

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI

CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA IN

TECNOLOGIE ALIMENTARI

**VALORIZZAZIONE BIOTECNOLOGICA DI FARINE VEGETALI
IN INGREDIENTI INNOVATIVI AD ALTO VALORE AGGIUNTO**

Tesi in

69153 – BIOLOGIA DEI MICRORGANISMI

Relatore:

Prof.ssa Francesca Patrignani

Candidata:

Ilaria Timoncini

Matricola n° 975150

Correlatore:

Dott.ssa Samantha Rossi

Anno Accademico 2022/2023

Sessione unica

INDICE

| | |
|---|----|
| CAPITOLO 1 | 1 |
| - PREMessa DELLA TESI | 1 |
| CAPITOLO 2 | 4 |
| - IL CECE (<i>Cicer arietinum</i> L.) | 4 |
| 2.1 – Le Fabaceae | 4 |
| 2.1.1 – <i>Composizione chimica della granella delle Fabaceae</i> | 6 |
| 2.2 – Il Cece (<i>Cicer arietinum</i> L.) | 9 |
| 2.2.1 – <i>Composizione chimica del cece</i> | 12 |
| 2.2.2 – <i>Le Proteine</i> | 14 |
| 2.2.3 – <i>I Carboidrati</i> | 16 |
| 2.2.4 – <i>I Grassi</i> | 19 |
| 2.2.5 – <i>I Minerali</i> | 21 |
| 2.2.6 – <i>Le Vitamine</i> | 23 |
| 2.3 – Le proprietà nutrizionali del cece | 24 |
| 2.4 – I benefici del cece per la salute umana | 25 |
| 2.5 – La Farina di ceci | 26 |
| 2.6 – Consumi e Mercato globale | 29 |
| 2.6.1 – <i>Mercato globale delle Fabaceae da granella</i> | 29 |
| 2.6.2 – <i>Mercato globale dei ceci</i> | 30 |
| 2.6.3 – <i>Mercato globale della farina di ceci</i> | 33 |
| CAPITOLO 3 | 34 |
| - LA FERMENTAZIONE | 34 |
| 3.1 – La Fermentazione e gli alimenti funzionali | 34 |
| 3.2 – La Fermentazione delle farine di legumi | 38 |
| 3.2.1 – <i>Impatto della fermentazione sul profilo nutrizionale dei legumi</i> | 41 |
| 3.2.2 – <i>Impatto della fermentazione sulle proprietà funzionali, sensoriali e salutari dei legumi</i> | 45 |
| 3.3 – La Fermentazione della farina di ceci | 47 |
| 3.3.1 – <i>Impatto della fermentazione della farina di ceci sulle proteine</i> | 50 |
| CAPITOLO 4 | 52 |
| - I MICRORGANISMI | 52 |
| 4.1 – I Lieviti | 52 |
| 4.1.1 – <i>Yarrowia lipolytica</i> | 54 |
| 4.1.2 – <i>Debaryomyces hansenii</i> | 56 |
| 4.1.3 – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 58 |
| 4.2 – I Batteri lattici | 59 |
| 4.2.1 – <i>I Latobacilli</i> | 62 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.2 – <i>I Lattococchi</i> | 64 |
| 4.3 – I Bacilli | 65 |
| CAPITOLO 5 | 68 |
| - OBIETTIVI DELLA TESI | 68 |
| CAPITOLO 6 | 70 |
| - MATERIALI E METODI | 70 |
| 6.1 – Condizioni di crescita dei microrganismi selezionati | 70 |
| 6.2 – Preparazione dei campioni di farina di ceci fermentata | 72 |
| 6.3 – Analisi microbiologiche | 74 |
| 6.4 – Determinazione del pH | 76 |
| 6.5 - Analisi del contenuto peptidico e proteico | 76 |
| 6.5.1 – <i>Estrazione delle proteine dalle farine di legumi</i> | 76 |
| 6.5.2 - <i>Saggio OPA</i> | 77 |
| 6.5.3 – <i>Saggio Bradford</i> | 80 |
| 6.5.4 – <i>Saggio SDS-PAGE</i> | 82 |
| 6.6 – Analisi del profilo in molecole volatili | 84 |
| CAPITOLO 7 | 86 |
| - RISULTATI E DISCUSSIONE | 86 |
| 7.1 – Analisi microbiologiche | 86 |
| 7.2 – Variazione di pH | 91 |
| 7.3 – Quantificazione del contenuto peptidico e proteico | 93 |
| 7.4 – Analisi del profilo in molecole volatili | 104 |
| 7.4.1 – <i>I Bacilli</i> | 112 |
| 7.4.2 – <i>I Batteri Lattici</i> | 113 |
| 7.4.3 – <i>I Lieviti</i> | 114 |
| CAPITOLO 8 | 117 |
| - CONCLUSIONI | 117 |
| RINGRAZIAMENTI | 123 |
| BIBLIOGRAFIA | 124 |

1. PREMESSA DELLA TESI

L'alimentazione svolge un ruolo essenziale sia per le attività vitali dell'organismo umano sia per il mantenimento del benessere psico-fisico del corpo stesso. La ricerca scientifica ha messo in luce che molti alimenti contengono componenti potenzialmente benefici per la salute umana, quali frutta, verdura, cereali e legumi (Turco, 2018).

Durante la produzione e trasformazione, gli alimenti perdono composti nutrizionali importanti, come proteine, fibre, sali minerali e vitamine. Pertanto, grazie ai nuovi trend alimentari e all'aumento della consapevolezza da parte dei consumatori, negli ultimi decenni, si è assistito ad un crescente orientamento di molti acquirenti verso alimenti meno raffinati, integrali, salutari e sostenibili.

La crescente attenzione per un'alimentazione più salutare e sostenibile ha indirizzato molti consumatori a dare maggiore importanza alla scelta degli alimenti che introducono con la dieta. In particolare, la scelta del consumatore finale è quella di privilegiare alimenti a basso contenuto di zuccheri, grassi saturi e sale, e ricchi di nutrienti, antiossidanti e fibra. Al contempo, l'incremento dell'accortezza verso la ripercussione dei consumi sull'ambiente ha orientato gli acquirenti a preferire alimenti che siano sostenibili, a basso impatto ambientale e prodotti localmente.

In particolare, in Italia si è registrato un aumento del consumo di legumi.

Le farine vegetali si possono ottenere a partire da diverse materie prime, come i cereali, i legumi, le radici e i semi. Di conseguenza, ogni tipologia di farina vegetale ha una composizione chimica e proprietà nutrizionali e funzionali differenti, che le rendono idonee per diverse applicazioni in campo alimentare. Inoltre, molte farine vegetali vengono prodotte da sottoprodotti e scarti della filiera agroalimentare, riducendo in questo modo lo spreco alimentare e l'impatto ambientale.

Tra le farine vegetali, le farine di cereali sono le più frequenti e più comunemente utilizzate nella filiera agroalimentare. La farina di frumento è la più utilizzata per le sue caratteristiche funzionali di creare il glutine. Tuttavia, le farine di cereali prive

di glutine, quali la farina di riso e la farina di mais, stanno diventando sempre più rinomate per le loro proprietà funzionali e per la loro idoneità nei confronti delle persone affette da celiachia.

Le farine di legumi, come la farina di ceci, la farina di lenticchie, la farina di fagioli e la farina di piselli, sono particolarmente ricche di nutrienti importanti dal punto di vista salutistico e nutrizionale. Infatti, esse contengono vitamine del gruppo B, come la vitamina B1, B2, B3 e B9, che svolgono un ruolo essenziale nei processi biologici. Oltre a possedere un buon contenuto di vitamine, tali farine sono ricche di proteine e di minerali, come zinco, calcio, fosforo e potassio, antiossidanti e fibre che si occupano del corretto funzionamento del tratto gastro-intestinale e regolano i livelli di colesterolo nel sangue. Inoltre, le farine di legumi sono povere di grassi saturi, zuccheri e sali. Per la loro ricchezza in nutrienti, i legumi e le farine di loro derivazione sono sempre più utilizzati per la produzione di alimenti funzionali, salutari ed alto valore aggiunto, vale a dire alimenti caratterizzati da un notevole apporto di componenti che hanno un effetto benefico sulla salute umana.

Grazie alla loro composizione chimica, esse sono particolarmente utilizzate per la produzione di alimenti proteici ed alto contenuto di fibre. Al contempo però, le farine di legumi non sono in grado di creare un reticolo glutinico e per questo motivo presentano alcuni vincoli e restrizioni.

Alla luce dei vantaggi citati precedentemente, le farine vegetali rappresentano un ingrediente innovativo per la formulazione e la produzione di alimenti funzionali ad alto valore aggiunto. Grazie alla loro varietà e diversità, esse possono essere usate per la produzione di un vasto ventaglio di alimenti, quali la pasta, il pane, i biscotti, gli snack, i dolci e gli alimenti proteici.

Tuttavia, per sfruttare completamente le potenzialità delle farine vegetali, è necessario implementare la ricerca e lo sviluppo di nuove tecnologie di produzione e di possibile applicazione.

Il processo fermentativo portato avanti da microorganismi appartenenti a specie diverse può scaturire nella produzione di una vasta gamma di metaboliti e composti aventi funzionalità differenti. Infatti, i processi fermentativi possono aumentare la digeribilità delle proteine delle materie prime ed aumentare la biodisponibilità in nutrienti, quali antiossidanti e proteine. Questi effetti possono essere sfruttati per la produzione di alimenti ad alto valore aggiunto.

2. IL CECE (*Cicer arietinum* L.)

2.1 Le *Fabaceae*

I legumi appartengono alla famiglia botanica delle *Fabaceae*, generalmente definite *Leguminose*. La famiglia delle *Fabaceae* comprende molte piante erbacee appartenenti all'ordine delle *Fabales* che vengono coltivate per diversi scopi. Alcune sono usate sottoforma di granella per il consumo umano, raccolte secche come il cece e la lenticchia, oppure previo confezionamento nell'industria conserviera dell'inscatolamento o del surgelato. I semi di altre *Fabaceae* forniscono quantità elevate di proteine ed olio, quali la soia e l'arachide. Altre *Leguminose* sono destinate all'alimentazione zootecnica, mentre un'ultima categoria di tali piante sono coltivate per sovescio, dato che al termine del ciclo colturale non vengono raccolte ma interrate per arricchire il terreno di sostanza organica ed azoto (Baldoni, 2021).

Le leguminose da granella costituiscono un gruppo di colture abbastanza omogeneo per le caratteristiche botaniche, agronomiche e nutrizionali. Le leguminose da granella sono quasi tutte originarie del Vecchio mondo, escluse alcune specie di *Phaseolus* e di *Lupinus* provenienti dal Nuovo Mondo e la soia proveniente dall'estremo oriente. Nel processo di domesticazione, le leguminose da granella hanno subito alcune modificazioni. Per questo motivo, le specie coltivate al giorno d'oggi differiscono da quelle selvatiche (Baldoni e Giardini, 2000):

- Per l'abito vegetativo, caratterizzato da una ridotta ramificazione, da rami più robusti e da foglie meno numerose e più grandi;
- Per un aumento della dimensione dei frutti e dei semi e del numero di questi ultimi per legume;
- Per la riduzione della deiscenza dei legumi e della dormienza dei semi e per la maggiore permeabilità dei semi all'acqua;
- Per la riduzione o la scomparsa di sostanze tossiche e di principi antinutrizionali contenuti nei semi.

Secondo l'attuale classificazione, le *Fabaceae* comprendono 3 diverse sottofamiglie:

- *Cesalpinoidee* (come il carrubo e il tamarindo);
- *Mimosoidee* (come l'acacia e la mimosa);
- *Papiloidee* (come il cece, il fagiolo, la fava, la lenticchia, il pisello e la soia).

Le *Leguminose* sono classificate in 2 grandi gruppi in base alle caratteristiche della germinazione:

- Specie di *Leguminose* a germinazione ipogea in cui i cotiledoni rimangono sottoterra;
- Specie di *Leguminose* a germinazione epigea in cui i cotiledoni si trovano al di sopra del terreno.

Le *Fabaceae* rappresentano la principale fonte di proteine nella dieta umana e zootecnica. Il notevole contenuto di proteine dei loro semi è dovuto alla capacità di fissare l'azoto atmosferico in composti organici quaternari. La fissazione azotata avviene per mezzo di batteri simbiotici obbligati che appartengono al genere *Rhizobium* (Baldoni, 2021).

Le dimensioni della pianta possono variare. Infatti, esistono leguminose erbacee, leguminose arbustive e leguminose arboree. Il fiore delle *Fabaceae* è papilionaceo. La caratteristica che contraddistingue tutte le piante appartenenti alla famiglia delle *Fabaceae* è il frutto. Il frutto è un legume, solitamente deiscente o, più raramente indeiscente. Il frutto, chiamato anche baccello, contiene i semi.

I semi delle *Leguminose* possono essere consumati sia freschi, sia secchi sia conservati. I semi secchi vengono consumati dopo cottura in acqua per agevolarne sia la cottura sia l'eliminazione di fattori antinutrizionali. In altre situazioni, i semi vengono lavorati per la produzione di farina, o per l'estrazione di concentrati e isolati proteici o oli destinati all'alimentazione umana (Baldoni e Giardini, 2000).

Il seme delle *Leguminose* (figura 1), di forma e colore diverso, è privo di endosperma e il tegumento che avvolge l’embrione presenta due cotiledoni (Baldoni e Giardini, 2000). Il tegumento può avere colori diversi (rosa, rosso, nero) grazie alla presenza al suo interno di pigmenti anticianici e composti fenolici affini che gli conferiscono un forte potenziale antiossidante (McGee, 2016).



Figura 1: Differenti varietà di legumi

2.1.1 Composizione chimica della granella delle *Fabaceae*

I semi sono ricchi di proteine, concentrate nelle due foglie cotiledonari. Per questo motivo, i semi delle *Fabaceae* rivestono un’importanza enorme quali fonti proteiche per la dieta umana e zootecnica che è prevalentemente basata sulle cariossidi di cereali e sui tuberi, entrambi ricchi di carboidrati ma poveri di composti azotati. Alcuni semi contengono anche notevoli quantità di grassi (Baldoni, 2021).

I semi delle *Fabaceae* sono caratterizzati generalmente da un alto contenuto in proteine, compreso tra il 20-40% della sostanza secca. Tuttavia, il contenuto proteico della granella delle leguminose presenta un’ampia variabilità, con massimi nei lupini

e nella soia (Tabella 2). La ricchezza in proteine delle granelle delle leguminose fa sì che tale alimento può essere considerato come sostituto della carne nelle diete “vegetariane” e “vegane” (Baldoni, 2021). Inoltre, la cottura aumenta la digeribilità delle proteine (Baldoni e Giardini, 2000).

Tabella 2: Contenuto proteico dei semi delle *Fabaceae*

TAB. 14.1. – *Contenuto proteico dei semi: g/100 g di s.s. del seme. (FAO 1981 ed altri)*

| Specie | Media | Campo di variabilità |
|----------------|---------------------|------------------------------------|
| Frumento | 13,0 | 7,0 ÷ 22,0 |
| Cajanus cajan | 21,0 | 17,9 ÷ 25,8 |
| Cece | 22,2 | 19,1 ÷ 31,3 |
| Pisello | 23,1 | 14,2 ÷ 36,1 |
| Fagiolo | 23,9 | 15,2 ÷ 36,0 |
| Fava | 24,0 | 22,0 ÷ 38,2 |
| Lenticchia | 25,0 (Smartt, 1976) | 20,4 ÷ 30,5 (FAO, 1977) |
| Arachide | 26,2 | 17,1 ÷ 31,0 |
| Cicerchia | 27,0 | 25,0 ÷ 31,0 (Foti, 1981) |
| Lupinus sp.pl. | 34,0 | 28,0 ÷ 45,8 (Cerletti e Al., 1983) |
| Soia | 40,3 | 28,7 ÷ 50,1 |

Le proteine delle *Fabaceae* sono meno eterogenee rispetto alle proteine dei cereali e sono distinte in due gruppi principali (Rachwa-Rosiak et al., 2015):

- Globuline presenti in maggiore quantità;
- Albumine.

Queste proteine possiedono un contenuto amminoacidico abbastanza equilibrato e un valore biologico medio-alto, dato che contengono una buona quantità dell'amminoacido essenziale lisina (Gómez *et al.*, 2008), ma hanno una lieve carenza di amminoacidi solforati, come metionina, cistina, triptofano (Baldoni, 2021). La conoscenza della composizione amminoacidica dei legumi e dei cereali permette di comprendere l'effetto di sinergismo nei riguardi del valore biologico, che si realizza quando si miscelano farine di leguminose e farine di cereali (Secchi, 1979).

I carboidrati dei semi delle Leguminose costituiscono circa il 60% del peso secco (Tabella 3) e sono rappresentati principalmente dall'amido per il 40-50%, mentre gli

zuccheri semplici, come glucosio e fruttosio sono presenti solo in tracce. Oltre all'amido e a basse quantità di zuccheri semplici, i carboidrati dei semi delle *Fabaceae* comprendono anche pentosani, destrine, stachiosio, raffiniosio, saccarosio e galattani. La presenza di zuccheri solubili appartenenti alla famiglia del raffiniosio determina fermentazioni intestinali dopo la loro ingestione e flatulenza. Anche se i semi delle *Leguminose* contengono alti quantitativi di carboidrati, essi hanno un indice glicemico moderato grazie all'abbondanza di fibra alimentare, costituita da cellulosa ed emicellulosa.

I lipidi rappresentano l'1-2% della sostanza secca fino al 48%. Essi sono costituiti da circa il 60% di acidi grassi polisanturi e da un 6% di cere.

Nei semi delle *Leguminose* è presente anche un buon contenuto di vitamine, costituite prevalentemente dalle vitamine del gruppo B, quali tiamina, biotina, niacina e acido folico, seguite dalla vitamina A e C, le quali però sono presenti solo nei legumi freschi, mentre sono praticamente assenti in quelli secchi e trasformati. In termini di sali minerali, i legumi apportano ottime quantità di calcio, potassio, zinco, rame e ferro, tanto che spesso vengono consigliati nelle diete per gli anemici (Pardossi *et al.*, 2018).

