in Fig.4.1 (c), che rappresenta la configurazione più utilizzata, nella quale il prodotto viene fatto fluire all'interno di un canale di geometria cilindrica attraverso una serie di elettrodi carichi con polarità alternata. Valgono considerazioni analoghe relative alla necessità dell'uniformità del campo per le quali la distanza tra gli elettrodi dovrebbe essere mantenuta relativamente bassa. Il dimensionamento della camera è legato a due parametri: la distanza L tra elettrodi contigui ed il loro diametro interno, D , che corrisponde anche al diametro della camera di trattamento (il diametro dell'isolante non è considerato ma dovrà essere sicuramente superiore di almeno un ordine di grandezza). Il rapporto L/D definisce il fattore di forma della camera (quindi il comportamento della camera dal punto di vista dell'uniformità del campo). In Fig. 4.2 è mostrata schematicamente la struttura di una camera

colineare per $L/D=2$. Variazioni sulla portata, Q , ovvero sul volume di fluido trattato nell'unità di tempo a parità di rapporto L/D comporteranno una maggiore o minore potenza erogata da parte del generatore che, alle frequenze di lavoro dei PEF, può essere approssimata come la potenza dissipata su un carico resistivo di volume V , ovvero $P = \sigma E^2 V$, che possiamo considerare come una potenza minima teorica.

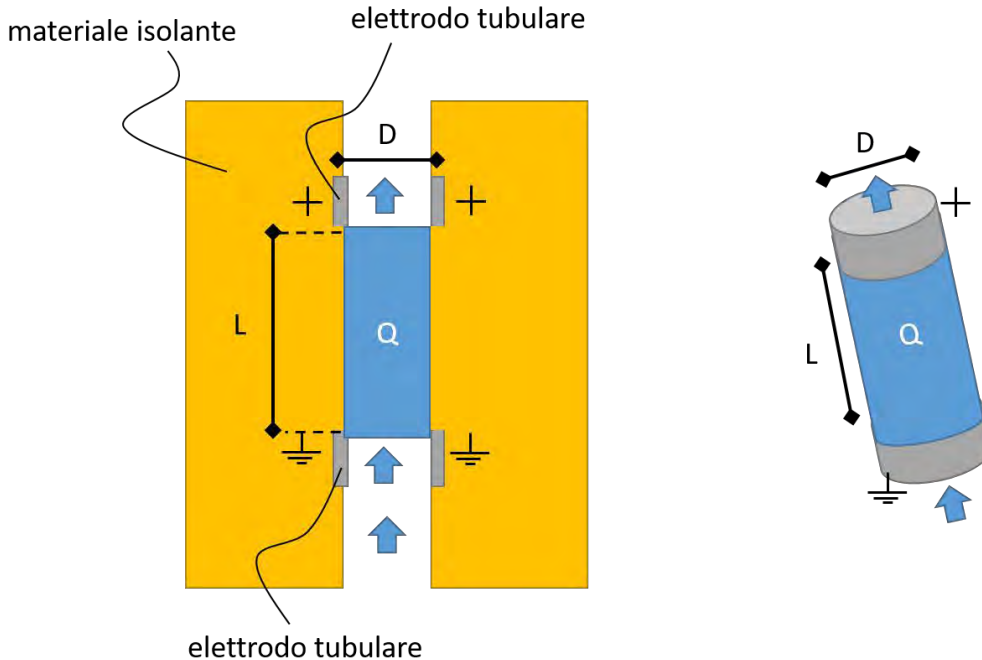


Figura 4.2. Geometria della camera di trattamento co-lineare per $L/D=2$. L: distanza tra gli elettrodi tubolari. D: diametro degli elettrodi. Q: portata di fluido.

Il prodotto da trattare definisce i microrganismi da inattivare e, conseguentemente, l'intensità del campo elettrico e la durata del trattamento (vedi paragrafo 1). La permittività del prodotto (o la sua impedenza elettrica), in particolare, definiscono la frequenza (ovvero la durata) degli impulsi da applicare. Dato un tempo di trattamento di $T = 1$ ms ed impulsi di durata $t_p = 10 \mu s$, sono necessari $N = T / \Delta t = 100$ impulsi ad onda quadra, ad esempio, per ottenere l'inattivazione microbica desiderata. La modalità di erogazione dell'impulso definisce il duty cycle, ovvero, data la durata dell'impulso, definisce la frequenza, f , del segnale, queste dipenderanno dal circuito utilizzato per la generazione del segnale stesso. I sistemi utilizzati per la generazione degli impulsi possono fornire, ad esempio, impulsi rettangolari di durata nell'intervallo $[1-10] \mu s$, tensione massima di 40 kV e frequenza di ripetizione fino a 3000 Hz.

4.3 Studio dei parametri dinamici

Se consideriamo una frequenza di ripetizione $f = 2000$ Hz (ovvero un periodo $T_s = 0,01$ s), la velocità massima ammissibile del fluido attraverso la camera di trattamento sarà $v_{max} = L / (N T_s)$, questo garantisce la durata minima del trattamento in relazione al prodotto e ai microrganismi da inattivare. Ad esempio, consideriamo una geometria colineare ed i seguenti vincoli:

Vincoli geometrici (legati al generatore di tensione e all'uniformità del campo):

- Distanza tra gli elettrodi $\rightarrow L = 20$ mm
- Fattore di forma $\rightarrow L/D = 2$

Vincoli di prodotto e microrganismo

- Intensità del campo elettrico $\rightarrow E = 20$ kV/cm

- Durata del trattamento $\rightarrow T = 1 \text{ ms}$
- Durata dell'impulso $\rightarrow t_p = 10 \text{ }\mu\text{s}$
- Conducibilità del prodotto $\rightarrow \sigma = 0,3 \text{ S/m}$

Parametri elettronici

- $f = 1000 \text{ Hz}$
- Onda quadra

Allora otteniamo:

- Diametro del condotto $\rightarrow D = L/2 = 10 \text{ mm}$
- Velocità massima del fluido $\rightarrow v_{\max} = L/(N T_s) = (0,02 \text{ m})/(100 \cdot 0,001 \text{ s}) = 0,2 \text{ m/s}$
- Portata volumetrica $\rightarrow Q = v_{\max} \pi(D/2)^2 3600 = 0,06 \text{ m}^3/\text{h}$
- Valore minimo teorico potenza dell'impulso \rightarrow
 $P = \sigma E^2 \pi(D/2)^2 L = 0,3 \text{ S/m} (20 \cdot 10^5 \text{ V/m})^2 \pi (0,033 \text{ m})^2 0,1 \text{ m} = 1,9 \text{ MW}$

La potenza media erogata dal generatore sarà più bassa considerando il duty cycle del segnale. Come anticipato, aumentando la portata volumetrica, ovvero il volume di fluido trattato per unità di tempo, quindi aumentando le dimensioni della camera di trattamento, aumenta la potenza necessaria a svolgere il trattamento stesso. D'altro canto, per aumentare la portata di fluido trattato è necessario aumentare la distanza tra gli elettrodi e, quindi, anche la tensione erogata dal generatore, che per distanze dell'ordine delle decine di cm dovrà probabilmente essere maggiore di 40 kV/cm per mantenere il campo elettrico desiderato, ad esempio:

Vincoli geometrici (legati al generatore di tensione e all'uniformità del campo):

- Distanza tra gli elettrodi $\rightarrow L = 10 \text{ cm}$
- Fattore di forma $\rightarrow L/D = 3$

Vincoli di prodotto e microrganismo

- Intensità del campo elettrico $\rightarrow E = 20 \text{ kV/cm}$
- Durata del trattamento $\rightarrow T = 1 \text{ ms}$
- Durata dell'impulso $\rightarrow t_p = 10 \text{ }\mu\text{s}$
- Conducibilità del prodotto $\rightarrow \sigma = 0,3 \text{ S/m}$

Parametri elettronici

- $f = 1000 \text{ Hz}$
- Onda quadra

Allora otteniamo:

- Diametro del condotto $\rightarrow D = L/3 = 3,3 \text{ cm}$
- Velocità massima del fluido $\rightarrow v_{\max} = L/(N T_s) = 1 \text{ m/s}$
- Portata volumetrica $\rightarrow Q = 3 \text{ m}^3/\text{h}$
- Valore minimo teorico potenza dell'impulso \rightarrow
 $P = \sigma E^2 \pi(D/2)^2 L = 0,3 \text{ S/m} (20 \cdot 10^5 \text{ V/m})^2 \pi (0,033 \text{ m})^2 0,1 \text{ m} = 100 \text{ MW}$

4.4 Vincoli aggiuntivi di progettazione

Aumenti locali dell'intensità del campo elettrico possono essere dovuti alla presenza di bolle d'aria, questo può causare la rottura dielettrica dell'alimento. Per impedire questo fenomeno, oltre all'utilizzo di una geometria della camera di trattamento tale da ottenere una distribuzione il più possibile uniforme del

campo elettrico, è possibile introdurre nell'apparecchio PEF, a monte della camera di trattamento, un **sistema di degassaggio** per prevenire o eliminare la formazione di bolle d'aria. Inoltre, un **sistema di raffreddamento** mediante un fluido refrigerante deve essere incluso per ridurre la temperatura degli elettrodi ed evitare il riscaldamento del prodotto.

Inoltre, dall'analisi fatta sulla conducibilità del vino, sappiamo che questo è soggetto a conduzione ionica ed è quindi assimilabile, dal punto di vista del comportamento chimico, ad una soluzione elettrolitica. La presenza di specie ioniche può causare, anche in regime alternato e specialmente all'interfaccia elettrodo/vino, problemi legati all'elettrolisi del prodotto. Localmente, infatti, gli ioni positivi possono essere attratti dall'elettrodo negativo (catodo) e gli ioni negativi dall'elettrodo positivo (anodo) e andare incontro a reazioni di ossido-riduzione con conseguente formazione di gas, similmente a quanto avviene per l'acqua che produce idrogeno ed ossigeno allo stato gassoso, attraverso le seguenti reazioni:

- catodo: $2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$
- anodo: $2OH^- \rightarrow 1/2 O_2 + H_2O + 2e^-$

Una possibile soluzione a questo problema è stata proposta da Dunn e Pearlman (1987) [12] e prevede l'inserimento di un sistema di membrane permeabili agli ioni strutturato come segue. Gli elettrodi sono separati dal prodotto mediante membrane permeabili agli ioni ed una soluzione elettrolitica che viene circolata continuamente viene interposta tra la membrana e l'elettrodo per facilitare la rimozione dei prodotti di elettrolisi, come mostrato in Fig. 4.3.

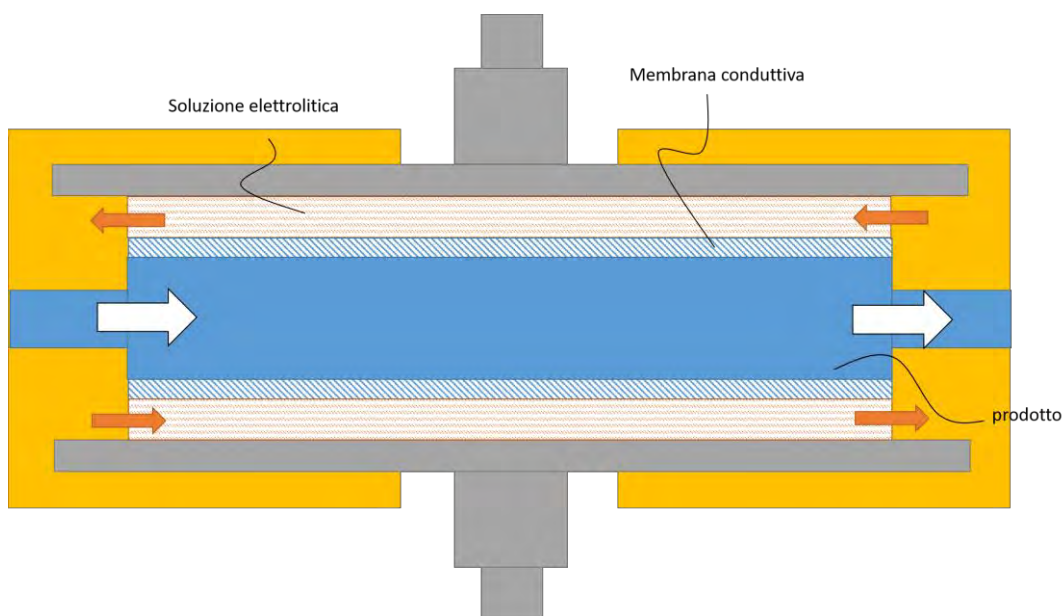


Figura 4.3. Soluzione al problema dell'elettrolisi all'interfaccia elettrodo, prodotto proposta da Dunn and Pearlman, (1987) [12].

La soluzione può essere sostituita in caso di concentrazione in eccesso o esaurimento dei prodotti ionici. Le membrane possono essere realizzate in **polistirene sulfonato** e **copolimeri dell'acrilico acrilico**, oppure utilizzando **polimeri idrocarburici fluorurati con gruppi a sospensione**. Le soluzioni idonee per la soluzione elettrolitica includono il **carbonato di sodio**, l'**idrossido di sodio**, il **carbonato di potassio** e l'**idrossido di potassio**.

5 Sviluppo di un modello computazionale a elementi finiti per l'analisi dei campi elettrici pulsati applicati a un fluido.

5.1 Breve introduzione e motivazioni

L'analisi della distribuzione del campo elettrico all'interno di contenitori non convenzionali in funzione di alcuni variabili PEF, richiede la soluzione di equazioni di campo in un dominio tridimensionale. Queste possono essere efficacemente risolte utilizzando un modello computazionale ad elementi finiti.