Tabella 3: Profilo nutrizionale della granella delle principali *Fabaceae* ortive (valori riferiti a 100 g di prodotto secco)

| Specie | Proteine totali | Lipidi totali | Carboidrati totali | Amido | Saccarosio | Raffiniosio | Stachiosio | Verbascosio | Fibre |
|---------------------|-----------------|---------------|--------------------|-------|------------|-------------|------------|-------------|-------|
| Cece | 22,5 | 4,5 | 65,3 | 44,4 | 2,0 | 1,5 | 5,5 | 3,0 | 9 |
| Fagiolo | 23,0 | 1,2 | 61,3 | 41,5 | 5,0 | 0,3 | 4,1 | 4,0 | 10 |
| Fagiolo dell'Occhio | 23,5 | 1,3 | 60,0 | 45,0 | 1,1 | 1,7 | 2,0 | 3,0 | 7 |
| Fava | 21,3 | 3,0 | 59,8 | 41,0 | 3,3 | 0,2 | 0,7 | 2,5 | 12 |
| Lenticchia | 25,0 | 1,0 | 64,4 | 46,0 | 2,9 | 0,5 | 2,4 | 0,9 | 12 |
| Lupino spp. | 39,0 | 4,3 | 36,7 | 0,4 | 2,5 | 0,7 | 6,8 | 0,6 | 26 |
| Pisello | 22,5 | 1,6 | 65,5 | 45,0 | 2,1 | 0,9 | 2,4 | 3,2 | 12 |
| Soia | 37,9 | 18,0 | 32,5 | 1,5 | 6,2 | 0,9 | 4,3 | 0,1 | 20 |

Negli ultimi anni, la ricerca scientifica ha evidenziato la ricchezza in isoflavoni delle *Leguminose*. Gli isoflavoni sono una sottoclasse di composti fenolici di origine vegetale appartenenti alla classe dei flavonoidi. Tra questi, la genistenina e la

daidzeina hanno mostrato alcune proprietà chemio-preventive nei confronti del cancro. Inoltre, gli isoflavoni sono efficaci anche contro alcuni disturbi tipici della menopausa (Pardossi *et al.*, 2018).

I semi di molte *Fabaceae* contengono fattori antinutrizionali, che ne riducono la digeribilità, li rendono allergenici o favoriscono la flatulenza. Questi sono composti antienzimatici, alcaloidi, lectine, fitati e tannini e α -galattosidi. Però quasi tutti i composti antinutrizionali sono solubili in acqua e quindi possono essere rimossi attraverso la bollitura (Baldoni, 2021).

2.2 Il Cece (*Cicer arietinum* L.)

Il cece, *Cicer arietinum* L., è una delle leguminose da granella più antiche e largamente utilizzate nel Medio ed Estremo Oriente (Baldoni e Giardini, 2000). Le più remote tracce di utilizzazione di questa pianta risalgono a oltre 7400 anni fa nell'attuale Turchia, come provato da ritrovamenti archeologici.

Il cece è originario dell'Asia occidentale, a partire dalla quale si è diffusa a ovest nell'area mediterranea e ad est del subcontinente indiano. Solo in tempi più recenti ha raggiunto dal Mediterraneo il continente africano, diffondendosi soprattutto in Etiopia. Successivamente, il cece venne esportato ed introdotto nelle Americhe e in Australia (Ranalli *et al.*, 2018).

Il cece è la terza leguminosa da granella per importanza mondiale, dopo il fagiolo e il pisello. La superficie coltivata nel mondo è di circa 11 milioni di ettari e la maggior parte del prodotto è consumata localmente. I principali Paesi produttori di cece sono l'India, il Pakistan, la Turchia, l'Iran, il Messico e l'Australia. In Europa, i principali produttori di cece sono la Spagna, seguita dall'Italia, anche se la sua coltivazione è andata nettamente calando nei Paesi sviluppati (Ranalli *et al.*, 2018).

Il cece appartiene alla famiglia delle *Fabaceae*. Il genere *Cicer* comprende 42 differenti specie, tra cui *Cicer arietinum*. In base alle caratteristiche del seme, quali

forma del seme, colore e grandezza, le cultivar di cece coltivato possono essere classificate in 2 principali categorie (figura 4):

- “desi”;
- “kabuli”.

I “desi” rappresentano circa l’85% della produzione mondiale annua e sono coltivati soprattutto nel continente indiano. Essi sono piccoli, rugosi, angolosi e scuri per la presenza di composti fenolici. La pianta è di taglia più bassa e presenta un portamento semi-prostato. Il fiore è pigmentato. I “kabuli” sono originari del bacino del Mediterraneo, dove sono ampiamente coltivati (oltre che in Asia occidentale, Africa settentrionale ed Europa occidentale). Essi sono caratterizzati da una forma di testa di ariete, grossi, arrotondati, lisci, di colore chiaro e generalmente con peso medio elevato. Le piante sono di taglia medio-alta e il fiore è bianco (Ranalli *et al.*, 2018).



Figura 4: Ceci “kabuli” e “desi”

Il cece è una pianta erbacea annuale, a portamento eretto, semi-prostato o prostato, di un’altezza che può raggiungere 1 metro, ma che raramente supera i 50-60 cm. La pianta di cece è caratterizzata da una germinazione ipogea. Tutta la pianta è verde grigiastra e pubescente per la presenza su tutti gli organi di fitti peli ghiandolari che secernono essudato acido per la presenza di acido malico e ossalico (Ranalli *et al.*,

2018). Di conseguenza, il cece è una pianta acido-resistente come dimostrano le solide strutture anatomiche delle profonde radici e degli steli e la superficie densamente pubescente degli steli e delle foglie (Baldoni e Giardini, 2000). L'apparato radicale è piuttosto profondo (fino a 2 metri) ed è costituito da una radice principale a prevalente sviluppo verticale e da ramificazioni laterali più o meno abbondanti. Gli steli sono eretti o flessuosi, angolosi, più o meno ramificati. Le foglie sono composte con 5-7 paia di foglioline ovate o ellittiche, con caratteristico margine denticolato. I fiori, tipicamente papilionacei, sono in posizione ascellare, normalmente solitari o più raramente in coppia su un unico peduncolo. La corolla è generalmente bianca, ma può assumere colorazioni diverse, come viola, rosa, rosso, azzurro o verde (Nwokolo e Smartt, 1996). Il frutto o baccello è un legume a conformazione ovato-oblunga, densamente pubescente, contenente 1 o 2 semi. I semi presentano un'elevata variabilità morfologica: forma globulare o angolare-rostrata, superficie liscia o rugosa, colori diversi (biancastro, crema, verde, rosso, bruno, nero) e peso unitario variabile da 170 a 600 mg e oltre (Ranalli *et al.*, 2018).

Per tradizione, la granella di cece viene utilizzata allo stato secco sia per l'alimentazione umana sia per quella animale. I semi secchi possono essere utilizzati previa cottura in acqua oppure tostati o ridotti in farina (Tesi, 1994). Solo in minima parte, il cece viene consumato allo stadio di baccelli o di semi freschi (Ranalli *et al.*, 2018).

Secondo i più recenti dati della FAO (Food and Agriculture Organization), la produzione di ceci rappresenta circa il 13% della produzione totale di legumi nel mondo che è pari a 9,96 milioni di tonnellate (FAO 2020).

I legumi, tra cui i ceci, rappresentano un componente molto importante della dieta umana in diverse aree geografiche. Essi rappresentano una fonte significativa di proteine vegetali e completano il fabbisogno di proteine ottenute da altri alimenti, come cereali, radici e tuberi, soprattutto nei Paesi in via di sviluppo. Nel corso degli

ultimi anni, l'attenzione rivolta ai legumi è aumentata sempre di più grazie alle loro proprietà nutrizionali e salutistiche.

2.2.1 Composizione chimica del cece

Il cece è considerato un legume ricco di sostanze nutritive e composti benefici per la salute umana, quali carboidrati, proteine, acidi grassi insaturi, minerali, vitamine, fibre alimentari e isoflavoni (Wang *et al.*, 2021). I semi di *Cicer arietinum* sono caratterizzati da un alto contenuto in carboidrati (41,10 – 47,42%), un discreto livello di proteine (21,7 – 23,4%) e lipidi (3 – 10%). Le vitamine e i sali minerali sono presenti in quantità inferiori ma sono molto importanti dal punto di vista nutrizionale. L'amido è il principale costituente dei carboidrati dal punto di vista quantitativo. Infatti, esso rappresenta circa l'83,9% dei carboidrati totali (Rincòn *et al.*, 1998).

Per la sua composizione chimica, il cece è considerato un alimento bilanciato nell'apporto energetico e proteico (Sarmiento *et al.*, 2015).

I ceci sono considerati un ottimo alimento, perché hanno un contenuto proteico elevato, compreso tra 19,1 – 31,3% e una buona quantità di fibra e di grassi. Essi contengono anche nutrienti in concentrazione inferiori, quali minerali, vitamine e composti fenolici come gli isoflavoni. Come gli altri legumi, anche i ceci contengono composti antinutrizionali. La concentrazione dei composti antinutrizionali dipende dai trattamenti tecnologici a cui vengono sottoposti i ceci, come la germinazione e la rimozione della buccia che aiutano a migliorarne il profilo nutrizionale, riducendo la concentrazione di tannini e fitati (Ghavidel e Prakash, 2007).

In Tabella 5 è riportata la composizione nutrizionale dei ceci come materia prima tal quale e successivamente sottoforma di derivati, come la farina di ceci, i ceci in scatola e l'hummus, ottenuti da diversi processi tecnologici.

Tabella 5: Composizione dei ceci crudi e processati (per 100 g di prodotto)
Fonte: Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti d'America USDA 2011

| Composizione | Unità | Cece crudo | Farina | Ceci in scatola | Hummus |
|-----------------------------|-------|------------|--------|-------------------|----------------|
| Acqua | g | 11.53 | 10.28 | 66.72 | 66.59 |
| Energia | kcal | 364 | 387 | 139 | 166 |
| Proteine | g | 19.3 | 22.39 | 7.05 | 7.9 |
| Lipidi totali (grassi) | g | 6.04 | 6.69 | 2.77 | 9.6 |
| Carboidrati | g | 60.65 | 57.82 | 22.53 | 14.29 |
| Fibre | g | 17.4 | 10.8 | 6.30 ² | 6 |
| Zuccheri | g | 10.7 | 10.85 | — ³ | — ³ |
| <i>Minerali</i> | | | | | |
| Calcio | mg | 105 | 45 | 45 | 38 |
| Ferro | mg | 6.24 | 4.86 | 1.07 | 2.44 |
| Magnesio | mg | 115 | 166 | 26 | 71 |
| Fosforo | mg | 366 | 318 | 85 | 176 |
| Potassio | mg | 875 | 846 | 126 | 228 |
| Sodio | mg | 24 | 64 | 246 | 379 |
| Zinco | mg | 3.43 | 2.81 | 0.63 | 1.83 |
| <i>Vitamine</i> | | | | | |
| Vitamina C, acido ascorbico | mg | 4 | 0 | 0.1 | 0 |
| Tiamina | mg | 0.477 | 0.486 | 0.027 | 0.18 |
| Riboflavina | mg | 0.212 | 0.106 | 0.015 | 0.064 |
| Niacina | mg | 1.541 | 1.762 | 0.14 | 0.582 |
| Vitamina B6 | mg | 0.535 | 0.492 | — ³ | 0.20 |
| Folati | µg | 557 | 437 | 48 | 83 |
| Vitamina A | IU | 67 | 41 | 23 | 30 |

Inoltre, il cece è meno soggetto alla formazione di acrilammide, sostanza cancerogena che si forma durante la cottura dei prodotti da forno, grazie ad una migliore stabilità termica delle proteine del cece rispetto a quelle del grano e delle patate (Rachwa-Rosiak *et al.*, 2015).

I ceci “kabuli” e “desi” presentano non solo differenze nelle caratteristiche organolettiche, ma anche a livello compositivo. La differente composizione chimica delle 2 varietà di ceci è dovuta alla regione di coltivazione e alle condizioni che ne influenzano la lunghezza del ciclo vegetativo della pianta. I ceci “kabuli” e “desi” differiscono principalmente nel contenuto in proteine, fibre, carboidrati e polifenoli. Inoltre, il valore energetico dei ceci “kabuli” è pari a 365 kcal/100 g, mentre il valore energetico dei ceci “desi” è di 327 kcal/100 g (Rachwa-Rosiak *et al.*, 2015).

In Tabella 6 sono riportate le composizioni chimiche dei ceci “kabuli” e “desi”.

Tabella 6: Composizione chimica dei ceci “kabuli” e “desi”

Table 1 Chemical composition of *Kabuli* and *Desi* types of chickpea on dry matter basis (%)

| Component | Varieties of chickpea (%) | |
|--------------------------|---------------------------|-------|
| | Kabuli | Desi |
| Dry matter | 92.08 | 91.17 |
| Crude protein | 24.63 | 22.76 |
| Crude fibre | 6.49 | 9.94 |
| Total tannin | 0.09 | 0.12 |
| Total phenolic compounds | 0.27 | 0.26 |
| Nonfibrous carbohydrate | 49.13 | 46.81 |
| Starch | 39.12 | 38.48 |
| Soluble sugars | 8.43 | 7.53 |

Source: Maheri-Sis et al. (2008)

2.2.2 Le Proteine

I ceci, come tutte le leguminose, sono un’ottima fonte di proteine vegetali. La differenza nella composizione e nella quantità delle proteine presenti nei ceci e negli altri legumi è dovuta alle varietà, alle condizioni ambientali, quali area geografica di coltivazione e stagione di crescita delle piante, e ai metodi di analisi utilizzati durante gli studi (Rachwa-Rosiak *et al.*, 2015).

Il contenuto proteico nei ceci varia significativamente nei semi secchi prima (17 – 22%) e dopo la decorticazione (25,3 – 28,9%) (Jukanti *et al.*, 2012).

Le principali proteine presenti nei legumi appartengono al gruppo delle globuline e delle albumine. Altre proteine presenti nei legumi, e quindi anche nei ceci, ma in quantità inferiore sono le gluteline e le prolammine. Alcuni studi su differenti varietà di ceci hanno dimostrato che il contenuto proteico varia dal 20,9 al 25,27%. La quantità di albumine era di 8,39 – 12,31%, la quantità di globuline del 53,44 – 60,29%, la quantità di gluteline del 3,12 – 6,89% e la quantità di prolammine del 19,38 – 24,40%. In uno studio più recente è stato evidenziato che le globuline rappresentavano il 41,79% delle proteine dei ceci, le albumine il 16,18%, le gluteline il 9,99% e le prolammine lo 0,48% (Rachwa-Rosiak *et al.*, 2015).

I ceci contengono un discreto contenuto di proteine, ma la loro composizione amminoacidica non è molto equilibrata. Infatti, le proteine dei ceci sono carenti in amminoacidi solforati, quali metionina, cisteina e triptofano (Baldoni e Giardini, 2000). Di conseguenza, si può affermare che le proteine contenute nei ceci hanno un medio-alto valore biologico. Alcuni studi hanno dimostrato che nella farina di ceci sono presenti altri amminoacidi limitanti che sono l'acido aspartico e l'arginina. I ceci presentano proteine che contengono 18 amminoacidi, di cui 8 sono amminoacidi essenziali (Wang *et al.*, 2021).

È stato messo in luce che le proteine isolate dalla farina di ceci hanno una struttura più flessibile. Questo significa che esse sono più accessibili al nostro corpo (Rachwa-Rosiak *et al.*, 2015).

In Tabella 7 è riportata la composizione in amminoacidi dei semi di ceci.

Tabella 7: Composizione in amminoacidi dei semi di ceci

Table 3 Comparison of amino acid composition of chickpea grains

| Type of amino acid | Amino acid content | | |
|---------------------------------|----------------------------|----------------------|-----------------------------|
| | g/100g sample ^a | g/16g N ^b | g/100g protein ^c |
| Essential amino acids | | | |
| Isoleucine | 0.36 | 4.1 | 4.5–4.8 |
| Leucine | 0.48 | 7.0 | 8.1–8.5 |
| Lysine | 0.91 | 7.7 | 6.7–7.0 |
| Methionine | 0.12 | 1.6 | 0.8–1.1 |
| Phenylalanine | 0.42 | 5.9 | 5.0–5.3 |
| Threonine | 0.06 | 3.6 | 2.7–3.0 |
| Tryptophan | — | 1.1 | 0.8–0.9 |
| Valine | 0.38 | 3.6 | 4.1–4.6 |
| Cystine | — | 1.3 | 0.4–0.6 |
| Tyrosine | 0.19 | 3.7 | 2.6–2.8 |
| Nonessential amino acids | | | |
| Alanine | 0.26 | 4.4 | 4.7–5.2 |
| Arginine | 0.48 | 10.3 | 8.0–8.5 |
| Aspartic acid | 0.58 | 11.4 | 10.9–11.5 |
| Glutamic acid | 1.67 | 17.3 | 17.3–17.8 |
| Glycine | 0.26 | 4.1 | 3.4–3.6 |
| Histidine | 0.24 | 3.4 | 2.9–3.2 |
| Proline | 0.24 | 4.6 | 3.8–4.1 |
| Serine | 0.12 | 4.9 | 3.3–3.7 |

Source: ^aCandela *et al.* (1997), ^bAlajaji and El-Adawy (2006), ^cZia-Ul-Haq *et al.* (2007).

La digeribilità delle proteine dei ceci varia tra il 48 e l'89%, a seconda della fonte dei risultati della ricerca. La digeribilità delle proteine dei ceci può essere aumentata attraverso la cottura.

La digeribilità in vitro delle proteine della varietà ceci "kabuli" è maggiore della digeribilità delle proteine dei ceci "desi".