Tale modello è stato realizzato utilizzando il software COMSOL Multiphysics® [13]. Per lo sviluppo del modello è stato necessario:

- 1) Scegliere le equazioni di campo da risolvere andando a selezionare la fisica, i moduli e lo studio opportuni
- 2) Realizzare la geometria 3D da analizzare (elettrodi, contenitore del fluido)
- 3) Impostare i materiali relativi a ciascuna componente della geometria ed il fluido da trattare
- 4) Definire le condizioni iniziali ($t=0$) e al contorno (ai confini delle geometrie)
- 5) Creare la mesh per la soluzione delle equazioni differenziali alle derivate parziali con il metodo degli elementi finiti

5.2 Creazione del modello fisico

Da un punto di vista dielettrico, il vino è assimilabile all'acqua e, ai nostri scopi, può essere modellato, in prima approssimazione, da un resistore in parallelo ad condensatore. L'effetto induttivo può essere trascurato per semplicità. Il valore della resistenza, R , e della capacità, C , corrispondenti dipendono entrambi dalla geometria della camera di trattamento. Ma mentre C dipende dalla permittività dielettrica del vino, $\epsilon \approx 7 \cdot 10^{-10} \text{ C}^2/(\text{N m}^2)$, il valore di R è inversamente proporzionale alla sua conducibilità elettrica (che come abbiamo visto corrisponde a $\sigma \approx 0,3 \text{ S/m}$). Da cui si deduce che la costante di tempo del sistema è inferiore a $1 \mu\text{s}$ (durata degli impulsi PEF applicati) di diversi ordini di grandezza. Per questo, la distribuzione di campo elettrico all'interno del fluido in esame, può essere analizzata simulando il comportamento del fluido in regime stazionario, trascurando cioè le variazioni delle variabili in esame legate al tempo. L'effetto sulla distribuzione del modulo di campo elettrico dovuto alle caratteristiche degli impulsi (forma, durata, frequenza) potrà, in seguito, essere analizzato andando a considerare valori di permittività variabili in funzione dell'impulso applicato. Inoltre, nel sistema in esame e alle frequenze di interesse, la lunghezza dell'onda elettromagnetica applicata, $\lambda = v/f \approx (3 \cdot 10^8 \text{ m/s})/(10^5 \text{ Hz}) \approx 3000 \text{ m}$ è significativamente più grande delle dimensioni del sistema che sono dell'ordine dei centimetri. Si è scelto quindi di procedere con uno studio in regime elettrostatico.

In particolare, è stato realizzato un modello 3D utilizzando il modulo AC/DC di COMSOL® che permette appunto di simulare il campo elettrico in regime statico o in bassa frequenza. Nel nostro caso, per le considerazioni fatte, è stato scelto il modulo elettrostatico in regime stazionario con il quale Comsol permette di risolvere la legge di Gauss per il campo elettrico (prima equazione di Maxwell) usando il potenziale elettrico scalare come variabile dipendente su un dominio tridimensionale. Il solutore di COMSOL risolve quindi, con il metodo degli elementi finiti, la seguente relazione che qui esprimiamo in forma locale

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = \rho$$

nella quale la divergenza del flusso elettrico (o divergenza della densità di flusso elettrico) eguaglia la densità di carica elettrica, ρ , in un dominio di volume infinitesimo [14]. Si tratta cioè di un'equazione

differenziale in cui compaiono le derivate spaziali del campo, \mathbf{D} , attraverso l'operatore divergenza che in un sistema di coordinate cartesiane è definito come

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = \frac{\partial D_x}{\partial x} + \frac{\partial D_y}{\partial y} + \frac{\partial D_z}{\partial z}.$$

Tale legge, viene legata ai diversi materiali in esame utilizzando la seguente equazione costitutiva

$$\mathbf{D} = \varepsilon_0 \varepsilon_r \mathbf{E}$$

che si può interpretare come una approssimazione di Taylor al primo ordine valida per campi elettrici sufficientemente bassi come quelli in esame, e con la quale la densità di flusso elettrico nella materia, \mathbf{D} , viene espressa in funzione del campo elettrico nel vuoto, \mathbf{E} , attraverso il prodotto di due costanti di proporzionalità ε_0 ed ε_r che corrispondono, rispettivamente, alla permittività elettrica del vuoto e alla permittività relativa della materia nella quale il campo elettrico si propaga.

In generale, la permittività relativa è un parametro che può dipendere, oltre che dalla frequenza, anche dalla temperatura e dall'umidità e, nel caso di materiali non omogenei e non isotropi, anche dalla posizione considerata nel mezzo e dalla direzione del campo incidente. Questi aspetti dovranno essere approfonditi in studi futuri.

Possiamo, a questo livello, sicuramente dire che il vino, come l'acqua, è un mezzo **dissipativo**, ovvero ha una conducibilità elettrica finita, e **dispersivo**, ovvero possiede proprietà elettromagnetiche che variano al variare della frequenza del campo incidente. Inoltre, come vero per il vuoto, facciamo ipotesi di un mezzo **lineare, omogeneo ed isotropo** per cui la permittività relativa può essere espressa come numero e non come tensore. In particolare, nel caso del vino, la permittività relativa dovrà essere espressa mediante un **numero complesso** che permette di descrivere non solo la proporzionalità ma anche lo sfasamento tra la polarizzazione nel dielettrico ed il campo elettrico generato.

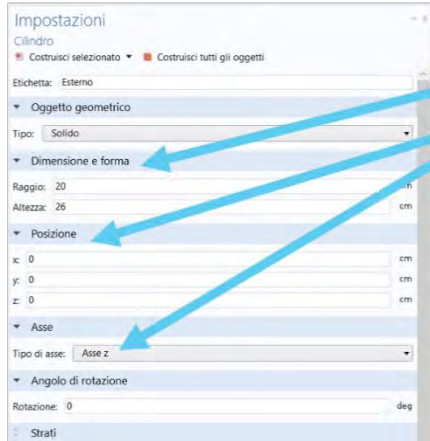
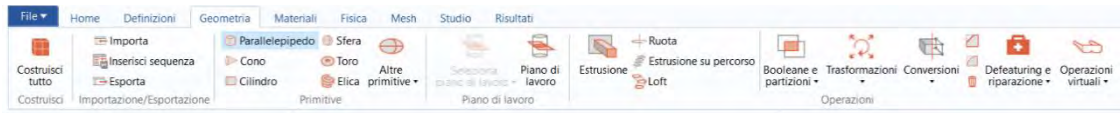
Il campo elettrico, \mathbf{E} , in quanto irrotazionale, può essere espresso attraverso una funzione scalare, o potenziale, V , applicato agli elettrodi mediante la seguente relazione:

$$\mathbf{E} = -\nabla V$$

che è valida per tutti i campi conservativi e che lega la funzione scalare potenziale elettrico, V , al campo elettrico \mathbf{E} , attraverso l'operatore gradiente cambiato di segno [15].