Inoltre, alcuni studi hanno messo in luce che la digeribilità delle proteine della farina di ceci può aumentare dal 72,2 – 83,2% all'83,7 – 88,8% attraverso la fermentazione della farina stessa. Allo stesso tempo, la farina di ceci fermentata si differenzia da quella tal quale per le caratteristiche organolettiche, quali colore, aroma e gusto e caratteristiche di texture. Inoltre, la farina di ceci fermentata presenta nella sua composizione una quantità maggiore di amminoacidi essenziali, quali metionina, cisteina, fenilalanina, tirosina e treonina rispetto alla farina di ceci che non è stata sottoposta a fermentazione (Rachwa-Rosiak *et al.*, 2015).

2.2.3 I Carboidrati

I carboidrati sono un componente molto importante dei ceci. Infatti, il contenuto totale di carboidrati dei ceci è superiore di quello degli altri legumi (Jukanti *et al.*, 2012), come è riportato in Tabella 8.

Tabella 8: Composizione nutrizionale (g/100 g) di differenti legumi

| Crops | Carbohydrate | Fat | TDF | Total sugars |
|---------------------------------------|--------------|-----|------|--------------|
| Chickpea (<i>Cicer arietinum</i> L.) | 60.7 | 6.0 | 17.4 | 10.7 |
| Pigeon pea (<i>Cajanus cajan</i> L.) | 23.8 | 1.6 | 5.1 | 3.0 |
| Bean (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) | 7.0 | 0.2 | 2.7 | 3.3 |
| Mung bean (<i>Vigna radiata</i> L.) | 62.6 | 1.2 | 16.3 | 6.6 |
| Peas (<i>Pisum sativum</i> L.) | 14.5 | 0.4 | 5.1 | 5.7 |
| Faba bean (<i>Vicia faba</i> L.) | 58.3 | 1.5 | 25.0 | 5.7 |

TDF, total dietary fibre.

I ceci sono caratterizzati da un alto contenuto di monosaccaridi, disaccaridi, oligosaccaridi e polisaccaridi. I principali monosaccaridi che costituiscono il cece sono glucosio, fruttosio, ribosio e galattosio. I disaccaridi liberi più abbondanti nei semi di cece sono saccarosio e maltosio. I monosaccaridi e i disaccaridi sono carboidrati idrati già disponibili alla digestione. I principali oligosaccaridi sono rappresentati da raffinose, ciceritolo, stachiosio e una piccola quantità di verbascosio (Rachwa-Rosiak *et al.*, 2015).

In Tabella 9 è riportata il contenuto in carboidrati (g/100 g) dei semi di ceci.

Tabella 9: Contenuto in carboidrati (g/100 g) dei ceci

Table 5 Carbohydrate content of chickpea (g/100 g dm)

| Compounds | Chickpea grains |
|-------------------|-----------------|
| Monosaccharides | 0.32–0.97 |
| Ribose | 0.03–0.19 |
| Fructose | 0.23–0.28 |
| Glucose | 0–0.065 |
| Disaccharides: | |
| Sucrose | 1.09–2.28 |
| Maltose | 0.16–0.68 |
| Oligosaccharides: | 3.87–6.98 |
| Raffinose | 0.62–1.45 |
| Ciceritol | 2.51–2.78 |
| Stachyose | 0.74–2.56 |
| Verbascose | 0–0.19 |

Source: Sánchez-Mata *et al.* (1998); Alajaji and El-Adawy (2006).

I semi dei legumi contengono alcune delle più alte concentrazioni di oligosaccaridi tra tutte le colture. Gli α -galattosidi sono i secondi carboidrati più abbondanti nel regno vegetale dopo il saccarosio e nel cece rappresentano circa il 62% dei carboidrati totali. I due più importanti gruppi di α -galattosidi presenti nel cece sono:

- Famiglia di oligosaccaridi che comprende il raffinose, lo stachiosio e il verbascosio (RFO);
- Galattosil ciclitoli che includono il ciceritolo.

Gli α -galattosidi non vengono assorbiti e idrolizzati nel tratto gastrointestinale umano, perché l'uomo è privo dell'enzima α -galattosidasi, il quale è deputato alla loro degradazione. Di conseguenza, non essendo né assorbiti né idrolizzati, gli α -

galattosidi si accumulano nell'intestino crasso dove subiscono una fermentazione microbica da parte dei batteri del colon con conseguente produzione di gas, quali idrogeni, metano e anidride carbonica che sono i principali componenti dei gas flatulenti. L'espulsione di questi gas è responsabile della flatulenza. D'altra parte, la presenza di questi RFO può promuovere la crescita di bifidobatteri nel colon e quindi essi fungono da prebiotici. La produzione di gas flatulenti è maggiore dopo il consumo di ceci rispetto al consumo di altri legumi. Questo fenomeno potrebbe essere dovuto ad un maggiore contenuto di oligosaccaridi nei semi di cece (Jukanti *et al.*, 2012).

I polisaccaridi sono polimeri ad alto peso molecolare di monosaccaridi presenti come carboidrati di riserva, come l'amido o carboidrati strutturali, quali la cellulosa. Tra i carboidrati di riserva, i ceci immagazzinano amido e non galattomannani. L'amido è il principale deposito di riserva del carbonio nei legumi. Il contenuto di amido nei ceci varia dal 41% al 50% dei carboidrati totali. L'amido totale contenuto nei ceci è costituito dal 35% di amido resistente e il restante 65% è rappresentato da amido disponibile (Jukanti *et al.*, 2012). L'amido resistente ha una funzione simile a quella della fibra alimentare che raggiunge nell'intestino crasso senza essere idrolizzata e digerita. L'amido resistente e la fibra alimentare insolubile subiscono una fermentazione microbica a livello del colon con produzione di metano, anidride carbonica e acidi grassi a corta catena (SCFA) e quindi agiscono come prebiotici (Kaur *et al.*, 2021). I valori di digeribilità dell'amido del cece in vitro variano dal 37% al 60% e sono superiori a quelli delle lenticchie e dei fagioli rossi. Però, in generale, i valori di digeribilità dell'amido dei legumi in vitro sono inferiori di quelli dei cereali a causa del maggiore contenuto di amilosio (Jukanti *et al.*, 2012).

La fibra alimentare è la frazione non digeribile degli alimenti vegetali nell'intestino umano. La fibra alimentare è composta da oligosaccaridi, polisaccaridi, lignina e altre sostanze di origine vegetale. La fibra alimentare può essere suddivisa in:

- Fibra solubile;

- Fibra insolubile.

La fibra solubile viene digerita lentamente a livello del colon, mentre la fibra insolubile è metabolicamente inerte e favorisce il movimento intestinale. La fibra insolubile viene fermentata nell'intestino e in questo modo favorisce la produzione e la crescita di batteri del colon.

Il contenuto totale di fibra alimentare nei ceci è compreso tra 18 – 22 g/100 g di ceci crudi. I ceci hanno un contenuto in fibra alimentare maggiore degli altri legumi. Lo xilosio è il principale costituente della fibra solubile dei ceci (Jukanti *et al.*, 2012).

La quantità di carboidrati contenuti nei ceci varia, anche se non significativamente, tra la varietà “desi” e la varietà “kabuli” (Jukanti *et al.*, 2012).

2.2.4 I Grassi

I ceci sono semi leguminosi caratterizzati da un basso contenuto di grassi. Il contenuto totale di grassi nei semi di ceci crudi varia dal 2,70 – 6,48%. Altri studi riportano un contenuto di grassi rispettivamente del 3,40 – 8,83% nei semi “kabuli” e del 2,90 – 7,42% nei semi “desi” (Jukanti *et al.*, 2012).

Il contenuto di grassi nei ceci, pari a 6,04 g/100 g è maggiore rispetto a quello di altri legumi, come lenticchie, fagioli rossi e piselli, e anche in alcuni cereali, quali frumento e riso (Wang *et al.*, 2021).

Il cece è composto da circa il 66% di PUFA, dal 19% di MUFA e dal 15% di SFA. In media l'acido oleico (OA) è presente in quantità maggiore nelle varietà di ceci “kabuli”, mentre l'acido linoleico (LA) è presente in concentrazione superiore nella varietà di ceci “desi”. Il cece è una fonte relativamente buona di PUFA nutrizionalmente importanti, acido oleico, acido linoleico e acidi grassi monoinsaturi. Il cece presenta un contenuto maggiore di acido oleico e acido linoleico rispetto ad altri legumi commestibili, come lenticchie, piselli e fagioli (Jukanti *et al.*, 2012). L'acido linoleico è l'acido grasso principale nei ceci (54,7 –

56,2%), seguito dall'acido oleico (21,6 – 22,2%), dall'acido palmitico (18,9 – 20,4%) e in quantità inferiore dall'acido stearico e dell'acido linolenico (Rachwa-Rosiak *et al.*, 2015).

Alcuni studi inerenti alla nutrizionale evidenziano che l'incorporazione dei ceci in una dieta sana aiuta ad aumentare l'apporto ideale di acidi grassi polinsaturi (PUFA). Inoltre, al consumo di ceci è associato l'abbassamento del livello di colesterolo LDL e, di conseguenza, una dieta a base di ceci ha un'azione ipocolesterolemizzante. Questo effetto dei ceci è principalmente attribuito alla composizione degli acidi grassi del cece, favorito da un buon rapporto tra acidi grassi polinsaturi e acidi grassi saturi (Nobile *et al.*, 2013).

In Tabella 10 è riportato il profilo in acidi grassi dei semi di ceci.

Tabella 10: Profilo in acidi grassi dei ceci

| Fatty acids | Baker <i>et al.</i> ⁽¹⁸⁸⁾ § | Wang & Daun ^{(56)*†} | | | | USDA ^{(32)‡} K |
|----------------------|--|-------------------------------|-------------|-------|-------------|----------------------------|
| | | K | Range | D | Range | |
| Lauric (12:0) | ND | ND | – | 0.02 | 0.0–0.10 | 0.00 |
| Myristic (14:0) | 0.3 | 0.21 | 0.19–0.26 | 0.22 | 0.17–0.32 | 0.009 |
| Palmitic (16:0) | 12.7 | 9.41 | 8.52–10.3 | 9.09 | 8.56–11.0 | 0.501 |
| Palmitoleic (16:1) | 0.1 | 0.30 | 0.27–0.34 | 0.26 | 0.23–0.30 | 0.012 |
| Stearic (18:0) | 1.5 | 1.42 | 1.21–1.68 | 1.16 | 1.04–1.60 | 0.085 |
| Oleic (18:1) | 19.3 | 32.56 | 27.7–42.46 | 22.31 | 18.44–28.5 | 1.346 |
| Linoleic (18:2) | 62.9 | 51.20 | 42.25–56.59 | 61.62 | 53.10–65.25 | 2.593 |
| Linolenic (18:3) | 3.3 | 2.69 | 2.23–3.91 | 3.15 | 2.54–3.65 | 0.101 |
| Arachidic (20:0) | Traces | 0.66 | 0.59–0.76 | 0.51 | 0.45–0.74 | – |
| Gadoleic (20:1) | ND | 0.57 | 0.48–0.70 | 0.50 | 0.41–0.59 | 0.00 |
| Eicosadienoic (20:2) | ND | 0.06 | 0.00–0.09 | 0.12 | 0.08–0.15 | – |
| Behenic (22:0) | ND | 0.42 | 0.29–0.48 | 0.37 | 0.30–0.42 | 0.00 |
| Erucic (22:1) | – | 0.07 | 0.00–0.16 | 0.13 | 0.00–0.21 | – |
| Lignoceric (24:0) | ND | 0.17 | 0.00–0.29 | ND | – | – |
| Nervonic (24:1) | – | ND | – | ND | – | 0.00 |

K, Kabuli; D, Desi; USDA, United States Department of Agriculture; ND, measured but not detected.

* Expressed as percentage of oil.

† The type of chickpea is not specified.

‡ Expressed as g/100 g.

§ Expressed as wt% of total elute.

Il contenuto di acidi grassi dipende dal genotipo (cultivar), dall'ambiente (profilo stagionale in crescita, tipo di terreno, fattori climatici, parassiti e malattie) e la possibile interazione tra il genotipo e l'ambiente (Gül *et al.*, 2008).

Altri composti lipidici presenti nei ceci sono le cere, alcoli grassi e steroli, il cui contenuto è ridotto chimicamente attraverso alcuni processi, come l'isolamento delle proteine dalla farina (Rachwa-Rosiak *et al.*, 2015).

Il cece non può essere considerato una coltura di semi oleosi, dato che il suo contenuto in olio è relativamente basso, compreso tra 3,8 – 10%, rispetto alla soia e all’arachide. Tuttavia, l’olio di ceci ha proprietà medicinali e nutrizionali importanti, visto che contiene tocoferoli, steroli e tocotrienoli, come riportato nella tabella 11.

Tabella 11: Steroli e tocoferoli importanti nell’olio di cece

Table 5. Important sterols and tocopherols in oil from chickpea seeds (Mean values and standard deviations)

| Sterols (%) | Gopala Krishna <i>et al.</i> ^{(174)*} | | Zia-Ul-Haq <i>et al.</i> ⁽⁶³⁾ |
|----------------------------|---|-------|---|
| | Mean | SD | D |
| Campesterol | – | – | 12.06–13.67 |
| Δ^7 -Avenasterol | – | – | 0.79–1.21 |
| Stigmasterol | – | – | 4.92–5.38 |
| β -Sitosterol | – | – | 73.12–76.10 |
| Clerosterol | – | – | 1.94–4.01 |
| Δ^5 -Avenasterol | – | – | 3.12–5.72 |
| Tocopherols (mg/100 g oil) | | | |
| α | 33.94 | 1.43 | 32.99–34.82 |
| β | 1.87 | 0.17 | 1.67–1.89 |
| γ | 186.17 | 11.80 | 185.08–186.02 |
| δ | 8.36 | 1.40 | 7.93–8.88 |
| Tocotrienols | | | |
| γ | 3.67 | 0.19 | – |

D, Desi.

* The type of chickpea is not specified.

Il sitosterolo è lo sterolo dominante nell’olio di ceci, seguito dal campesterolo. Il contenuto in α -tocoferolo nel cece è relativamente più alto (8,2 mg/100 g) rispetto ad altri legumi, come lenticchie, piselli verdi e fagioli rossi. Il contenuto in α -tocoferolo, unito alla concentrazione di δ -tocoferolo, che ha un potente potere antiossidante, rende l’olio di ceci stabile all’ossidazione e contribuisce a una migliore conservabilità durante lo stoccaggio (Jukanti *et al.*, 2012).

2.2.5 I Minerali

I ceci sono una buona fonte di minerali essenziali, come ferro (5,0 mg/100 g), zinco (4,1 mg/100 g), magnesio (138 mg/100 g), calcio (160 mg/100 g), rame, fosforo e potassio (Jukanti *et al.*, 2012). Il contenuto di questi minerali diminuisce se i ceci vengono sottoposti a trattamenti termici. Il cece ha un contenuto di manganese, zinco e fosforo maggiore rispetto ad altri legumi (Rachwa-Rosiak *et al.*, 2015).

Anche il contenuto di minerali nei ceci varia in funzione del genotipo e dell'ambiente.

Il consumo di circa 100 g può soddisfare il nostro fabbisogno alimentare giornaliero di ferro e zinco (Jukanti *et al.*, 2012). Grazie al suo elevato contenuto in ferro, i ceci nel passato venivano definiti come “carne dei poveri” (Baldoni, 2021). Tuttavia, la quantità di ferro presente nei ceci è inferiore rispetto a quella di altri legumi, come lenticchie e fagioli (Jukanti *et al.*, 2021).

Le varietà “desi” e “kabuli” non mostrano differenze significative in termini di minerali contenuti, ad eccezione del contenuto di calcio (Tabella 12). La varietà di ceci “desi” possiede un contenuto di calcio maggiore della varietà “kabuli” (Jukanti *et al.*, 2012).

Tabella 12: Contenuto di minerali dei ceci “desi” e “kabuli”

| Type | Minerals (mg/100g dm) | | | | | | |
|-----------------|-----------------------|--------|-------|------|-------|------|------|
| | Ca | K | Mg | Fe | P | Zn | Mn |
| Desi chickpea | 165.0 | 994.5 | 169.0 | 4.59 | 451.5 | 4.07 | 3.81 |
| Kabuli chickpea | 81.7 | 1060.0 | 147.0 | 5.50 | 394.0 | 3.40 | 3.28 |

Source: Wang et al. (2010).

I ceci presenti anche altri oligoelementi, quali alluminio (10,2 mg/100 g), cromo (0,12 mg/100 g), nichel (0,26 mg/100 g), piombo (0,48 mg/100 g) e cadmio (0,01 mg/100 g), come riportato in Tabella 13. Le quantità di alluminio, nichel, cadmio e piombo non determinano problemi tossicologici (Jukanti *et al.*, 2012).

Tabella 13: Contenuto minerale (mg/100 g) dei ceci

| Minerals | Rao & Deosthale ^{(189)*} | Ibáñez <i>et al.</i> ⁽⁷⁰⁾ | | Wang & Daun ⁽⁵⁶⁾ | | | | USDA ⁽³²⁾ |
|----------|-----------------------------------|--------------------------------------|-------|-----------------------------|-------------|---------|------------|----------------------|
| | | D | K | D | Range | K | Range | |
| Cu | 1.18 | 1.25 | 1.20 | 1.00 | 0.5–1.40 | 1.00 | 0.7–1.40 | 0.847 |
| Fe | 4.60 | 4.51 | 4.46 | 5.90 | 4.6–7.00 | 5.50 | 4.3–7.60 | 6.24 |
| Zn | 6.11 | 3.57 | 3.50 | 3.60 | 2.8–5.10 | 4.40 | 3.6–5.60 | 3.43 |
| Mn | 1.21 | 1.72 | 1.65 | 3.40 | 2.8–4.10 | 3.90 | 2.3–4.80 | 2.20 |
| Ca | 220.0 | 210.0 | 154.0 | 161.70 | 115–226.5 | 106.60 | 80.5–144.3 | 105.0 |
| Mg | 119.0 | 128.0 | 122.0 | 169.10 | 143.7–188.6 | 177.80 | 153–212.8 | 115.0 |
| Na | – | 22.9 | 21.07 | – | – | – | – | 24.0 |
| K | – | 878.0 | 926.0 | 1215.70 | 1027.6–1479 | 1127.20 | 816–1580 | 875.0 |
| P | 398.0 | – | – | 377.30 | 276.2–518.6 | 505.1 | 294–828.8 | 366.0 |
| Cr | 0.08† | – | – | – | – | – | – | – |

D, Desi; K, Kabuli; USDA, United States Department of Agriculture.

† Expressed as µg/g.

* The type of chickpea is not specified.

2.2.6 Le Vitamine

Le vitamine sono essenziali in piccole quantità per il corpo umano. I legumi sono una buona fonte di vitamine. I ceci possono essere considerati un alimento complementare ad altri alimenti per soddisfare il fabbisogno vitaminico di un individuo, come è riportato in Tabella 14 (Jukanti *et al.*, 2012).

Tabella 14: Vitamine contenute nei ceci

| Vitamins | Chavan <i>et al.</i> ^{(12)*†} | Wang & Daun ^{(56)*†} | | Ciftci <i>et al.</i> ^{(72)†‡} | USDA ^{(32)*†} |
|--|--|-------------------------------|--------|--|------------------------|
| | | K | D | | K |
| Retinol (A) | – | ND | ND | – | ND |
| Vitamin C | 2.15–6.00 | 1.34 | 1.65 | – | 4.0 |
| Vitamin (D ₂ + D ₃) | – | ND | ND | 115.4 | ND |
| Thiamin (B ₁) | 0.028–0.40 | 0.4 | 0.29 | – | 0.477 |
| Riboflavin (B ₂) | 0.15–0.30 | 0.26 | 0.21 | – | 0.212 |
| Niacin (B ₃) | 1.6–2.90 | 1.22 | 1.72 | – | 1.541 |
| Pantothenic acid (B ₅) | – | 1.02 | 1.09 | – | 1.588 |
| Pyridoxine (B ₆) | 0.55 | 0.38 | 0.30 | – | ND |
| Cyanocobalamin (B ₁₂) | – | ND | ND | – | 0.535 |
| Biotin | – | ND | ND | – | – |
| γ-Tocopherol | – | 10.68 | 9.33 | 6.9 | – |
| α-Tocopherol (vitamin E) | – | 2.24 | 1.91 | 22.0 | 0.820 |
| Choline, total (in μg/100 g) | – | – | – | – | 95.20 |
| Folic acid | 150.0 | 299.21 | 206.48 | – | 557.00 |
| Vitamin A, Retinol activity equivalent (RAE) | – | – | – | – | 3.00 |
| β-Carotene | – | – | – | 46.3 | 40.00 |
| Vitamin K (phylloquinone) | 120.0 | – | – | 23.2 | 9.00 |

K, Kabul; D, Desi; USDA, United States Department of Agriculture; ND, measured but not detected.

* Expressed as mg/100 g.

† The type of chickpea is not specified.

‡ Expressed as μg/100 g.

Il cece è un alimento poco costoso ed è una buona fonte sia di vitamine idrosolubili, come le vitamine del gruppo B e la vitamina C, sia di vitamine liposolubili, quali la provitamina A sottoforma di carotenoidi, la vitamina E e la vitamina K. Le vitamine del gruppo B includono la tiamina (B1), la riboflavina (B2), la niacina (B3), l'acido pantotenico (B5), la vitamina B6, sottoforma di piridossina e l'acido folico (B9). Inoltre, nei ceci troviamo anche la vitamina C e la vitamina E, rappresentati dai tocoferoli. La quantità di riboflavina, acido pantotenico e piridossina sono uguali o superiori a quelle osservate negli altri legumi. Tuttavia, la concentrazione di niacina nei ceci è inferiore rispetto a quella presente nei piselli e nelle lenticchie, come si può notare nella Tabella 15 (Jukanti *et al.*, 2012).

Tabella 15: Contenuto vitaminico (mg/100 g) in diversi legumi

| Crops | Folic acid | Vit C | Vit B ₁ | Vit B ₂ | Vit B ₃ | Vit B ₅ | Vit B ₆ | Tocopherol ($\gamma + \alpha$) |
|--------------------|------------|-------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------------|
| Chickpea (Kabuli) | 299.0 | 1.34 | 0.49 | 0.26 | 1.22 | 1.02 | 0.38 | 12.9 |
| Chickpea (Desi) | 206.5 | 1.65 | 0.29 | 0.21 | 1.72 | 1.09 | 0.30 | 11.2 |
| Bean | 107.9 | 3.85 | 0.58 | 0.16 | 1.31 | 0.31 | 0.21 | 3.85 |
| Red kidney beans | 34.5 | 0.09 | 0.99 | 0.23 | 0.33 | 0.31 | 0.21 | 3.15 |
| Lentils | 138.1 | 0.71 | 0.29 | 0.33 | 2.57 | 1.32 | 0.23 | 5.64 |
| White kidney beans | 22.0 | 0.09 | 0.73 | 0.11 | 1.12 | 0.35 | 0.16 | 2.96 |
| Pigeon pea† | 173‡ | NA | 0.4 | 0.17 | 2.20 | 0.68 | 0.07 | 0.39 |

Vit, vitamin; NA, not available.

* Vit A and B₁₂ not detected in these legumes.

† Adopted from the United States Department of Agriculture⁽³²⁾.

‡ Expressed as $\mu\text{g}/100\text{g}$.

2.3 Le proprietà nutrizionali del cece

Sebbene i legumi siano stati consumati per migliaia di anni per le loro qualità nutrizionali, sono negli ultimi 2-3 anni l'interesse verso questi alimenti è aumentato notevolmente per le loro proprietà nutrizionali ed effetti positivi sulla salute umana. I ceci sono un alimento relativamente poco costoso e sono fonte di proteine, vitamine, minerali e composti bioattivi, quali folati, composti fenolici, oligosaccaridi ed inibitori enzimatici, che potrebbero aiutare a ridurre il rischio di malattie croniche e migliorare la salute umana. A causa del loro potenziale valore nutritivo, i ceci possono essere considerati un "alimento funzionale" in aggiunta al loro ruolo di fornire proteine e fibre (Jukanti *et al.*, 2012).

I legumi sono un'ottima fonte di proteine. Sebbene siano di origine vegetale, queste proteine apportano alcuni amminoacidi essenziali, come lisina, treonina, valina e triptofano, in discreta quantità. Tuttavia, il ridotto contenuto di amminoacidi solforati rende importante l'associazione fra legumi e cereali, i quali ne possiedono un alto contenuto. Infatti, la loro combinazione permette di ottenere una miscela proteica il cui valore biologico è paragonabile a quello delle proteine animali (Ranalli *et al.*, 2018).

Numerosi studi hanno dimostrato che un'alimentazione ricca di cereali e legumi, insieme a ortaggi e frutta, protegge da numerose malattie diffuse nei Paesi sviluppati,

come varie forme di tumore, malattie cardiovascolari, cataratta, malattie dell'apparato respiratorio, malattie dell'apparato digerente ed osteoporosi.

Inoltre, i legumi apportano buone quantità di fibra alimentare, importante per la regolazione di diverse funzionali fisiologiche dell'organismo.

Infine, i legumi contengono sostanze ad azione protettiva, prevalentemente antiossidante (Ranalli *et al.*, 2018).

2.4 I benefici del cece per la salute umana

Grazie al contenuto di acidi grassi omega 3, i ceci sono validi alleati del sistema cardiovascolare. Infatti, essi contribuiscono a controllare la pressione arteriosa e ad aumentare i valori del colesterolo HDL, quello cosiddetto buono, riducendo i valori del colesterolo LDL. Un'altra sostanza presente nei ceci che concorre a ridurre il colesterolo LDL è la lecitina che, insieme agli acidi grassi polinsaturi, è il principale antagonista del colesterolo cattivo.

I ceci contengono folato, una sostanza che aiuta a mantenere bassa la concentrazione di omocisteina, un amminoacido presente nel sangue che, quando raggiunge valori sopra la norma, aumenta il rischio dell'insorgenza di eventi cardiovascolari, quali ictus e infarto. I ceci non contengono glutine e quindi sono indicati anche per le persone affette da celiachia.

I ceci contengono molti sali minerali, soprattutto magnesio, calcio, fosforo, ferro e potassio e una buona quantità di vitamina C e vitamine del gruppo B. L'abbondanza di magnesio nei ceci apporta benefici alla circolazione sanguigna. Il potassio, che è un'antagonista del sodio, dà il suo contributo per il controllo della pressione arteriosa.

La presenza di una buona quantità di fibre solubili concorre a regolare le funzioni dell'intestino e a mantenere equilibrati i livelli di glucosio nel sangue (Ranalli *et al.*, 2018). Inoltre, la fibra solubile determina una riduzione del colesterolo totale e del

colesterolo LDL. Per questo motivo, i ceci hanno un'azione ipocolesterolemizzante (Jukanti *et al.*, 2012).

Gli isoflavoni sono metaboliti secondari difenolici contenuti nei ceci che possono ridurre l'incidenza di malattie cardiache. I ceci sono ricchi di saponine, le quali riducono il colesterolo plasmatico del 16 – 24% (Jukanti *et al.*, 2012).

I legumi, come i ceci, contengono una buona quantità di amido resistente di amilosio. L'amilosio ha un grado di polimerizzazione più alto, determinando una maggiore resistenza dell'amido alla digestione nell'intestino tenue. Questo effetto si traduce nella minore biodisponibilità del glucosio e questo determina un ingresso più lento del glucosio nel flusso sanguigno, riducendo così la richiesta di insulina. L'abbassamento dell'indice glicemico è un aspetto molto importante nella riduzione nell'insorgenza del diabete di tipo 2 (Jukanti *et al.*, 2012).

Il butirrato è un acido grasso a corta catena che viene prodotto dall'introduzione di ceci con l'alimentazione. Il butirrato è in grado di sopprimere la proliferazione cellulare e indurre l'apoptosi, che possono ridurre il rischio del cancro del colon-retto. I ceci contengono diversi composti antiossidanti, come il licopene. Il licopene è un carotenoide ossigenato presente nei semi dei ceci che è in grado di ridurre il rischio del cancro alla prostata. La biochanina A, un isoflavone dei ceci, inibisce la crescita di cellule tumorali dello stomaco in vitro e riduce la crescita del tumore (Jukanti *et al.*, 2012).

2.5 La Farina di ceci

Le farine vegetali derivanti dalle leguminose hanno un maggiore contenuto proteico rispetto alle tradizionali farine di frumento. L'elevato contenuto proteico delle farine è dovuto alla significativa frazione di proteine presente nei semi delle leguminose, come ceci, fagioli, piselli e fave.

Le farine di legumi si ottengono dall'essiccazione dei semi, come piselli, ceci, lenticchie, fagioli, fave e lupini e dalla loro successiva macinazione. La farina derivante dalle leguminose mantiene quasi tutte le proprietà dei legumi. Infatti, essa è ricca di proteine vegetali, carboidrati complessi, acidi grassi essenziali, come l'acido linoleico e l'acido linolenico, fibra alimentare, sali minerali e vitamine del gruppo B, C, A, E e K. In particolare, nelle farine di legumi è presente un alto contenuto di amido resistente. L'amido resistente è una frazione dell'amido che ha interessanti proprietà funzionali. Infatti, esso è considerato una fibra prebiotica che è in grado di favorire la crescita di alcuni ceppi batterici che hanno un effetto positivo sul tratto gastrointestinale. Le farine di legumi risultano anche fonte di fitonutrienti, quali polifenoli totali e flavonoidi, che determinano le proprietà antiossidanti di tali alimenti.

La farina di ceci è un ingrediente molto versatile e nutriente che viene utilizzato in molti piatti della cucina mediterranea e del Medio Oriente. Ad esempio, la farina di ceci può essere usata per preparare alimenti bilanciati attraverso la miscelazione con altre farine, per aumentare il valore biologico del cece (Baldoni e Giardin, 2000). La farina di ceci può essere usata anche in combinazione con la farina di grano duro e uova per preparare la pasta fresca, gli gnocchi o la pastella per impanare le verdure (Ranalli *et al.*, 2018).

La produzione della farina di ceci a livello industriale richiede una serie di trattamenti per l'eliminazione delle impurità, la separazione dei componenti e la macinazione del seme. La produzione della farina di ceci si compone di diversi step:

1. Selezione e pulizia dei semi;
2. Ammollo dei semi in acqua;
3. Risciacquo e asciugatura dei semi;
4. Macinazione dei semi;
5. Rimozione delle impurità dalla farina di ceci;
6. Confezionamento della farina di ceci.

Inizialmente, i ceci vengono selezionati e puliti. Nella fase di pulizia vengono rimosse le foglie e le impurità presenti sui semi di ceci. Successivamente, i ceci puliti vengono immersi in acqua per l'ammollo che ha il compito di ammorbidire i semi e aiuta la rimozione della pellicola esterna del seme. Dopo l'ammollo, i semi vengono risciacquati e lasciati asciugare. Dopo la fase di asciugatura, i semi vengono sottoposti a macinazione in una macchina a martelli o in un mulino a pietra. Durante la macinazione, i semi vengono ridotto in farina e separati in base alla granulometria. A questo punto, la farina di ceci viene sottoposto ad un processo di selezione per rimuovere le eventuali impurità residue. Questa fase può utilizzare separatori magnetici o un sistema di aspirazione dell'aria. Infine, la farina di ceci viene confezionata per essere commercializzata (Aluko, 2018).

La farina di ceci ha un contenuto di proteine, grassi, cenere e fibre maggiore della farina di frumento, come viene riportato in Tabella 16.

Tabella 16: Composizione chimica della farina di frumento e della farina di ceci

| Component | Wheat flour | Chickpea flour |
|---------------|-------------|----------------|
| Protein | 9.3–14.3 | 24.4–25.4 |
| Carbohydrates | 64.6–69.04 | 47.4–55.8 |
| Fat | 1.25–2.93 | 3.7–5.1 |
| Fiber | 0.9–1.8 | 3.9–11.2 |
| Ash | 1.48–3.3 | 3.2–2.8 |

Source: Khan et al. (1995)..

Inoltre, la farina di ceci è più ricca di sali minerali rispetto alla farina di frumento. Infatti, la farina di ceci contiene maggiori quantità di potassio, calcio, sodio, magnesio, rame, ferro e zinco rispetto alla farina di grano. La farina di ceci è caratterizzata da una minore disponibilità di carboidrati e la quantità di glucosio è inferiore rispetto ai prodotti realizzati con la farina di frumento (Rachwa-Rosiak *et al.*, 2015).

2.6 Consumi e Mercato globale

2.6.1 Mercato globale delle *Fabaceae* da granella

La coltivazione delle *Fabaceae* da granella per l'alimentazione umana è molto antica, quanto quella cerealicola. Tuttora, la coltivazione delle *Fabaceae* da granella è molto diffusa ed è importante per l'agricoltura di molti Paesi, soprattutto di quelli mediorientali, africani e della penisola indiana. La produzione globale di queste colture si aggira intorno alle 72 milioni di tonnellate, ottenute su 73 milioni di ettari sparsi un po' ovunque nel mondo (Baldoni, 2021). La coltivazione delle *Fabaceae* da granella è particolarmente estesa in Asia con il 53% della superficie mondiale (Baldoni e Giardini, 2000).

I semi delle *Fabaceae*, sia commercializzati secchi sia inscatolati, sono facilmente trasportabili e riforniscono un commercio su scala globale, parimente alle granelle dei cereali (Baldoni, 2021).

Le specie di *Fabaceae* più coltivate nel mondo sono i fagioli su 33 milioni di ettari, i quali rappresentano il 38% della superficie investita a leguminose da granella secca, con tantissime forme, molte delle quali si trovano in America. Il fagiolo viene coltivato in Asia e in America del Sud. Il cece che viene coltivato su 14 milioni di ettari, che rappresentano il 16% della superficie, in ambienti caldi, semiaridi, indiani e mediorientali. I piselli sono coltivati su 7 milioni di ettari, che rappresentano il 9% della superficie investita a leguminose da granella secca, in zone fresche di tutto il mondo, specialmente in Europa e in Asia. Le lenticchie sono coltivate sul 5% della superficie globale investita a leguminose da granella secca, mentre le fave sono coltivate sul 3%, prevalentemente in Asia e in Africa. I ceci e le lenticchie sono diffusi soprattutto in Asia (Baldoni e Giardini, 2000).

A livello mondiale, si è assistito ad una diminuzione della coltivazione delle leguminose da granella, ad esclusione della soia, a causa di alcuni fattori (Baldoni e Giardini, 2000):

- Basse rese;

- Mancata meccanizzazione.

In Italia, la coltivazione delle *Fabaceae* da granella è drasticamente calata negli anni, soprattutto per la loro elevata richiesta di manodopera e per l'intesa concorrenza dei Paesi in via di sviluppo. Oggi, nel nostro Paese, rivestono ancora un ruolo importante alcune specie, come il pisello, il fagiolo e la fava, indirizzate anche all'industria conserviera, insieme ad altre piante minori, quali il cece e la lenticchia che hanno mantenuto nicchie di mercato, anche grazie al riconoscimento di denominazioni di origine. Però, il consumo italiano di semi di *Fabaceae* non è calato nel tempo, ma si è rivolto verso prodotti importati, meno costosi, provenienti da Paesi extra-europei (Baldoni, 2021).

2.6.2 Mercato globale dei ceci

I legumi da granella svolgono un ruolo nutrizionale molto importante nella dieta di milioni di persone, soprattutto nei Paesi in via di sviluppo. I legumi sono una fonte significativa di proteine vegetali e minerali, come calcio, magnesio, ferro, zinco e fosforo. Di conseguenza, i legumi sono un componente fondamentale per la dieta delle persone vegetariane e vegane, dato che gli altri alimenti che consumano non contengono tutte le proteine necessarie per l'organismo umano (Latham, 1997).