5.3 Realizzazione della geometria 3D

La geometria analizzata si riferisce all'analisi di contenitori non convenzionali al fine dell'applicazione dei PEF a fluidi confezionati non direttamente accessibili. In particolare, si vuole analizzare la distribuzione del campo elettrico all'interno di una bottiglia di vetro contenente vino. La geometria della bottiglia è stata realizzata in COMSOL mediante strutture cilindriche raccordate per approssimare meglio la geometria reale. In Fig. 5.1 è mostrata l'interfaccia COMSOL e le impostazioni necessarie alla realizzazione della struttura, mentre il risultato ottenuto è mostrato in Fig. 5.2. Oltre alla struttura della bottiglia sono stati realizzati due elettrodi circolari necessari alla generazione del campo elettrico. La bottiglia è stata rappresentata, per semplicità, come elemento flottante nell'aria presente tra i due elettrodi.



Le dimensioni e la posizione di ogni cilindro vengono modificate nelle impostazioni

Figura 5.1. Interfaccia per la realizzazione della geometria della bottiglia in ambiente Comsol Multiphysics.

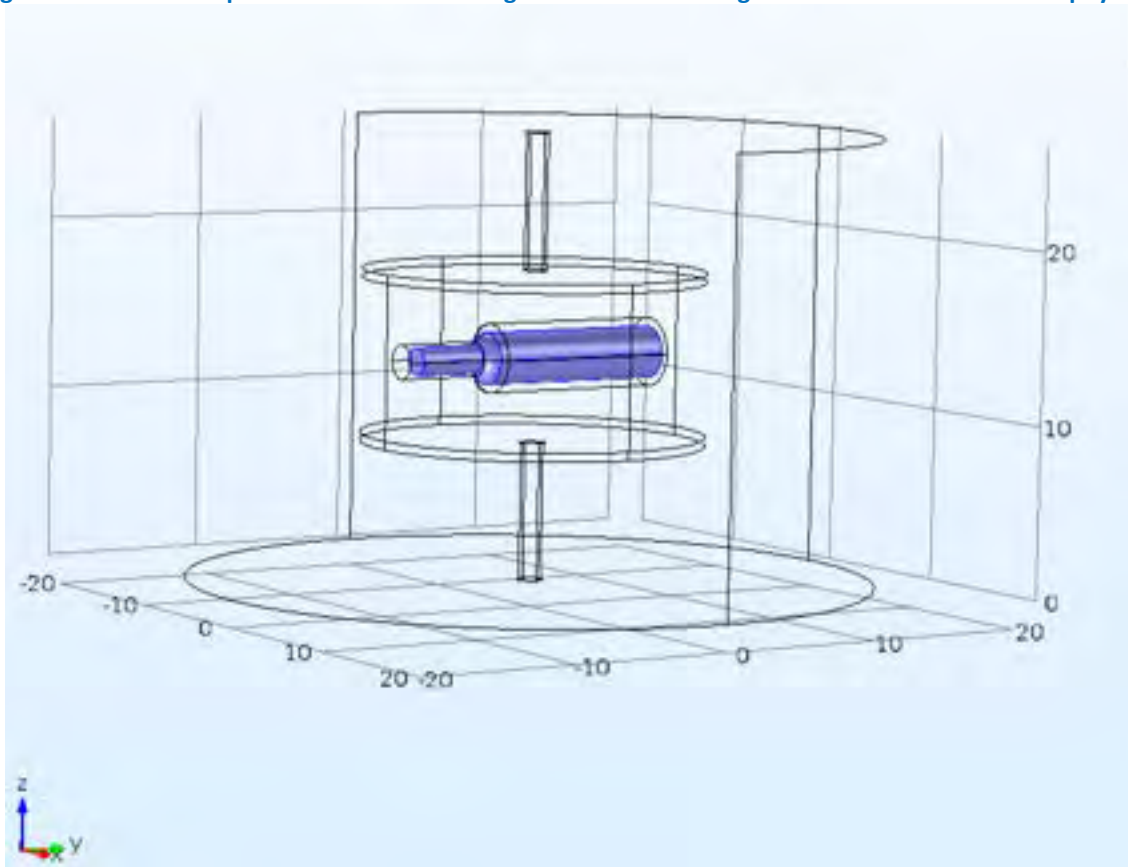
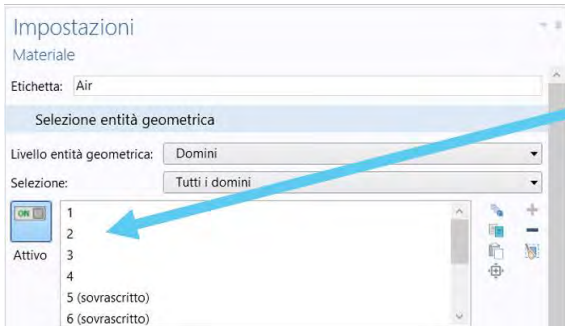


Figura 5.2. Geometria della bottiglia realizzata.

5.4 Impostazione dei materiali

Il modello realizzato prevede tre materiali differenti, cui corrispondono caratteristiche dielettriche e magnetiche note ed impostate mediante software. In particolare, come detto, un volume di aria è stato inserito per contenere la bottiglia, è stato selezionato il vetro per la bottiglia e l'acqua per il fluido contenuto all'interno della bottiglia. Oltre alle caratteristiche dielettriche e magnetiche, il software imposta anche altre caratteristiche del materiale come le proprietà meccaniche ed ottiche (vedi Fig. 5.4), queste però non saranno rilevanti ai fini dello studio in esame.



Per ogni materiale si specifica il dominio

Figura 5.3. Assegnazione dei materiali.

Ogni materiale ha le proprietà riepilogate nelle impostazioni

Riepilogo del materiale					
proprietà	Nome	Valore	Unità	Gruppo di proprietà	
<input checked="" type="checkbox"/>	Permittività relativa	epsilon_r	1	1	Proprietà di base
	Permeabilità relativa	mu_r	1	1	Proprietà di base
	Viscosità dinamica	mu	eta(T[1/K]...	Pa·s	Proprietà di base
	Rapporto dei calori specifici	gamma	1.4	1	Proprietà di base
	Conducibilità elettrica	sigma	0[S/m]	S/m	Proprietà di base
	Calore specifico a pressione costan...	Cp	Cp(T[1/K]...	J/(kg·K)	Proprietà di base
	Densità	rho	rho(pA[1/...	kg/m³	Proprietà di base
	Conducibilità termica	k	k(T[1/K])L...	W/(m·K)	Proprietà di base
	Velocità del suono	c	cs(T[1/K])...	m/s	Proprietà di base
	Indice di rifrazione, parte reale	n	1	1	Indice di rifrazione
	Indice di rifrazione, parte immagin...	ki	0	1	Indice di rifrazione

Per la permittività relativa dell'acqua si può esplicitare il valore della variabile dipendente dalla frequenza tramite un'interpolazione

Interpolazione

Disegna Crea un grafico

t	f(t)
273	1403
278	1427
283	1447
293	1481
303	1507
313	1526
323	1541
333	1552
343	1555
353	1555
363	1550
373	1543

Interpolazione ed estrapolazione

Interpolazione:

Estrapolazione:

Figura 5.4. Caratteristiche dielettriche dei materiali.