Il cece è la terza leguminosa da granella per importanza mondiale, dopo la soia e il fagiolo. La superficie coltivata nel mondo è circa di 11 milioni di ettari. Però, la produzione mondiale di ceci è distribuita in maniera eterogenea tra i diversi produttori. (Ranalli *et al.*, 2018). Il cece è coltivato principalmente in regioni temperate e semiaride, come Asia, Europa, Australia e Nord America (Wang *et al.*, 2021). La Figura 17 mostra la distribuzione mondiale del cece attuale.

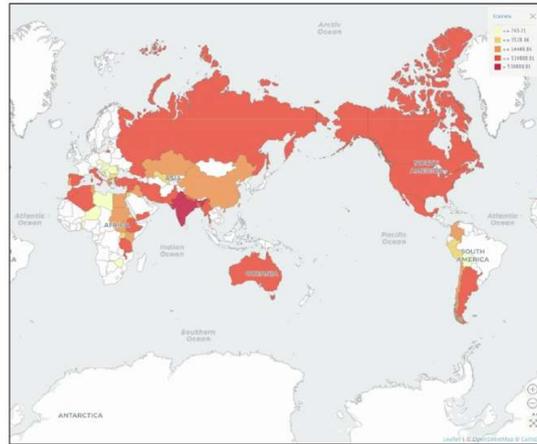


Figura 17: Distribuzione mondiale del cece attuale (FAO 2021)

Uno dei principali Paesi produttori di ceci è l'India, la quale produce circa il 69% della produzione globale, seguita dall'Australia, Myanmar, Etiopia e Turchia, come è rappresentato in figura 18 (Ranalli *et al.*, 2018).

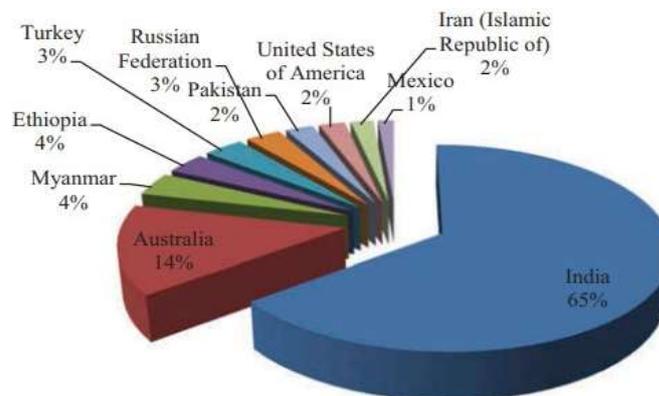


Figura 18: Diagramma dei principali Paesi produttori di ceci (FAO 2020)

Secondo i dati FAOSTAT, nel 2020 la produzione mondiale di ceci è stata pari a 16,1 milioni di tonnellate.

A livello mondiale, il principale produttore di ceci è l'India, con una produzione stimata di oltre 9 milioni di tonnellate nel 202, pari al 69% della produzione mondiale totale. L'Australia è il secondo produttore mondiale di ceci, con una produzione pari a 2 milioni di tonnellate, seguita dal Myanmar con una produzione di 0,6 milioni di

tonnellate circa. Altri Paesi importanti per la produzione dei ceci sono l’Etiopia, il Pakistan, la Turchia e l’Iran.

In Europa, la produzione dei ceci è molto limitata. Il principale Paese europeo per la produzione di ceci è la Spagna, con una produzione pari circa a 200.000 tonnellate. Altri Paesi europei produttori di ceci sono la Francia, l’Italia, la Grecia e il Portogallo.

In Italia, la coltivazione dei ceci si concentra soprattutto nella zona meridionale e nelle isole, come la Puglia, la Calabria e la Sicilia. Secondo i dati ISTAT, nel 2020 la produzione italiana di ceci è stata di 46.000 tonnellate, con un aumento del 24,6% rispetto al 2019. Però, la produzione nazionale di ceci non è sufficiente a soddisfare la domanda interna di tale alimento. Di conseguenza, l’Italia è obbligata ad importare grandi quantitativi di ceci dai grandi produttori mondiali, come l’India, la Turchia e il Pakistan.

L’attuale consumo di ceci in Italia è per lo più rivolto all’alimentazione umana, mentre il suo impiego nell’alimentazione animale è praticamente scomparso, a causa della competizione con granelle di altre specie presenti sul mercato internazionale, come la soia e il pisello (Ranalli *et al.*, 2018).

La tabella 19 mostra i primi 25 Paesi produttori di ceci nel 2020.

Tabella 19: Primi 25 Paesi produttori di ceci nel 2020 (FAO 2020)

| Rank | Country | Production (tons) | Value (\$ Int.) |
|------|-------------------|-------------------|-----------------|
| 1 | India | 9,075,000 | 5,399,278,228 |
| 2 | Australia | 2,004,000 | 509,718,843 |
| 3 | Myanmar | 526,772 | 145,218,258 |
| 4 | Ethiopia | 473,570 | 301,200,212 |
| 5 | Turkey | 470,000 | 553,835,338 |
| 6 | Russia Federation | 418,646 | 79,690,834 |
| 7 | Pakistan | 330,000 | 111,815,326 |
| 8 | USA | 313,210 | 68,289,011 |
| 9 | Iran | 271,487 | 236,117,642 |
| 10 | Mexico | 188,939 | 75,195,218 |
| 11 | Tanzania | 108,136 | 51,050,207 |
| 12 | Canada | 95,600 | 69,714,079 |
| 13 | Argentina | 74,001 | 4,119,369 |
| 14 | Spain | 56,498 | 18,065,781 |
| 15 | Yemen | 52,709 | 67,445,442 |
| 16 | Syria | 52,254 | 23,478,477* |
| 17 | Israel | 36,300 | 15,466,468 |
| 18 | Italy | 33,541 | 24,198,650 |
| 19 | Bulgaria | 32,383 | 2,004,456 |
| 20 | Algeria | 29,336 | 11,452,970 |
| 21 | Morocco | 25,364 | 45,781,052 |
| 22 | China | 15,626 | 23,504,681 |
| 23 | Sudan | 11,886 | 13,410,520 |
| 24 | Nepal | 10,969 | 9,461,406 |
| 25 | Greece | 7,856 | 15,719,158 |

2.6.3 Mercato globale della farina di ceci

Il mercato globale della farina di ceci sta aumentando costantemente, grazie all'aumento della domanda da parte dei consumatori di alimenti vegetali, salutari, senza glutine e a basso impatto ambientale, come riportato in figura 20.

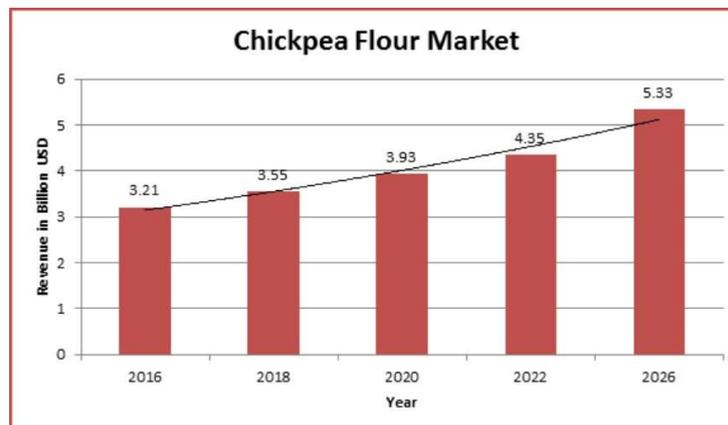


Figura 20: Mercato della farina di ceci (2016-2026)

La farina di ceci sta diventando un alimento sempre più popolare come ingrediente alternativo alle tradizionali farine a base di cereali, dato che è priva di glutine, adatta ai vegani e ricca di proteine.

La crescente domanda di alimenti a base di farina di ceci ha portato anche all'aumento della sua produzione. L'India è il principale produttore mondiale di ceci e gran parte di essi vengono utilizzati per la produzione di farina di ceci.

La farina di ceci è utilizzata per la realizzazione di molti piatti in tutto il mondo. Nei Paesi del Medio Oriente, i ceci sono utilizzati per la produzione dell'hummus e dei falafel. In Italia, i ceci sono utilizzati per la preparazione della pasta e ceci, mentre la farina di ceci è ampiamente diffusa in diverse regioni, quali Liguria, Toscana e la zona di Ferrara per la realizzazione della farinata e in Sicilia per la produzione delle panelle di farina di ceci (McGee, 2016).

3. LA FERMENTAZIONE

3.1 La Fermentazione e gli alimenti funzionali

La fermentazione degli alimenti è un processo che risale a secoli fa ed è sempre stata utilizzata come tecnica di conservazione dei prodotti alimentari, come una tecnologia per ottenere alimenti nutritivi e tradizionali oppure come uno strumento per ottenere nuovi sapori, aromi e consistenze (Garrido-Galand *et al.*, 2021). L'obiettivo principale della fermentazione nel passato era l'allungamento della shelf-life degli alimenti. Al giorno d'oggi, le fermentazioni sono processi biotecnologici applicati alla trasformazione degli alimenti per favorire la conservabilità delle materie prime, inibendo lo sviluppo dei microrganismi patogeni e/o degradativi, migliorare le caratteristiche organolettiche e riciclare sottoprodotti e scarti del settore alimentare nel rispetto dei concetti di sostenibilità ed economia circolare favorendo l'ottenimento di alimenti o ingredienti alimentati ad alto valore aggiunto (Cocolin *et al.*, 2022).

In biochimica, la fermentazione è un processo utilizzato dalle cellule microbiche per la produzione di energia, attraverso la fosforilazione ossidativa nella quale i composti organici agiscono sia da donatori sia da accettori di elettroni. Dal punto di vista biochimico, le fermentazioni sono processi che si svolgono in anaerobiosi, o comunque senza l'intervento di ossigeno. Per questo motivo, storicamente con il termine "fermentazione" si prendevano in considerazione solo la fermentazione alcolica e la fermentazione lattica. Dal punto di vista industriale, la fermentazione è il processo utilizzato per l'ottenimento di un determinato prodotto/metabolita mediante la coltivazione in massa di microrganismi. Si tratta di processi che possono svolgersi sia in anaerobiosi sia in aerobiosi.

I microrganismi utilizzati per condurre le fermentazioni possono essere batteri, lieviti e muffe o funghi. Quindi, la fermentazione può essere definita come il processo biologico in cui i microrganismi convertono i substrati di partenza in nuovi prodotti, come alimenti, biomassa o metaboliti primari e secondari. La fermentazione è

ampiamente utilizzata nel settore alimentare per la conservazione degli alimenti, ma può essere utilizzata anche per aumentare il valore commerciale dei prodotti alimentari, producendo alimenti ad alto valore aggiunto (Garrido-Galand *et al.*, 2021).

Gli alimenti fermentati sono microbiologicamente più sicuri, dato che gli acidi organici prodotti durante la fermentazione sono in grado di inibire microrganismi patogeni eventualmente presenti nella materia prima. Inoltre, il metabolismo microbico induce la trasformazione di molecole complesse presenti nella materia prima in composti più semplici, più facilmente digeribili e assorbibili. Gli alimenti fermentati sono solitamente più ricchi in alcune sostanze nutritive, prodotte e rilasciate nell'alimento dai microrganismi, come vitamine, peptidi, minerali biodisponibili, amminoacidi essenziali, fibre solubili e composti con attività antiossidante, e possono presentare un contenuto ridotto di composti antinutrizionali, eventualmente presenti nelle materie prime. Ne consegue che alla fermentazione siano associate modificazioni che spesso migliorano il valore nutrizionale complessivo dell'alimento. Inoltre, la presenza di microrganismi comporta un effetto positivo sul sistema immunitario (Cocolin *et al.*, 2022).

Il termine “alimento funzionale” è stato utilizzato per la prima volta nel 1984 in Giappone a seguito di uno studio sulle relazioni tra la nutrizione, la soddisfazione sensoriale, la fortificazione e la modulazione dei sistemi fisiologici per definire quei prodotti alimentari fortificati con componenti speciali in grado di determinare effetti fisiologici benefici. Al giorno d'oggi, la definizione più comune e largamente accettata di alimento funzionale è quella riportata nel *consensus document* pubblicato dalla commissione di esperti che ha lavorato nel 1999 al progetto FUFLOSE. Un alimento funzionale è definito tale se è in grado di “dimostrare, in maniera soddisfacente, di avere effetti positivi su una o più funzioni specifiche dell'organismo, che vadano oltre gli effetti nutrizionali normali, in modo tale che sia rilevante per il miglioramento dello stato di salute e di benessere e/o per la riduzione del rischio di malattia. Fermo restando che gli alimenti funzionali devono mantenere

lo status di alimenti e dimostrare la loro efficacia nella quantità in cui sono assunti normalmente nella dieta. Gli alimenti funzionali non sono né compresse, né capsule, ma alimenti che costituiscono parte integrante di un regime alimentare normale”. Esistono numerose altre definizioni di alimento funzionale. Perciò, un alimento funzionale rientra in una categoria a sé stante, diversa dai nutraceutici, farma-alimenti, super-alimenti e alimenti a fini medici speciali, e che non include integratori. Il concetto di alimento funzionale appartiene alla nutrizione e non alla farmacologia. Esistono diverse categorie di alimenti funzionali:

- Alimenti in cui siano naturalmente presenti composti con effetti benefici (pesce azzurro ricco di omega 3) o in cui alcune componenti specifiche sono state migliorate attraverso particolari tecniche di coltivazione (alimenti integrali);
- Alimenti fortificati, addizionati di vitamine o sali minerali o arricchiti, addizionati di altri componenti in grado di determinare un effetto benefico sulla salute (alimenti con aggiunta di calcio, omega 3, probiotici e/o prebiotici, composti antiossidanti);
- Alimenti privati di componenti potenzialmente responsabili di intolleranze e/o allergie e di effetti negativi sulla salute (lattosio, glutine, grassi saturi, sale, zuccheri);
- Alimenti la cui struttura di uno o più componenti è stata modificata chimicamente o con altri processi per migliorare l’impatto sulla salute (proteine idrolizzate usate per ridurre il rischio di allergie alimentari nei lattanti);
- Alimenti con aumentata biodisponibilità di uno o più componenti benefici (licopene nei pomodori);
- Alimenti simbiotici, ovvero alimenti che presentano al loro interno uno o più prebiotici insieme a uno o più probiotici.

L'aumento della domanda di alimenti e bevande funzionali, accompagnato dalle numerose evidenze scientifiche sulle conseguenze fisiologiche, ha favorito lo sviluppo di un fiorente mercato degli alimenti funzionali. Quindi, l'interesse rivolto verso gli alimenti funzionali è in costante aumento (Cocolin *et al.*, 2022).

Gli effetti benefici per la salute associati agli alimenti funzionali possono essere raggruppati in tre principali classi:

- Benefici diretti per la salute;
- Riduzione del rischio di malattie;
- Miglioramento delle condizioni di vita.

Tuttavia, studi scientifici dimostrano che gli alimenti funzionali possono avere effetti benefici sulla salute umana solo se fanno parte di una dieta equilibrata (Cocolin *et al.*, 2022).

Gli alimenti funzionali possono essere classificati in due macrocategorie:

- Alimenti funzionali non fermentati, come il latte materno, il pesce, gli ortaggi, la frutta, i cereali, i legumi e le spezie;
- Alimenti funzionali fermentati, come i latti fermentati, lo yogurt, i formaggi e i derivati di cereali e legumi fermentati.

Gli alimenti e le bevande fermentate sono stati tra i primi prodotti alimentari trasformati consumati dagli esseri umani. L'obiettivo primario delle fermentazioni alimentari è stato la conservazione dei prodotti. Nella tradizione, la fermentazione è stata a lungo associata a benefici per la salute, ma è grazie alle recenti evidenze scientifiche che è stato possibile dimostrare come gli alimenti fermentati presentino proprietà nutrizionali e funzionali superiori della materia prima, grazie alla liberazione di componenti bioattive o maggiormente biodisponibili. Inoltre, diversi microrganismi fermentati contengono microrganismi vivi con caratteristiche potenzialmente probiotiche. Pertanto, gli alimenti funzionali possono essere considerati alimenti funzionali grazie all'azione benefica diretta, dovuta all'interazione tra microrganismi vivi veicolati dall'alimento e l'ospite, o

indirettamente, in seguito all'ingestione di metaboliti microbici sintetizzati durante la fermentazione (Cocolin *et al.*, 2022).

3.2 La Fermentazione delle farine di legumi

Al giorno d'oggi, si è verificata una crescente richiesta di fonti proteiche alternative a quelle di origine animale, non solo per la loro maggiore sostenibilità ambientale, ma anche per le loro proprietà benefiche di prevenzione da numerose malattie (Garrido-Galand *et al.*, 2021).

I legumi e i cereali sono visti come una buona fonte proteica, fibra alimentare e sostanze fitochimiche con proprietà antiossidanti. Inoltre, i legumi sono ricchi di acidi grassi insaturi. Per tutte queste ragioni, i legumi e i cereali presentano un buon profilo nutrizionale (Garrido-Galand *et al.*, 2021). Alcuni studi scientifici dimostrano che l'assunzione di legumi potrebbe ridurre il rischio dell'insorgenza di malattie cardiovascolari, sindrome metabolica, diabete di tipo 2, alcune tipologie di cancro e obesità (Gobbetti *et al.*, 2019), mentre forniscono benefici sostanziali per il controllo del peso e per il benessere del tratto gastro-intestinale. Al contrario, è stato dimostrato che l'assunzione eccessiva di carne è strettamente correlata alla manifestazione di tumori del colon-retto, del pancreas e della prostata. Inoltre, anche il consumo di carne processata è un fattore importante nell'aumento del peso, dato che presenta al suo interno colesterolo e acidi grassi saturi. Di conseguenza, dovrebbe essere privilegiato il consumo di legumi e fonti proteiche vegetali, in quanto considerati salutari, mentre l'assunzione di carne dovrebbe essere limitato (Garrido-Galand *et al.*, 2021).

Tuttavia, i legumi contengono composti antinutrizionali che, ad alte concentrazioni, possono ridurre drasticamente la bioaccessibilità di molti nutrienti e quindi interferire con il loro assorbimento. I fattori antinutrizionali possono essere classificati in:

- Composti proteici, quali lectine e inibitori della proteasi come tripsina e inibitori della chimotripsina;
- Composti non proteici, quali acido fitico, composti fenolici come tannini e saponine, α -galattosidi e alcaloidi.

Gli inibitori della proteasi si trovano frequentemente nei legumi, come soia, ceci e fagioli, e sono responsabili della diminuzione della digeribilità delle proteine, dato che la tripsina e la chimotripsina sono idrolasi che degradano le proteine alimentari introdotte con la dieta. Le lectine sono glicoproteine che si trovano in cereali e legumi e che legano gli zuccheri, diminuendone il loro assorbimento. L'acido fitico forma complessi con i minerali, quali calcio, zinco, ferro e magnesio e quindi diminuisce la loro biodisponibilità e il loro assorbimento. Inoltre, l'acido fitico si può legare anche a proteine ed enzimi digestivi (proteasi e amilasi) con conseguente minore proteolisi. I composti fenolici, come i tannini, sono in grado di far precipitare le proteine, diminuendone la loro digeribilità e disponibilità di amminoacidi. Le saponine si trovano in diversi legumi, come ceci, lupini e lenticchie e hanno la capacità di formare micelle di grandi dimensioni con acidi biliari e colesterolo, con conseguente scarso assorbimento del colesterolo e degli acidi grassi liberi. Gli α -galattosidi, quali raffiniosio, stachiosio e verbascosio, che si trovano spesso nei legumi, sono i composti responsabili della flatulenza e della produzione di gas intestinali a causa della loro fermentazione da parte dei microrganismi del colon.

Nonostante gli effetti negativi dei fattori antinutrizionali, la loro presenza può essere ridotta mediante l'applicazione di alcune tecniche tradizionali, come l'ammollo dei legumi in acqua, la loro cottura o la loro fermentazione. In questo modo, la biodisponibilità dei nutrienti dei legumi può essere aumentata. L'ammollo dei legumi consiste nella rimozione dei fattori antinutrizionali idrosolubili, come l'acido fitico. La cottura dei legumi permette l'inattivazione di alcuni composti antinutrizionali, come gli inibitori enzimatici e le lectine.

Oltre all'effetto inibitorio dei fattori antinutrizionali sulla digeribilità delle proteine, le proteine vegetali sono meno digeribili delle proteine animali. Le proteine vegetali si trovano principalmente nella conformazione β -foglietto, mentre le proteine animali si presentano nella conformazione α -elica. La struttura β -foglietto è associata a una particolare resistenza delle proteine alla denaturazione. Quindi, le proteine vegetali sono più resistenti alla loro disgregazione nel tratto gastro-intestinale durante la digestione. Inoltre, le proteine vegetali solitamente contengono fibre che ostacolano l'accesso delle proteasi e di conseguenza diminuisce la loro digeribilità. Un vantaggio delle proteine vegetali è quello di possedere proprietà funzionali che le rendono adatte alla formulazione di alimenti gluten-free o prodotti arricchiti di proteine (Garrido-Galand *et al.*, 2021).

La fermentazione degli alimenti è un processo che risale al passato ed è sempre stata utilizzata come tecnica di conservazione dei prodotti alimentari, come una tecnologia per ottenere alimenti nutritivi e tradizionali oppure come uno strumento per ottenere nuovi sapori, aromi e consistenze (Garrido-Galand *et al.*, 2021). La fermentazione porta all'acidificazione dell'alimento a causa della sintesi di acidi organici, pertanto, riduce il rischio di proliferazione di microrganismi patogeni. Inoltre, la fermentazione aumenta notevolmente la concentrazione in vitamine, in particolare riboflavina, tiamina, niacina e acido ascorbico, oltre a migliorare la digeribilità delle proteine (Kaur *et al.*, 2021).

I microrganismi utilizzati per condurre le fermentazioni possono essere batteri, lieviti e muffe o funghi. La fermentazione è ampiamente utilizzata nel settore alimentare per la conservazione degli alimenti, ma può essere utilizzata anche per aumentare il valore commerciale dei prodotti alimentari, producendo alimenti ad alto valore aggiunto. Infatti, la fermentazione dei legumi e delle loro farine ha dimostrato di avere la capacità di migliorare le proprietà di questi alimenti, poiché i microrganismi coinvolti sono in grado di produrre enzimi che degradano i fattori antinutrizionali, dando origine a farine più digeribili e con un profilo nutrizionale, sensoriale e tecnologico interessante. Quindi, i prodotti risultanti dal processo fermentativo non

solo presentano un valore nutrizionale maggiore e sono più digeribili, ma hanno anche una consistenza e sapori diversi rispetto alla materia prima di partenza. Inoltre, la fermentazione contribuisce a migliorare la sicurezza alimentare, dato che limita lo sviluppo di microrganismi patogeni. Di conseguenza, i legumi fermentati possono essere utilizzati per la produzione di farine funzionali, le quali possono essere considerate ingredienti chiave per lo sviluppo di nuovi alimenti con un potenziamento delle loro proprietà (Garrido-Galand *et al.*, 2021).

I cereali e i legumi, come tali o prevalentemente in forma di farine, rappresentano una fonte nutrizionale insostituibile nella dieta di tutti i Paesi. Tuttavia, la loro trasformazione mediante fermentazione è in grado di creare valore aggiunto funzionale (Cocolin *et al.*, 2022).

3.2.1 Impatto della fermentazione sul profilo nutrizionale dei legumi

La ricerca scientifica ha messo in luce che la fermentazione ha un impatto significativo sul profilo nutrizionale dei legumi e delle loro farine. Uno dei principali effetti della fermentazione sui legumi riguarda le modificazioni delle proteine. Un esempio è riportato da Garrido-Galand *et al.* (2021) il cui studio ha evidenziato la capacità di *Pleurotus ostreatus* di sintetizzare amminoacidi durante la fermentazione di fagioli e lenticchie. Infatti, la fermentazione sia dei fagioli che delle lenticchie mostrava un aumento del contenuto proteico, tuttavia, i campioni di lenticchie subivano la riduzione del contenuto in carboidrati.

L'incremento di proteine potrebbe essere dato anche dall'azione del metabolismo microbico sulla riduzione di alcuni composti che ne riducono la biodisponibilità. Ad esempio, i tannini, considerati gli inibitori della tripsina, sono i responsabili della scarsa biodisponibilità delle proteine dei legumi. Secondo i risultati di alcuni studi è stato evidenziato che la concentrazione dei tannini può essere diminuita nei legumi

fermentati e nelle farine di loro derivazione attraverso una fermentazione da parte dei batteri lattici, grazie alla capacità di alcuni ceppi di tali microrganismi di idrolizzare i legami dei complessi tannini-proteine (De Pasquale *et al.*, 2020).

In ogni caso, in base al tipo di microrganismo usato, al ceppo utilizzato e al substrato di partenza, l'impatto della fermentazione sul profilo amminoacidico potrebbe variare (Garrido-Galand *et al.*, 2021).

La fermentazione dei legumi può inoltre portare alla riduzione del contenuto lipidico della matrice di partenza. Ad esempio, alcuni studi hanno riportato che la fermentazione della soia portata avanti da *Lactobacillus casei* può ridurre il contenuto lipidico del 22,16%, mentre la fermentazione della farina di fagioli portata avanti da *Rhizopus oligosporus* poteva apportare una riduzione del 47,45%. Questo cambiamento del contenuto lipidico è dovuto all'abilità di alcuni microrganismi, come *Rhizopus oligosporus* di produrre lipasi. Inoltre, è stata evidenziata la riduzione degli acidi grassi saturi, come l'acido palmitico e l'acido stearico, dei legumi e della loro farina sottoposti a fermentazione. Invece, la quantità degli acidi grassi omega 3, come l'acido linoelenico, è aumentata, esaltando in questo modo le qualità nutrizionali della farina risultante (Garrido-Galand *et al.*, 2021).

La fermentazione dei legumi e della loro farina determina anche un aumento del contenuto in minerali e quindi un incremento della loro biodisponibilità. A titolo di esempio, si è osservato che i piselli fermentati da *Aspergillus oryzae* presentavano un aumento del contenuto di ferro e zinco. Un altro esempio riguarda l'aumento del contenuto di calcio e di fosforo nella farina di lupino fermentata da *Aspergillus sojae* e *Aspergillus ficuum*. Questi risultati possono essere spiegati considerando la capacità della fermentazione di degradare l'acido fitico. Infatti, l'acido fitico, è un composto anti-nutrizionale in grado di formare legami complessi con i minerali. Tuttavia, la fermentazione con microrganismi selezionati può essere in grado di degradare l'acido fitico grazie all'attività delle fitasi microbiche determinando un

aumento del contenuto di minerali dei legumi e delle loro farine (Garrido-Galand *et al.*, 2021).

Altri studi scientifici hanno dimostrato che la fermentazione delle farine di legumi con alcune colture starter selezionate di batteri lattici, quali ceppi di *Lactiplantibacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus rossiae*, ha causato l'aumento della concentrazione dei fenoli totali (De Pasquale *et al.*, 2020).

In ogni caso, la durata della fermentazione è un parametro molto importante. Fermentazioni protratte per tempi più lunghi determinano un miglioramento notevole dei nutrienti e della loro biodisponibilità rispetto a fermentazioni più brevi (Garrido-Galand *et al.*, 2021).

In ogni caso, in base ai microorganismi utilizzati e alle condizioni di crescita, i processi fermentativi potrebbero apportare differenti variazioni del prodotto finale.

La Tabella 21 mostra gli studi effettuati sulla fermentazione dei legumi e i principali risultati che sono stati ottenuti.

Tabella 21: Studi effettuati sulla fermentazione dei legumi e principali risultati ottenuti

| FERMENTATION TYPE | INOCULUM | SUBSTRATE | MAIN FINDINGS | REFERENCES |
|-------------------|--|--|--|--|
| SSF | FUNGUS <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Rhizopus oligosporus</i> | Black-eyed pea seed flour Kidney beans (<i>Phaseolus vulgaris</i>) Black beans (<i>Phaseolus vulgaris</i>) Lentils (<i>Lens culinaris</i>) Legume Tepary bean (<i>Phaseolus acutifolius</i>) | ↑ protein, dietary fibre in kidney beans, ↓ lipids, dietary fibre in black beans, ↓ carbohydrates in lentils ↑ EAA, FAA, TPC, isoflavones, mineral content ↑ protein digestibility, mineral bioavailability, AoxA, ↓ tannins ↑ WHC, OBC, emulsifying properties, ↓ bulk density | Chawla et al. (2017) Espinosa-Pérez et al. (2017) Mora-Uzeta et al. (2020) |
| | BACTERIA <i>Lactiacaseibacillus casei</i> | Whole soybean flour | ↑ protein, fat and crude fibre, w-3 fatty acids ↑ EAA, FAA, phenolic acids, isoflavones ↑ AoxA, ↓TIA and lipoxygenase activity | Li et al. (2020) |
| | CO-CULTURE <i>Aspergillus sojae</i> + <i>Aspergillus ficuum</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> + <i>Pediococcus acidilactici</i> + <i>Pediococcus loli</i> | Lupin flour Chickpea flour | ↑ mineral content, TPC, ↓ pH ↑ IVPD, ↓ raffinose and stachyose, ↓ phytic acid ↑ WHC, ↓ foaming capacity, ↑ milder and acidic odours, ↓ beany smells | Olukomaiya et al. (2020) Xing et al. (2020) |
| SmF | YEASTS <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> and <i>Candida utilis</i> | Lupin meal | ↑ crude protein ↑ EAA (glutamic acid, proline, glycine, valine and alanine), ↓ EAA (isoleucine, histidine, arginine, phenylalanine and leucine) ↓ phytates, oligosaccharides, alkaloids | Kasprowicz-Potocka et al. (2018) |
| | BACTERIA <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> VTT E-78076 <i>L. plantarum</i> ATCC 14,917 <i>L. plantarum</i> CECT 748 | Faba bean flour Bean flour (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Cowpea flour (<i>Vignasinensis</i> L) Lentil flour (<i>Lens culinaris</i> L.) Grass pea flour (<i>Lathyrus sativus</i> "Krab") | ↑ FAA, TPC, p-hydroxybenzoic acid, isoflavones in aglycone form, ↓ quercetin glycosides, <i>trans</i> -p-coumaric acid and pH ↑ protein solubility, ↓ phytic acid, TIA, tannins, lectins and β-ODAP | Rosa-Sibakov et al. (2018) Martín-Cabrejas et al. (2004) Dueñas et al. (2005) Bautista-Expósito et al. (2018) Starzyńska-Janiszewska and Stodolak (2011) |
| | CO-CULTURE Starter LAB + one of the following yeasts: <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> or <i>Torulasporea delbrueckii</i> | Pea protein isolates | ↑ esters and beer/yeast attributes ↓ off-flavours like green/leguminous attributes (aldehydes, ketones, furans, alcohols). | El Youssef et al. (2020) |

3.2.2 Impatto della fermentazione sulle proprietà funzionali, sensoriali e salutari dei legumi

Oltre all'impatto sul profilo nutrizionale, la fermentazione ha una notevole influenza anche sulle proprietà funzionali, sensoriali e salutari dei legumi e delle loro farine (Garrido-Galand *et al.*, 2021).

Gli α -galattosidi rientrano nella categoria dei fattori antinutrizionali contenuti nei legumi. Tali molecole influenzano la biodisponibilità in nutrienti e possono causare disturbi gastrointestinali. Di conseguenza, la riduzione del contenuto in α -galattosidi permette di migliorare le caratteristiche funzionali e salutari di tali alimenti. Garrido-Galand *et al.* (2021) hanno evidenziato una riduzione di α -galattosidi, come raffiniosio, stachiosio e verbascosio, dopo 48 ore di fermentazione nella farina di lupino fermentata. In particolare, i microrganismi che hanno presentato la maggiore efficacia di ridurre la concentrazione di α -galattosidi erano *Kluyveromyces lactis* (63%), *Saccharomyces cerevisiae* (81%) e *Candida utilis* (100%). La riduzione del contenuto di α -galattosidi era, pertanto, dovuta al metabolismo dei lieviti impiegati nella fermentazione.

Inoltre, anche la fermentazione da parte di batteri lattici aveva contribuito alla riduzione della concentrazione di α -galattosidi, poiché tali microrganismi sono in grado di idrolizzarli, aumentando così la digeribilità della farina di legumi e riducendo il gonfiore gastro-intestinale dopo la loro introduzione (De Pasquale *et al.*, 2020).

Il processo fermentativo provoca la denaturazione delle proteine e l'esposizione dei residui degli amminoacidi idrofili, noti per la loro capacità di formare legami con le molecole di acqua. Per questo motivo, i risultati riportati da Garrido-Galand *et al.* (2021) avevano confermato che la fermentazione della farina di piselli neri aveva portato ad un aumento della capacità di ritenzione dell'acqua, in accordo con i risultati ottenuti dalla farina di ceci fermentata, la cui capacità di ritenzione dell'acqua era migliorata passando da 1,1 g acqua/g di polvere secca a 1,7 g acqua/g

di polvere secca. Al contrario, a causa della mancanza di residui amminoacidi idrofili, la capacità di ritenzione dell'acqua nella farina di lupino fermentata era diminuita (Garrido-Galand *et al.*, 2021).

Le proprietà sensoriali sono fondamentali quando si tratta della formulazione di nuovi alimenti che siano accettati dal consumatore finale. In questo senso, utilizzando i batteri lattici insieme ai lieviti per condurre la fermentazione, le aldeidi, i chetoni e gli alcol vengono ridotti, ma vengono generati anche nuovi composti, quali esteri. Inoltre, l'inoculo di batteri lattici e dei batteri appartenenti al genere *Pediococcus* per la fermentazione può permettere anche la riduzione degli odori di fagiolo presenti nei ceci. Di conseguenza, l'azione sinergica dei lieviti e dei batteri o l'azione di una miscela di diversi ceppi di batteri lattici permettono di esaltare le proprietà sensoriali dei legumi fermentati (Garrido-Galand *et al.*, 2021).

Per quanto riguarda l'impatto della fermentazione sulle proprietà salutari dei legumi fermentati, è stato evidenziato che alcuni enzimi, come le β -glucosidasi responsabili dell'idrolisi del legame glicosidico dei glucosidi isoflavonici, vengono attivati durante la fermentazione attraverso l'abbassamento del pH. Questo fenomeno è stato osservato nella cicerchia fermentata da *Lactiplantibacillus plantarum* e nella soia fermentata da *Lactobacillus casei*. Grazie all'attivazione delle β -glucosidasi avviene l'idrolisi dei glucosidi isoflavonici e viene rilasciata la forma aglicone. La forma aglicone è caratterizzata da una forte attività antiossidante e quindi permette una riduzione del rischio dell'insorgenza dei tumori (Garrido-Galand *et al.*, 2021).

Inoltre, uno studio di Garrido-Galand *et al.* (2021) sulla farina di lenticchie fermentata con *Lactiplantibacillus plantarum* ha messo in luce la maggiore attività inibitoria dell'enzima di conversione dell'angiotensina I. Questo enzima converte il decapeptide angiotensina I inattivo in angiotensina octapeptide II e quest'ultimo è responsabile dell'aumento della pressione sanguigna per la sua proprietà vasocostrittrici. Pertanto, è possibile affermare che, le lenticchie fermentate da *Lactiplantibacillus plantarum* possono essere utilizzate come ingredienti da

impiegare per la formulazione di alimenti idonei a persone affette da sindrome metabolica (Garrido-Galand *et al.*, 2021).

In aggiunta, i flavonoli e i glucosidi di quercitina sono in grado di inibire le α -glucosidasi. L' α -glucosidasi è l'enzima che consente l'assorbimento del glucosio dato che idrolizza il legame glicosidico dei disaccaridi, con produzione di zuccheri semplici che sono prontamente assorbibili. Quindi, attraverso l'inibizione di questo enzima si riduce l'idrolisi dei carboidrati. Di conseguenza, è possibile affermare che il processo fermentativo portato avanti da diversi microorganismi selezionati, tra cui *Lactiplantibacillus plantarum*, può permettere l'ottenimento di un ingrediente a base di farina di legumi che possa essere considerato idoneo per l'ottenimento di alimenti formulati per le persone affette da iperglicemia e per la prevenzione del diabete di tipo 2 (Garrido-Galand *et al.*, 2021).