La permittività relativa dell'aria e del vetro vengono impostate dal software con valori di 1 e 4,2, rispettivamente. Mentre relativamente all'acqua, sappiamo che il suo valore, come nel caso del vino, cambia in funzione della frequenza. Il software permette sia di esplicitare valori del parametro permittività in funzione della frequenza che di interpolare ed estrapolare i valori mancanti. Nel presente studio sono stati inseriti valori casuali, ma questo aspetto sarà importante per studi futuri perché permetterà di inserire valori sperimentali di permittività relativa del vino, ottenuti mediante misure di impedenza.

5.5 Condizioni al contorno

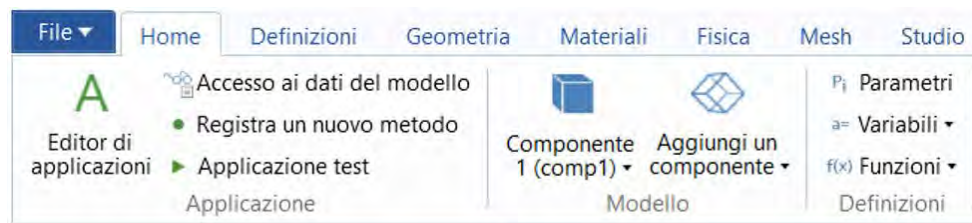
Le variabili di tensione e frequenza sono state definite tramite toolbar ed impostate in modo da ottenere uno studio parametrico che permetta di variare le variabili stesse in modo efficace. Mentre la tensione è la variabile dipendente delle equazioni che il solutore va a risolvere, la frequenza rappresenta un parametro accessorio utilizzato per poter variare il valore di permittività del fluido in funzione appunto della frequenza. L'impostazione dei parametri mediante l'interfaccia di COMSOL è mostrata in Fig. 5.6

Per le condizioni al contorno, sono stati selezionati i due terminali impostando la terra per il terminale inferiore e la tensione parametrica V_0 per il terminale superiore, come mostrato in Figura 5.7. Valgono inoltre le condizioni al contorno essenziali (di default) impostate come carica nulla su tutti i contorni della geometria realizzata, ovvero

$$\mathbf{n} \cdot \mathbf{D} = 0$$

e, come condizione iniziale, il valore nullo del potenziale impostato su tutti i domini della geometria, ovvero

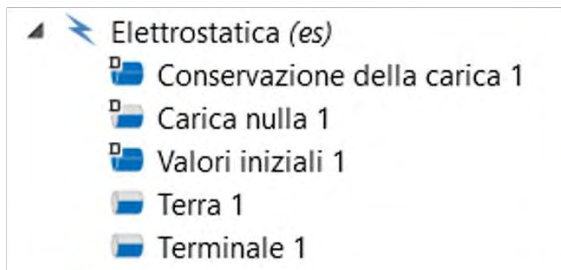
$$V = 0.$$



Parametri			
▼ Parametri			
Nome	Espressione	Valore	Descrizione
v	0[V]	0 V	tensione condensatore
freq	0[1/s]	0 1/s	

Figura 5.6. Impostazione variabili di interesse.

Per il modulo riguardante l'elettrostatica sono stati aggiunti dalla toolbar della fisica due opzioni per i contorni:



Come tensione V_0 nelle opzioni del terminale inserire la variabile «v» definita in precedenza.

Per la terra si è selezionato il piatto inferiore del condensatore, per il terminale quello superiore

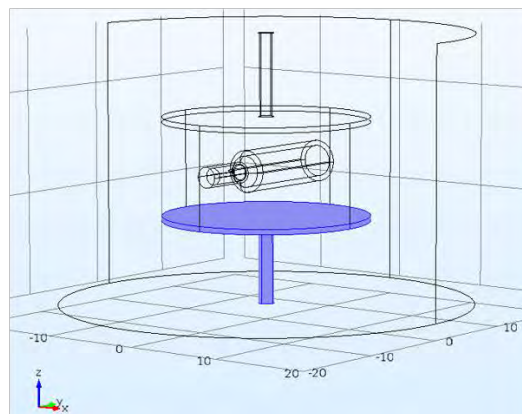


Figura 5.6. Impostazione condizioni al contorno.

5.6 Realizzazione della mesh

La mesh per lo studio del campo elettrico è stata realizzata utilizzando le impostazioni di default di Comsol. Tale mesh permette di suddividere il dominio del modello da analizzare in elementi finiti, o primitive, di geometria tetraedrica con i quali la soluzione del problema formalizzato nel paragrafo 5.1 viene approssimata utilizzando funzioni polinomiali, dette funzioni di base o funzioni di forma. Questo approccio permette di risolvere equazioni differenziali in domini complessi.

Si riporta in Fig. 5.7 la mesh ottenuta per lo studio dei PEF applicati ad un fluido confezionato (vino) all'interno della bottiglia (vetro). In studi futuri la mesh potrà essere infittita se si volesse raggiungere un livello superiore di dettaglio e potrà anche essere realizzata in modo non uniforme andando ad infittirla in porzioni di spazio di interesse.

Il calcolo della soluzione può essere ora effettuato attraverso la simulazione numerica come illustrato in Fig. 5.8. Il tempo di calcolo è stato molto basso, ordine dei secondi, in virtù della mesh utilizzata e della tipologia di equazioni risolte.