3.3 La Fermentazione della farina di ceci

Il cece è uno dei legumi più consumati in tutto il mondo ed è consumato come alimento intero tal quale o come alimento trasformato, come la farina di ceci. Il cece viene utilizzato come alimento e ingrediente nelle cucine contemporanee ed etniche (Klongklaew *et al.*, 2022).

Il cece è una ricca fonte di proteine alimentari e amminoacidi essenziali. Inoltre, il cece è un alimento ad alto contenuto di fibra dietetica, a basso contenuto di sodio ed è un'ottima fonte di carboidrati complessi a basso indice glicemico, acidi grassi insaturi, vitamine e minerali. Oltre ai nutrienti, il cece è ricco di composti fitochimici bioattivi, quali composti fenolici, che sono stati associati a molti effetti positivi sulla salute umana, come un rischio ridotto di malattie cardiovascolari, diabete di tipo 2, osteoporosi, obesità e disturbi gastrointestinali (Sáez *et al.*, 2022). Per la sua composizione nutrizionale equilibrata e per i suoi effetti rilevanti sulla salute umana, il cece è un ottimo bersaglio come fonte di ingredienti alimentari per la formulazione

di alimenti funzionali ad alto valore aggiunto. La farina di ceci o i suoi estratti possono essere utilizzati come ingredienti alimentari funzionali di alto valore e possono essere usati per la prevenzione di alcune malattie croniche, come il diabete di tipo 2, malattie cardiovascolari e sindrome metabolica (Klongklaew *et al.*, 2022). A questo proposito, la farina di ceci è stata utilizzata per la formulazione di numerosi alimenti funzionali, quali pasta, prodotti da forno, snack, yogurt e bevande che possono essere consumati anche da persone celiache grazie all'assenza di glutine (Sáez *et al.*, 2022).

Tuttavia, il cece, come la maggior parte delle *Leguminose*, ha la capacità di sintetizzare sostanze biologicamente attive come difesa contro i predatori che causano effetti fisiologici avversi sull'uomo e sugli animali dopo la loro ingestione. Queste sostanze, comunemente note come fattori antinutrizionali, includono inibitori dell'amilasi e della proteasi, acido fitico, saponine, tannini, lectine e α -galattosidi e influenzano la biodisponibilità dei nutrienti e possono causare disturbi gastrointestinali. La quantità di composti antinutrizionali può essere ridotta attraverso processi fisico-chimici, quali ammollo dei legumi in acqua, cottura e trattamenti ad alta pressione, e/o processi biologici, quali trattamento enzimatico, germinazione e fermentazione (Sáez *et al.*, 2022). La fermentazione è un'efficace strategia biotecnologica per migliorare le proprietà nutrizionali e nutraceutiche dei legumi in quanto ha dimostrato di rimuovere i fattori antinutrizionali e contemporaneamente il rilascio di composti bioattivi (Sáez *et al.*, 2022). Studi condotti da Sáez *et al.* (2022) hanno valutato l'effetto della fermentazione e di altri metodi utilizzati per la lavorazione dei legumi, come l'ammollo, la germinazione e la cottura (bollitura e microonde) sul contenuto di fattori antinutrizionali nella farina di ceci. È stato evidenziato che la fermentazione è una strategia efficace per la rimozione degli inibitori delle proteasi e dell' α -amilasi e dei tannini De Pasquale *et al.* (2021) hanno confermato l'effetto della fermentazione sulla riduzione del contenuto di fattori antinutrizionali.

Sáez *et al.* (2022) hanno condotto alcune ricerche scientifiche riguardo la fermentazione della farina di ceci kabuli utilizzando ceppi selezionati di batteri lattici, quali *Lactiplantibacillus plantarum* e *Weisella paramesenteroides*, per l'ottenimento di prodotti fermentati a base di ceci. I risultati di questi studi hanno messo in evidenza che la farina di ceci fermentata era caratterizzata da un pH inferiore rispetto alla farina di ceci tal quale, grazie alla produzione di acidi organici. Inoltre, entrambi i ceppi durante la fermentazione hanno determinato un aumento della popolazione dei batteri lattici, un aumento del contenuto di fenoli totali e la rimozione dei fattori antinutrizionali.

Inoltre, la fermentazione con batteri lattici migliora anche la biodisponibilità e la bioattività dei composti fenolici. Studi scientifici effettuati da Sáez *et al.* (2022) hanno dimostrato che la fermentazione ha aumentato il contenuto di fenoli totali della farina di ceci e la sua attività antiossidante.

I ceci sono una buona fonte alimentare di diversi composti fenolici bioattivi, come acido idrossibenzoico, acido idrossicinnamico, isoflavonoidi e flavonoidi. Tuttavia, il contenuto di composti fenolici bioattivi, il loro profilo e le loro proprietà funzionali protettive per la salute umana variano in funzione della varietà, delle condizioni di crescita pre-raccolta e la lavorazione post-raccolta (Klongklaew *et al.*, 2022).

Klongklaew *et al.* (2022) condussero la fermentazione della farina di ceci utilizzando *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014 ed i risultati ottenuti dimostravano che la fermentazione può essere usata come strategia per migliorare il contenuto dei composti fenolici e la loro attività antiossidante. Infatti, la fermentazione può aiutare a rilasciare la forma legata dei fenoli e può alterare la composizione e la biodisponibilità dei composti fenolici negli alimenti. Dopo 24 ore e 48 ore di fermentazione, l'attività antiossidante della farina di ceci fermentata era aumentata e questo potrebbe essere dovuto all'aumento del contenuto dei singoli composti fenolici, come acido gallico, catechina e acido benzoico, poiché tutti questi composti fenolici sono potenti antiossidanti. Questi cambiamenti inerenti al profilo delle

molecole fenoliche bioattive influenzano diverse qualità funzionali dei ceci, come l'attività antiossidante, l'attività anti-iperglicemica e proprietà antipertensive (Klongklaew *et al.*, 2022).

3.3.1 Impatto della fermentazione della farina di ceci sulle proteine

La digeribilità è una caratteristica spesso utilizzata per valutare la capacità proteolitica e la disponibilità delle proteine. Le proteine caratterizzate da un'alta digeribilità sono molto più assorbibili dal corpo umano grazie al maggior numero di aminoacidi disponibili. Di conseguenza, le proteine più digeribili determinano maggiori benefici nutrizionali nell'uomo rispetto a quelle che hanno una digeribilità inferiore (Liu *et al.*, 2023).

La fermentazione determina l'idrolisi delle proteine dei legumi, quali il cece, in peptidi bioattivi che hanno la capacità di ridurre i rischi di ipertensione sia nelle persone diabetiche sia non diabetiche. Diversi studi scientifici condotti da Klongklaew *et al.* (2022) hanno dimostrato che la fermentazione con batteri lattici della farina di ceci è un processo efficace per migliorare la qualità nutrizionale e funzionale di tale alimento. La fermentazione migliora la digeribilità delle proteine attraverso la loro idrolisi in peptidi e aminoacidi di piccole dimensioni. De Pasquale *et al.* (2021) hanno condotto altri studi inerenti all'idrolisi delle proteine durante la fermentazione della farina di ceci e i risultati hanno confermato gli studi precedentemente citati. Infatti, durante il processo biotecnologico aumentava la concentrazione di aminoacidi liberi e peptidi di piccole dimensioni, determinando un incremento della digeribilità delle proteine.

Il cece, in confronto alla soia, offre una composizione aminoacidica più equilibrata e le sue proteine sono caratterizzate da una maggiore biodisponibilità. Tuttavia, le proteine vegetali sono meno digeribili delle proteine di origine animale a causa della

diversa composizione e struttura (Liu *et al.*, 2023). Ricerche scientifiche condotte da Liu *et al.* (2023) avevano lo scopo di valutare la relazione tra i cambiamenti della digeribilità delle proteine dopo la fermentazione e le differenze delle loro strutture. È stato evidenziato che le proteine dei legumi sono caratterizzate da una struttura compatta e rigida e questo fattore, oltre alla presenza di fattori antinutrizionali, limita la loro digestione nel tratto gastrointestinale. Le proteine dei legumi sono ricche di strutture secondarie β -foglietto, le quali contribuiscono alla loro resistenza all'idrolisi da parte delle proteasi. La fermentazione della farina di ceci con *Lactiplantibacillus plantarum* ha determinato non solo un aumento della digeribilità delle proteine, a causa della loro idrolisi, ma anche un aumento della loro solubilità e una modifica delle loro strutture multilivello. Infatti, la fermentazione ha causato un aumento della struttura secondaria α -elica e una diminuzione della struttura β -foglietto, con conseguente indebolimento della rigidità delle proteine e maggiore accessibilità di queste ultime da parte delle proteasi.

4. I MICRORGANISMI

I microrganismi sono forme di vita troppo piccole per poter essere viste ad occhio nudo. Questi organismi microscopici hanno forme e funzioni diverse, e popolano tutti gli ambienti della Terra capaci di sostenere la vita. In genere, i microrganismi vivono in comunità microbiche complesse e le loro attività sono regolate dalle interazioni con le altre cellule, con i loro ambienti e con organismi di altre specie (Madigan *et al.*, 2022).

Sebbene i microrganismi siano le più piccole forme di vita conosciute, collettivamente costituiscono la maggior parte della biomassa sulla Terra ed effettuano molte reazioni chimiche necessarie agli organismi superiori. In assenza dei microrganismi, gli organismi superiori non potrebbero sopravvivere. Gli uomini, gli animali e le piante sono strettamente dipendenti dall'attività microbica per quanto riguarda il riciclo di nutrienti fondamentali o per i processi di degradazione della materia organica. Quindi, si può affermare con certezza che nessun'altra forma di vita è importante come i microrganismi per il supporto e il mantenimento della vita sulla Terra (Madigan *et al.*, 2016).

Inoltre, i microrganismi sono impiegati in un ampio numero di processi tecnologici, come i processi biotecnologici di fermentazione, nei quali vengono sfruttate le loro attività metaboliche.

4.1 I Lieviti

I lieviti sono microrganismi eucarioti definiti funghi unicellulari, in quanto si moltiplicano per via asessuata (detta anche vegetativa) per gemmazione o per scissione, dando origine a una popolazione principalmente costituita da cellule singole. I lieviti presentano prevalentemente cellule singole dalla grandezza variabile da 1-5 μm di diametro a 3-30 μm di lunghezza e, in base alla loro morfologia,

possono essere suddivisi in lieviti ellittici (con cellule di forma globosa, sferica e cilindrica) e lieviti apiculati (con cellule dalla estremità appuntite a forma di limone) (Cocolin *et al.*, 2022). Solitamente, i lieviti non resistono ai trattamenti termici di pastorizzazione, mentre sono in grado di sopravvivere a bassi pH. Inoltre, esistono lieviti alofili che sopravvivono ad alte concentrazioni saline e lieviti osmofili che invece sono in grado di resistere ad elevate concentrazioni zuccherine (Volonterio, 2005). Il pH ottimale dei lieviti è compreso tra 4,5 e 6,5, ma alcune specie sono in grado di svilupparsi anche a pH 2,8 – 3,0 e a pH 8 – 8,5. La temperatura di crescita è compresa tra 5°C e 37°C. La temperatura ottimale di crescita dei lieviti è di 25°C (Bourgeois *et al.*, 1990).

Dal punto di vista nutrizionale, i lieviti sono microrganismi chemioorganotrofi, che quindi utilizzano composti organici sia per ottenere energia attraverso reazioni di ossidoriduzione, sia come fonti di carbonio per le vie biosintetiche (Cocolin *et al.*, 2022).

Alcuni lieviti sono in grado di produrre lipidi, altri hanno un'attività lipolitica marcata, come *Yarrowia lipolytica*. Invece, numerose specie hanno un potere proteolitico importante (Bourgeois *et al.*, 1990).

I lieviti hanno un ruolo essenziale in diversi alimenti conferendo stabilità microbiologica, sicurezza e caratteristiche sensoriali peculiari al prodotto finale (Cocolin *et al.*, 2022). Infatti, in campo alimentare i lieviti possono svolgere ruoli positivi, quali agenti della fermentazione alcolica del vino, degli impasti da pane e dei prodotti da forno e lievitazione naturale (Volonterio, 2005). Tuttavia, i lieviti possono essere responsabili di alterazioni di alimenti e bevande, causando difetti con conseguenti significative perdite economiche. Generalmente, il deterioramento degli alimenti da parte di lieviti si verifica in alimenti caratterizzati da basso pH, alto contenuto di zucchero, di sale e bassi livelli di acidi organici (Cocolin *et al.*, 2022).

4.1.1 *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica appartiene al phylum *Ascomycota*. Precedentemente, tale specie di lievito era denominata *Candida*, *Endomycopsis* o *Saccharomycopsis lipolytica*. Il nome “*Yarrowia*” si riferisce a David Yarrow, il ricercatore che ha identificato questo genere (Nicaud, 2012).

I differenti ceppi di *Yarrowia lipolytica* sono caratterizzati da morfologia delle colonie diversa, la quale dipende dalle condizioni di crescita e dal patrimonio genetico del ceppo. Le colonie solitamente assumono morfologie contorte e opache, ma anche liscia e luccicante (Beopoulos *et al.*, 2010). *Yarrowia lipolytica* presenta cellule di lievito, pseudomicelio o vero micelio in base alle condizioni di crescita. La maggior parte dei ceppi di *Yarrowia lipolytica* sono isolati da alimenti o da suolo inquinato da olio, essendo considerato un microrganismo non patogeno o debolmente patogeno (Csutak *et al.*, 2015). Infatti, tale lievito è classificato come GRAS (Generally recognized as safe ovvero generalmente riconosciuti come sicuri) dalla Food and Drug Administration. *Yarrowia lipolytica* è un lievito molto diffuso in natura. Inizialmente, è stato isolato da prodotti lattiero-caseari, salsicce fermentate a secco e altre matrici che presentano un elevato contenuto di grassi o idrocarburi (Krzyczkowska e Fabiszewska, 2015). Solitamente, *Yarrowia lipolytica* è stato isolato da matrici contenenti grassi.

Yarrowia lipolytica è un lievito aerobio che è in grado di crescere in un intervallo di temperatura compreso tra 2°C e 32°C. Dato il suo range di temperatura di crescita, *Yarrowia lipolytica* è stata individuata e si è sviluppata in alimenti come yogurt, latte e formaggi conservati a temperatura di refrigerazione (4-10°C). Il pH ottimale di crescita è compreso tra 2,5 e 8,0, mentre il pH minimo è pari a 1,5 e il pH massimo è di 9,0. Negli ultimi studi è stata evidenziata una parziale tolleranza al sale, pari al 10% m/v di NaCl a pH 3,0. La capacità di tollerare il sale da parte di *Yarrowia lipolytica* dimostra il suo isolamento in alimenti, quali i formaggi (Beopoulos *et al.*, 2010).

Yarrowia lipolytica è un lievito in grado di assimilare idrocarburi e composti del petrolio, glicerolo, acidi grassi e oli, molti dei quali sono rappresentati da residui di diverse aziende. Grazie a questa versatilità, *Yarrowia lipolytica* ha un'ampia gamma di applicazioni di biorisanamento, come trattamento delle acque reflue, dei frantoi e dei suoi effluenti, detossificazione dei metalli pesanti e sintesi di biosurfattanti, lipasi e lipidi (Csutak *et al.*, 2015).

Yarrowia lipolytica è in grado di produrre e liberare molti enzimi endogeni, quali proteasi alcalina, proteasi extracellulare, fosfatasi, lipasi ed esterasi. Tra gli enzimi viene prodotta anche l'inulinasi che esplica la sua azione nei confronti dei carboidrati (Madzak e Beckerich, 2013).

Yarrowia lipolytica è un lievito “non convenzionale” particolarmente studiato, grazie alla sua capacità di produrre diversi metaboliti importanti e alla sua intensa attività secretoria. Uno dei metaboliti prodotti da tale lievito è l'enzima lipasi, un enzima ubiquitario che ha un notevole potenziale a livello industriale e può essere utilizzato come biocatalizzatore in campo farmaceutico, alimentare e ambientale (Brígida *et al.*, 2013). *Yarrowia lipolytica* è in grado di utilizzare i trigliceridi come fonte di carbonio. I trigliceridi vengono idrolizzati dalle lipasi prodotte da tale lievito e in questo modo vengono degradati in acidi grassi liberi e glicerolo. Quindi, l'attività lipolitica di *Yarrowia lipolytica* è molto marcata. Tuttavia, la produzione di lipasi da parte di *Yarrowia lipolytica* dipende da diversi fattori, come la concentrazione di glucosio, la disponibilità di fonti azotate, la temperatura, il pH e il tempo di incubazione (Brígida *et al.*, 2013).

Yarrowia lipolytica, oltre alle lipasi, produce anche proteasi che idrolizzano le proteine in amminoacidi e peptidi di piccole dimensioni. Tuttavia, dato che tale lievito è aerobio, la secrezione di questi enzimi dipende dalla quantità di ossigeno disponibile.

La lipolisi e la proteolisi sono fenomeni desiderabili in molti processi tecnologici, come nella fase di maturazione di formaggi e insaccati. Tuttavia, lo sviluppo non controllato di *Yarrowia lipolytica* e la produzione di tali enzimi può determinare

l'alterazione delle caratteristiche organolettiche e di texture degli alimenti (Groenewald *et al.*, 2014).

4.1.2 *Debaryomyces hansenii*

Debaryomyces hansenii è un lievito appartenente alla famiglia *Saccharomyces* ed è un agente di biocontrollo molto efficace nei confronti di funghi dannosi per i cereali, frutta, carne e prodotti lattiero-caseari (Zhao *et al.*, 2023).