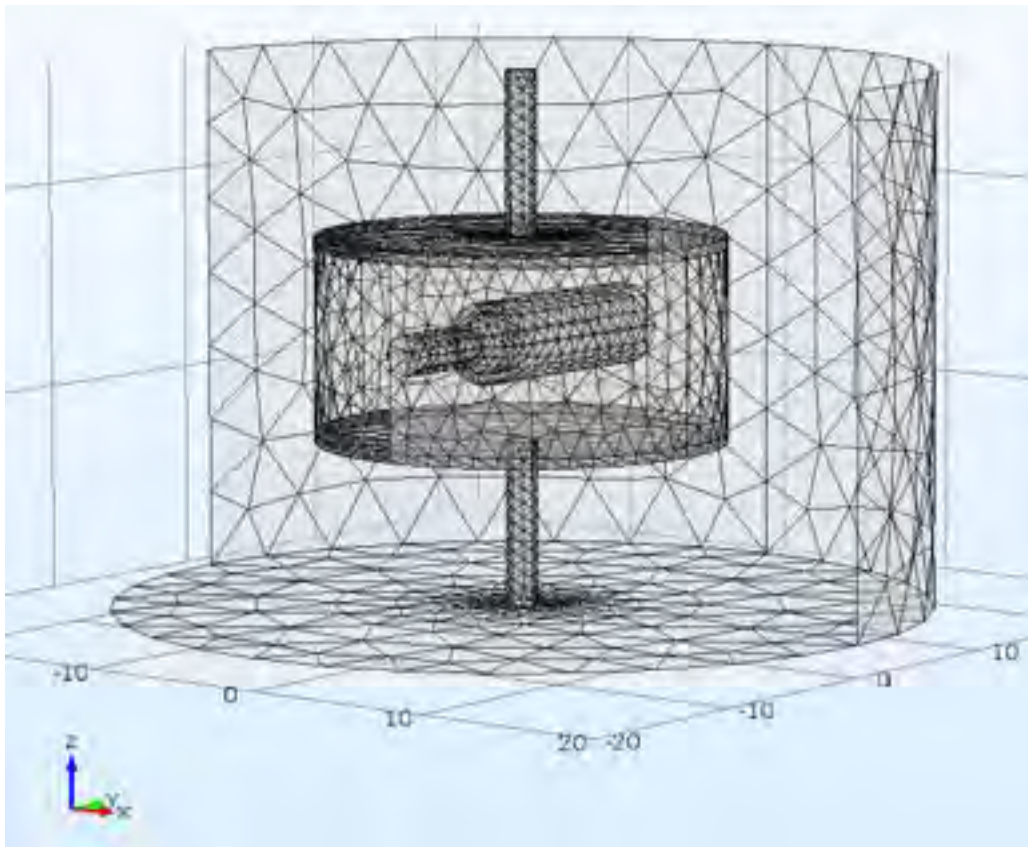
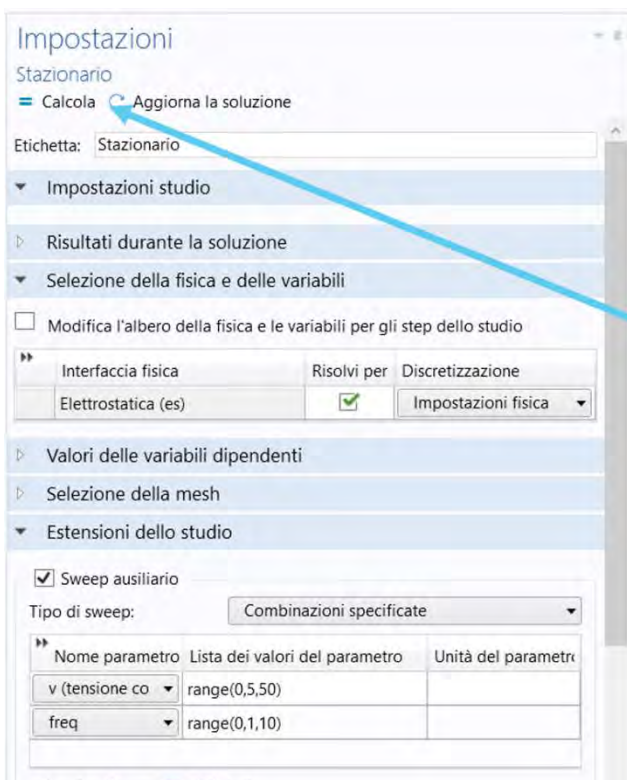


Figura 5.7. Mesh realizzata in ambiente Comsol Multiphysics



Infine si fa partire la simulazione

Figura 5.7. Calcolo e simulazione

6 Analisi della distribuzione del campo elettrico in contenitori non convenzionali al fine dell'applicazione dei PEF a fluidi confezionati non direttamente accessibili.

La visualizzazione dei risultati in COMSOL è possibile andando ad aggiungere dei set di dati e un gruppo di plot in 3D: si selezionano il valore delle variabili di cui vogliamo vedere i risultati e ciò che vogliamo rappresentare, in questo caso il valore del modulo del campo Elettrico «es.normE» in V/cm, come illustrato in Fig. 6.1.

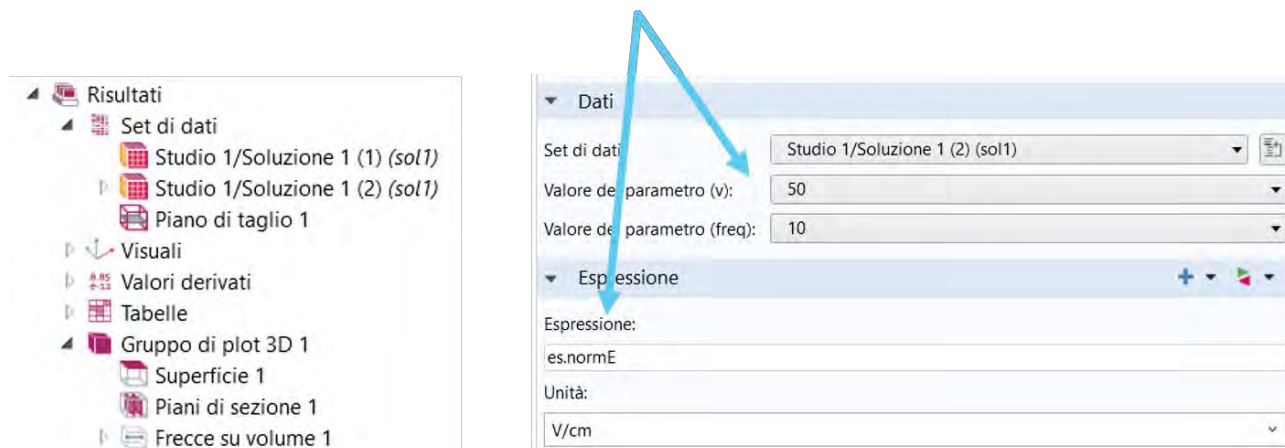


Figura 6.1. Selezione del gruppo di plot 3D

In Fig. 6.2 è mostrato il risultato ottenuto applicando una tensione di 50 V agli elettrodi circolari e considerando un dato valore di permittività associato ad una frequenza di 10 Hz. In questo caso, il valore di campo elettrico all'interno della bottiglia è nullo in virtù dei parametri impostati, ma potrà essere analizzato più in dettaglio andando a caratterizzare le proprietà dielettriche del vino in funzione, appunto, degli impulsi PEF applicati, in particolare della frequenza. In Fig. 6.2 è mostrato il risultato sul piano yz. La barra di colore indica il modulo del campo elettrico espresso in V/cm.

Dalle sezioni visualizzate nelle Figure 6.2 e 6.3 si possono notare, come atteso, regioni con valore del campo elettrico maggiori di 6 V/cm nel volume di aria nel quale è contenuta la bottiglia, questo in virtù delle caratteristiche dielettriche dell'aria, che funge appunto da ottimo isolante. Si possono notare regioni di non uniformità del campo in corrispondenza dei contorni degli elettrodi, con valori di campo elettrico di circa 14 V/cm. Anche questo fenomeno era prevedibile e dovuto agli effetti di bordo che, come anticipato nel paragrafo 3.2, sono dovuti alla finitezza degli elettrodi. Anche all'interfaccia aria-vetro sono presenti dei picchi nel valore di campo elettrico. Ipotizziamo che questi, oltre a rappresentare effetti di bordo, siano dovuti ad errori numerici presenti in virtù del salto tra dielettrici. Questo infatti, genera una discontinuità nelle derivate e, come conseguenza, può causare problemi al solutore di COMSOL, il quale approssima la soluzione delle equazioni alle derivate parziali con un metodo numerico [16]. L'errore compiuto dal solutore all'interfaccia potrebbe essere ridotto andando ad infittire la mesh. I valori del modulo del campo elettrico nel vetro sono inferiori rispetto all'aria e sono dell'ordine dei 4 V/cm, coerentemente con il valore di permittività impostato. I valori del modulo di campo elettrico sono nulli all'esterno del condensatore (ovvero all'esterno degli elettrodi), in coerenza con la legge di Gauss. Poiché siamo in regime stazionario ed in virtù del valore di permittività impostato, il campo elettrico è nullo anche nel liquido. Questo aspetto dovrà essere approfondito in attività future, come anticipato, andando a considerare l'effetto della frequenza sul valore di permittività del liquido.

In particolare, ulteriori simulazioni dovranno essere effettuate considerando l'effetto combinato della temperatura e della frequenza sulla permittività elettrica del vino, in modo da poter valutare la possibilità

di ottenere il campo elettrico desiderato anche utilizzando contenitori non convenzionali al fine di applicare i PEF a fluidi confezionati non direttamente accessibili, come nel caso di bottiglie di vetro contenenti vino.

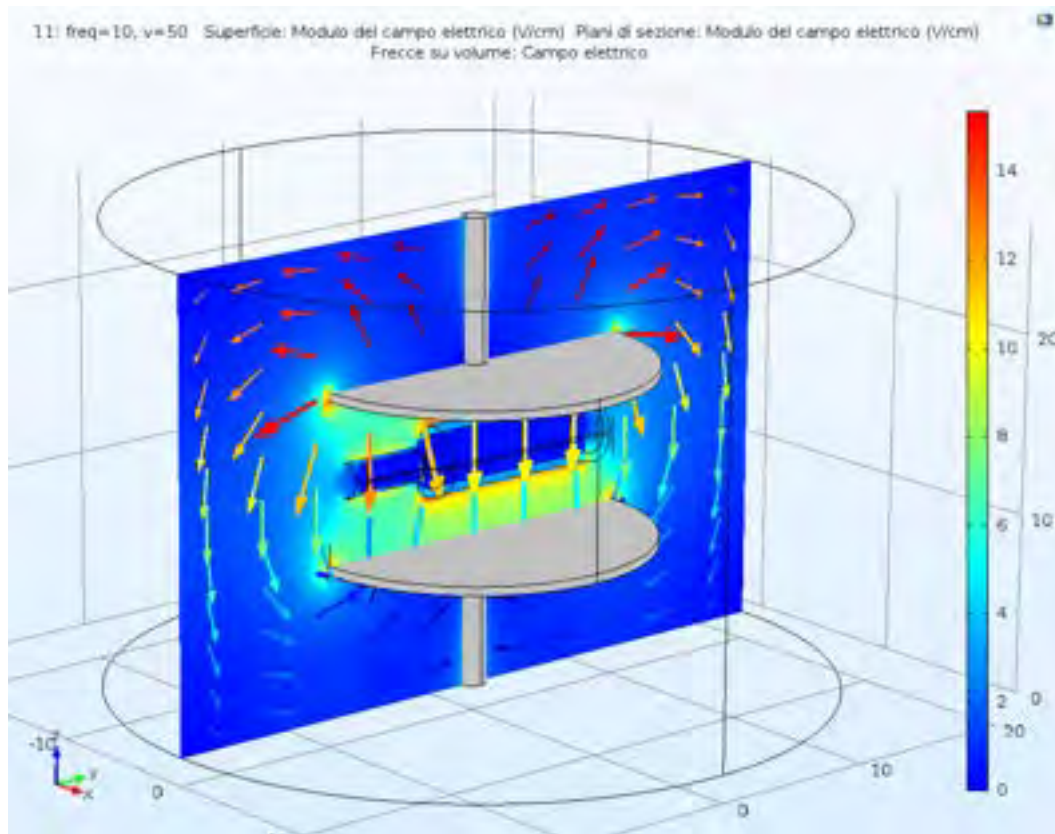


Figura 6.2. Distribuzione di campo elettrico ottenuta in ambiente Comsol Multiphysics.

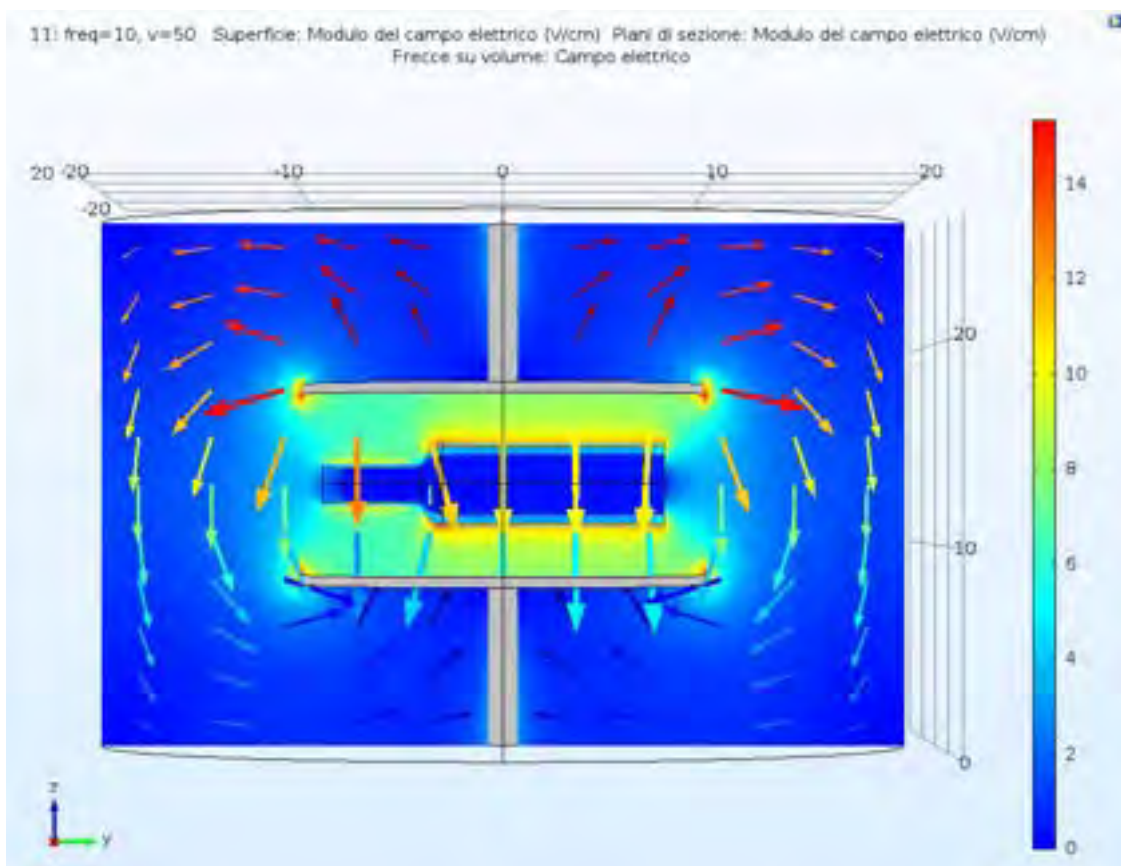


Figura 6.3. Distribuzione di campo elettrico ottenuta in ambiente Comsol Multiphysics.

7 Conclusioni

Le attività del secondo anno si sono focalizzate sull'obiettivo di modellare, sotto i diversi possibili punti di vista, il fenomeno dei PEF applicati per l'inattivazione batterica negli alimenti. La raccolta dei dati in letteratura e le misurazioni di alcuni parametri mancanti ha permesso di mettere a punto un modello efficace di previsione dell'inattivazione.

In particolare è stato approfondito il tema della inattivazione per il vino, studiando eventuali soluzioni che permettano l'azione dopo l'imbottigliamento. I risultati delle simulazioni hanno mostrato risultati sicuramente promettenti da sottoporre a prossima verifica sperimentale anche alla luce delle caratteristiche dei macchinari disponibili per la generazione stessa dei PEF.

8 Bibliografia

- [1] U.S. Food and Drug Administration, «Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies,» Institute of Food Technologists, Silver Spring, 2000.
- [2] H. P. J. Hülshager e E. G. Niemann, «Killing of bacteria with electric pulses of high field strength,» *Radiation and Environmental Biophysics*, vol. 20, n. 1, pp. 53-65, 1981.
- [3] H. Hülshager e E. G. Niemann, «Lethal effects of high-voltage pulses on E. coli K12,» *Radiation and Environmental Biophysics*, vol. 18, n. 4, pp. 281-288, 1980.
- [4] The MathWorks, Inc., *MATLAB and Statistics Toolbox*, Natick, Massachusetts, United States, Release 2016a .
- [5] M. Peleg, «A model of microbial survival after exposure to pulsed electric fields,» *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 67, n. 1, pp. 93-99, 1995.
- [6] S. Jayaram e G. S. P. M. A. Castle, «Kinetics of sterilization of Lactobacillus brevis cells by the application of high voltage pulses,» *Biotechnology and Bioengineering* , vol. 40, n. 11, pp. 1412-1420, 1992.
- [7] G. Lupò, « Corso di Materiali e Tecnologie Elettriche,» 2009/10. [Online]. Available: http://www.elettrotecnica.unina.it/files/lupo/upload/MTE__04.pdf. [Consultato il giorno 29 Settembre 2017].
- [8] XS Instruments, «CONDUCTIVITY METERS,» [Online]. Available: <http://www.xsinstruments.com/01/conductimeters.htm>. [Consultato il giorno 2 Ottobre 2017].
- [9] M. Salmeri e A. Mencattini, *Misure e analisi dati*, Roma: TEXMAT, 2016.
- [10] A. H. Scott e H. L. Curtis, «Edge correction in the determination of dielectric constant,» *Journal of Research*, vol. 22, pp. 747-775, 1939.
- [11] H. L. Lelieveld, S. Notermans e S. W. H. De Haan, *Food preservation by pulsed electric fields: from research to application*, Elsevier, 2007.
- [12] J. E. Dunn e J. S. Pearlman, «Methods and apparatus for extending the shelf life of fluid food products». Brevetto U.S. Patent No. 4,695,472., 22 September 1987.
- [13] COMSOL Multiphysics®, *Version 4.1 COMSOL, Inc.*, Burlington, MA, USA., 2011.
- [14] S. Ramo, J. R. Whinnery, T. Van_Duzer, P. Antognetti, B. Bianco e A. Chiabrera, *Campi e onde nell'elettronica per le comunicazioni*, Milano, Italy: Franco Angeli Editore, 1984.
- [15] C. Serpico, «Note sulla teoria dei campi e del potenziale,» 7 Gennaio 2002. [Online]. Available: http://wpage.unina.it/serpico/teaching/note_sui_campi.pdf. [Consultato il giorno 28 Settembre 2017].
- [16] COMSOL Multiphysics software, «The Finite Element Method (FEM),» [Online]. Available: <https://www.comsol.com/multiphysics/finite-element-method>. [Consultato il giorno 2 Ottobre 2017].

CURRICULUM VITAE

di *Marcello Salmeri*, nato a Roma il 27 giugno 1963.

Marcello Salmeri consegue la **Laurea in Ingegneria Elettronica** nel 1989 presso l'Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", e nel 1993 il **Dottorato di Ricerca in Ingegneria Elettronica, dell'Informazione e dell'Automazione**. Il 2 novembre 1994 prende servizio come **Ricercatore Universitario** presso il Dipartimento di Ingegneria Elettronica dell'Università di Roma "Tor Vergata". Il 1° ottobre 2005 prende servizio come **Professore Associato** presso l'Università di Roma "Tor Vergata". Attualmente è del SSD INF-ING/07 (Misure Elettriche ed Elettroniche).

*Gli argomenti di ricerca attualmente si articolano essenzialmente sulla **caratterizzazione metrologica di sistemi (di elaborazione e dispositivi)** e sullo **studio e implementazione di algoritmi e sistemi di elaborazione dati**.*

Queste tematiche sono state sviluppate in particolare negli ambiti delle apparecchiature e procedure diagnostiche nella medicina al fine di sviluppare metodi di supporto decisionali da parte del medico. Esse hanno coinvolto tra l'altro l'ideazione e la valutazione di metriche atte a valutare l'efficacia di sistemi di elaborazione in campo decisionale, in termini di specificità, sensibilità, accuratezza, precisione etc. e la modellizzazione, rappresentazione e propagazione dei contributi di incertezza di misura attraverso algoritmi e sistemi di acquisizione ed elaborazione di segnali e immagini e sistemi di previsione di serie di dati temporali.

Le ricerche hanno approfondito anche argomenti di analisi e processamento dati non convenzionali come reti neurali e sistemi in logica fuzzy.

Si è occupato nel settore della microelettronica di tematiche inerenti la valutazione della potenza dissipata e l'ottimizzazione di architetture per l'efficienza energetica.

*Tra le attività professionali ha svolto collaborazioni di consulenza per la valutazione di congruenza e la stesura di capitolati tecnici per diverse aziende (**Olivetti, Lottomatica, Ferrovie dello Stato**).*

*È stato consulente di **Texas Instruments, Alenia, Consultant, Q-Service, Dipartimento di Amministrazione Penitenziaria del Ministero di Giustizia, Geyser | 3, ENEA, Pragma, Lince, Xenta Systems**.*

*È stato collaboratore di CTU (**Consulente Tecnico di Ufficio**) di processi civili e penali per i tribunali di Velletri, Albano e Frascati e **Consulente di parte per l'Avv. Carlo Taormina** per procedimenti penali.*

*Attualmente è docente del corso di **Misure ed Analisi Dati**, in cui svolge il programma della teoria delle misure e dell'analisi statistica dei dati nonché tematiche relative al supporto alle decisioni.*

Il 29 luglio 2016 è stato nominato dal Rettore Coordinatore del Corso di Laurea in Ingegneria Elettronica.