Debaryomyces hansenii è forse il lievito prevalente nei formaggi, specialmente sulla loro superficie. Infatti, è il maggiore responsabile della viscosità sulla superficie del formaggio Roquefort (Volonterio, 2005). *Debaryomyces hansenii* è un lievito ascomicete non patogeno.

Debaryomyces hansenii è un lievito piuttosto osmotollerante, halotollerante e xerotollerante. Tale lievito è in grado di tollerare meglio la presenza di sale (10%) rispetto allo zucchero (5%). Infatti, *Debaryomyces hansenii* è stato isolato in diversi habitat caratterizzati da bassi valori di attività dell'acqua, come l'acqua di mare, suolo e prodotti ad alto contenuto di zuccheri. La tolleranza al sale è maggiore a valori di pH vicini a 5,0, mentre si riduce a pH 3,0 e 7,0. L'intervallo di temperatura in cui *Debaryomyces hansenii* cresce è compreso tra 5°C e 37°C, ma la sua temperatura ottimale di crescita è compreso tra 25°C e 30°C (Volonterio, 2005). *Debaryomyces hansenii* è in grado di crescere in un intervallo di pH compreso tra 3,0 e 8,0. Inoltre, tale lievito è caratterizzato da un'alta tolleranza al biossido di cloro, un potente biocida (Butinar *et al.*, 2005).

Debaryomyces hansenii è in grado di produrre proteasi, le quali sono in grado di idrolizzare le proteine contenute nella matrice in cui si trova tale lievito, come le caseine nei prodotti lattiero-caseari. La sua attività proteolitica risulta più intensa quando viene coltivato nel latte insieme ai batteri lattici dei quali prolunga anche l'esistenza. Alla temperatura di 10°C, tuttavia, non idrolizza le proteine, come la

caseina (Volonterio, 2005). Oltre alle proteasi, *Debaryomyces hansenii* è in grado di sintetizzare altri metaboliti, quali amilasi e lipasi, utilizzati nell'industria alimentare e nella produzione di biocarburanti (Pietrangeli e Rolle, 2019).

Debaryomyces hansenii utilizza prevalentemente come substrato l'isomero L dell'acido lattico sia per via aerobia sia per via anaerobia. Inoltre, tale lievito utilizza anche l'acido acetico. Si pensa che in questo modo possa inibire lo sviluppo di alcuni microrganismi, tra cui *Clostridium tyrobutyricum*. *Debaryomyces hansenii* dopo l'utilizzo di tali substrati è in grado di produrre odore di alcol, acido, frutta e formaggio (Volonterio, 2005). Infatti, un aspetto rilevante di tale lievito è la sua capacità di sintetizzare alcune molecole antimicrobiche, quali acido caprico e acido caprilico, che svolgono un'attività antifungina e antibatterica. Questa caratteristica rende *Debaryomyces hansenii* un lievito di interesse biotecnologico ambientale e medico (Gullo *et al.*, 2014).

Il metabolismo di *Debaryomyces hansenii* è caratterizzato prevalentemente da vie metaboliche che contribuiscono al metabolismo lipidico. La sua capacità di sintetizzare, accumulare e metabolizzare lipidi rappresenta un vantaggio biotecnologico per la produzione di diversi alimenti (Ratledge e Tan, 1990).

All'interno della specie *Debaryomyces hansenii* sono presenti numerosi ceppi caratterizzati da una diversa capacità di utilizzare le diverse fonti di carbonio, attività proteasica e lipidica.

I principali metaboliti prodotti da *Debaryomyces hansenii* sono rappresentati da acidi grassi a lunga catena, i quali possono essere usati per la produzione di biocarburanti (Valero *et al.*, 2019). Tale lievito è in grado di produrre anche glicerolo, il quale può essere impiegato per la produzione di composti chimici e bioplastiche.

4.1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae appartiene al phylum *Ascomycota* e alla famiglia *Saccharomycetaceae*. Gli ascomiceti sono il gruppo di funghi più ampio e molto diversificato (Madigan *et al.*, 2022).

Le cellule di *Saccharomyces cerevisiae* e di altri ascomiceti unicellulari sono di solito sferiche, ovali o cilindriche e la divisione cellulare avviene per gemmazione. *Saccharomyces cerevisiae* prospera in habitat ricchi di zuccheri, come la superficie dei frutti e fiori (Madigan *et al.*, 2022).

Saccharomyces cerevisiae è stato studiato come eucariote modello per lungo tempo e rappresenta il primo organismo eucariote di cui è stato sequenziato completamente il genoma (Madigan *et al.*, 2022).

Saccharomyces cerevisiae è un lievito unicellulare osmofilo, comunemente noto come “lievito di birra”. È probabilmente il lievito più importante nell’ambito alimentare e dell’alimentazione umana. Il suo utilizzo è noto fin dall’antichità per la panificazione, la vinificazione e la produzione di birra. Si pensa che sia stato isolato per la prima volta dalla superficie degli acidi di uva. Infatti, *Saccharomyces cerevisiae* è presente nella pruina, sostanza cerosa prodotta dalle cellule superficiali dell’epidermide di frutti e foglie e corteccia degli alberi. Dato che *Saccharomyces cerevisiae* è la principale specie di lievito coinvolta nella trasformazione di molti alimenti e bevande fermentate, molti ceppi di tale microrganismo sono stati largamente usati come colture starter nella produzione di vino, birra e prodotti da forno. *Saccharomyces cerevisiae* è il lievito principale della fermentazione alcolica nel vino e nella birra. Per la produzione di questi alimenti sono coinvolte anche altre specie del genere *Saccharomyces*, ma *Saccharomyces cerevisiae* diventa dominante per la sua maggiore tolleranza all’etanolo (Cocolin *et al.*, 2022).

Saccharomyces cerevisiae ha una temperatura ottimale di crescita compresa tra 30°C e 35°C. Tutti i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* sono in grado di utilizzare glucosio, fruttosio, galattosio, maltosio e trealosio in condizioni aerobiche, mentre non

sono in grado di assimilare lattosio e cellobiosio. Tutti i ceppi sono in grado di utilizzare l'ammoniaca e l'urea come fonte azotata, ma non possono assimilare i nitrati, dato che non sono in grado di ridurli a ioni ammonio. Inoltre, sono in grado di utilizzare anche amminoacidi e peptidi di piccole dimensioni come fonti di azoto. *Saccharomyces cerevisiae* è un lievito anaerobio facoltativo, caratterizzato da un doppio metabolismo: ossidativo e fermentativo. Quindi, tale lievito è in grado di crescere sia in presenza di ossigeno, attuando la respirazione, sia in assenza di ossigeno, attuando la fermentazione. In condizioni aerobiche, *Saccharomyces cerevisiae* è in grado di produrre quantità elevate di energia (38 molecole di ATP), oltre a biomassa microbica, acqua e anidride carbonica. In condizioni anaerobiche, *Saccharomyces cerevisiae* produce piccole quantità di energia (2 molecole di ATP), insieme ad etanolo e anidride carbonica (Madigan *et al.*, 2022). Tuttavia, *Saccharomyces cerevisiae* è soggetto all'”effetto Crabtree”. Tale effetto si verifica quando *Saccharomyces cerevisiae* si trova in presenza di ossigeno e quindi dovrebbe prevalere il metabolismo respiratorio, ma la concentrazione zuccherina sale oltre un certo limite (50 g/L) e questo fattore determina l'arresto della respirazione e il sopravvento del metabolismo fermentativo. Quindi, l'”effetto Crabtree” consiste nella repressione della respirazione in condizioni di aerobiosi e in presenza di alte concentrazioni zuccherine. Questo effetto limita la crescita del lievito e quindi è un effetto indesiderato.

Inoltre, *Saccharomyces cerevisiae* è sensibile alla pressione. Quando la pressione nei contenitori per la lievitazione supera 8 atmosfere, esso comincia a degenerare.

4.2 I Batteri lattici

L'ordine *Lactobacillales* comprende batteri Gram positivi, a basso contenuto di guanina e citosina del genoma, tolleranti ai bassi pH e generalmente non sporigeni. Inoltre, i batteri appartenenti a tale ordine adottano prevalentemente un metabolismo

fermentativo e possono avere diverse forme: bastoncino (bacilli) o sferici (cocchi). Tuttavia, la maggior parte dei batteri lattici non è sensibile all'ossigeno e quindi può crescere anche in sua presenza. Per questo motivo, sono definiti anaerobi aerotolleranti. Queste differenti morfologie condividono caratteristiche metaboliche e fisiologiche comuni (Madigan *et al.*, 2022). I batteri lattici si sviluppano in un ampio range di temperatura compreso tra 2°C e 55°C, con una temperatura ottimale compresa tra 20°C e 45°C a seconda della specie (Volonterio, 2005).

I batteri appartenenti all'ordine *Lactobacillales* si trovano nelle piante in decomposizione, nel tratto gastrointestinale degli umani e degli animali, nei prodotti lattiero-caseari e in habitat in cui sono presenti carboidrati. Tali microrganismi sono in grado di produrre acido lattico come principale metabolita prodotto dalla fermentazione dei carboidrati. Per questo motivo, tali microrganismi sono comunemente chiamati batteri lattici o batteri dell'acido lattico (LAB). La produzione di acido lattico da parte di questi batteri ha un ruolo importante negli alimenti, poiché l'acidificazione e il conseguente abbassamento del pH inibiscono la crescita di microrganismi patogeni e degradativi, prolungando la shelf-life degli alimenti. Inoltre, i batteri lattici sono in grado di produrre batteriocine che inibiscono la proliferazione degli altri microrganismi. L'acido lattico e gli altri metaboliti prodotti contribuiscono anche al profilo organolettico, sensoriale e strutturale degli alimenti.

In genere, i batteri lattici hanno capacità biosintetiche limitate, con conseguenti esigenze nutritive complesse che includono vitamine, amminoacidi, purine e pimiridine (Madigan *et al.*, 2022).

L'importanza dei batteri lattici nell'industria alimentare è ulteriormente evidenziata dal loro status di GRAS, ovvero generalmente riconosciuti come sicuri, dovuto al loro aspetto ubiquitario e al loro contributo al microbiota sano delle superficie delle mucose animali e umane. Infatti, i batteri lattici sono noti per le loro proprietà probiotiche.

All'interno dei batteri lattici si trovano numerosi generi, come *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Weissella* ed altri.

I batteri lattici possono essere classificati in due gruppi in base ai metaboliti prodotti durante la fermentazione degli zuccheri (Madigan *et al.*, 2022):

- Batteri lattici omofermentati, i quali fermentano il glucosio in assenza di ossigeno producendo solamente acido lattico. Alcuni esempi di generi di batteri lattici omofermentanti sono *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Pediococcus*;
- Batteri lattici eterofermentanti, i quali fermentano il glucosio in assenza di ossigeno producendo acido lattico, acido acetico, anidride carbonica ed etanolo. Alcuni generi di batteri lattici eterofermentanti sono *Leuconostoc* e *Weissella*.

I batteri lattici sono in grado di produrre enzimi che idrolizzano gli zuccheri e le proteine presenti negli alimenti, rendendoli più digeribili e disponibili. Infatti, i batteri lattici intervengono nella fase di maturazione di formaggi e salumi, avendo una significativa attività proteolitica e una minore attività lipolitica. La proteolisi dei batteri lattici prevede l'intervento di diversi enzimi in successione:

- Proteinasi ad attività endopeptidasica;
- Un complesso sistema enzimatico;
- Numerose peptidasi citoplasmatiche.

Le proteine idrolizzate da questo sistema proteolitico complesso generano amminoacidi liberi e peptidi (Cocolin *et al.*, 2022).

In generale, i batteri lattici sono considerati scarsamente lipolitici. Tuttavia, alcune specie sono in grado di idrolizzare mono- e digliceridi che contengono acidi grassi a corta catena. Inoltre, alcuni studi recenti hanno riconosciuto una parziale attività esterasica (Cocolin *et al.*, 2022).

4.2.1 I Lattobacilli

I lattobacilli appartengono all'ordine *Lactobacillales* e alla famiglia *Lactobacillaceae*. I lattobacilli sono batteri Gram positivi tipicamente di forma bastoncellare e crescono a forma di “catene”. I lattobacilli sono microrganismi anaerobi aerotolleranti o microaerofili, non mobili, non sporigeni. Molte specie del genere *Lactobacillus* sono omofermentanti e quindi producono esclusivamente acido lattico durante la fermentazione del glucosio. Invece, altre specie di lattobacilli sono eterofermentanti e quindi producono acido lattico, acido acetico, etanolo ed anidride carbonica durante la fermentazione del glucosio. I lattobacilli sono comuni nei prodotti lattiero-caseari e alcuni ceppi sono utilizzati per la produzione di prodotti fermentati del latte. Ad esempio, *Lactobacillus acidophilus* è impiegato per la produzione di panna acida, mentre *Lactobacillus delbrueckii* è utilizzato per la preparazione dello yogurt (Madigan *et al.*, 2022).

Al genere *Lactobacillus* appartengono molte specie filogeneticamente, ecologicamente e metabolicamente diverse.

I lattobacilli sono una componente significativa del microbiota umano e animale. Infatti, essi si trovano nell'apparato digerente e nell'apparato riproduttore femminile.

I lattobacilli sono tipicamente più resistenti alle condizioni di acidità degli altri batteri lattici e sono in grado di crescere a valori di pH intorno a 4. La resistenza all'acidità dei lattobacilli fa sì che essi siano in grado di continuare a crescere durante la fermentazione lattica, anche quando il valore di pH scende al di sotto di valori compatibili con la crescita degli altri batteri lattici. Di conseguenza, i lattobacilli sono i responsabili delle fasi finali di molte fermentazioni lattiche (Madigan *et al.*, 2022).

Raramente i batteri lattici sono patogeni (Madigan *et al.*, 2022).

I lattobacilli sono in grado di produrre una vasta gamma di enzimi e molecole bioattive, quali proteasi, lipasi, amilasi e batteriocine. Per questi motivi, i lattobacilli sono utilizzati per la produzione di diversi alimenti fermentati, come formaggi, prodotti a base di carne fermentati e bevande fermentate.

Latilactobacillus sakei è una specie di *Lactobacillus* presente in alimenti a base di carne, come i salami. Tale batterio è non sporigeno, ha una forma di bacillo ed è eterofermentativo. *Latilactobacillus sakei* è in grado di sintetizzare batteriocine, come la sakacina, che inibiscono la proliferazione di microrganismi patogeni ed esopolisaccaridi. Inoltre, tale batterio è in grado di produrre enzimi, come amilasi e proteasi, che agiscono nella fase di fermentazione dei salami. (Paparella et al., 2018).

Latilactobacillus curvatus è una specie di *Lactobacillus* presente in prodotti a base di carne, come il prosciutto crudo. *Latilactobacillus curvatus* è in grado di produrre batteriocine, come la curvaticina.

Lactiplantibacillus plantarum è una specie dei batteri lattici che si trova comunemente in molti alimenti fermentati, come il kimchi e i crauti, e nella materia vegetale anaerobica. *Lactiplantibacillus plantarum* è un batterio a forma di bacillo, le cui cellule sono bastoncini con estremità arrotondate o dritte. Tale batterio lattico è in grado di crescere a temperature comprese tra 12°C e 40°C. Il pH al quale può crescere è compreso tra 3,4 e 8,8. *Lactiplantibacillus plantarum* è un batterio Gram positivo, omofermentativo e aerotollerante. Tale batterio è in grado di produrre enzimi come cellulasi e pectinasi che intervengono nella fermentazione dei prodotti vegetali.

Lactobacillus paracasei è un genere di *Lactobacillus* omofermentativo, non sporigeno e non mobile. Tale batterio è comunemente utilizzato nella fermentazione di alimenti lattiero-caseari e come colture probiotiche. Si trova in molti habitat umani, come il tratto gastrointestinale, la bocca, ma anche le acque reflue, gli insilati e i prodotti lattiero-caseari. *Lactobacillus paracasei* ha una forma di bastoncino. Questo batterio cresce in modo ottimale in un intervallo di temperatura compreso tra 10°C e 37°C. *Lactobacillus paracasei* è in grado di produrre diversi enzimi, tra cui proteasi, lipasi e galattosidasi che contribuiscono alla digestione dei nutrienti presenti nei prodotti lattiero-caseari.

4.2.2 I Lattococchi

I lattococchi appartengono all'ordine *Lactobacillales* e alla famiglia *Streptococcaceae*. I lattococchi sono batteri a forma di cocci, Gram positivi, aerobi facoltativi o anaerobi, non mobili, non sporigeni che si trovano singolarmente, in coppia o catene. I generi *Lactococcus* e *Streptococcus* comprendono specie omofermentanti di batteri lattici a forma di cocco che vivono in ambienti peculiari e possiedono attività metaboliche di particolare interesse per l'uomo. Alcune specie di lattococchi sono patogene sia per l'uomo sia per gli animali (Madigan *et al.*, 2022). I lattococchi sono comunemente utilizzati nell'industria lattiero-casearia per la produzione di alimenti fermentati, quali formaggi.

Le specie di *Streptococcus* hanno una morfologia cellulare caratteristica, con la formazione di catene o tetradi facilmente distinguibili dai lattobacilli a bastoncello. Come produttori di acido lattico, gli streptococchi svolgono un ruolo importante nella produzione di panna acida, insilati e altri prodotti fermentati (Madigan *et al.*, 2022).

Il genere *Lactococcus* comprende streptococchi di importanza casearia, mentre il genere *Enterococcus* è principalmente costituito da specie di origine fecale e può essere patogeno per l'uomo (Madigan *et al.*, 2022). Il genere *Lactococcus* comprende batteri lattici omofermentanti obbligati che producono solo acido lattico, il quale ha il compito di acidificare l'ambiente circostante.

I lattococchi eterofermentanti vengono classificati nel genere *Leuconostoc*. I ceppi di *Leuconostoc* producono anche aromi, come il diacetile e l'acetoina a seguito delle reazioni cataboliche a carico dell'acido citrico (Madigan *et al.*, 2022).

Lactococcus lactis è un batterio lattico Gram positivo, con basso contenuto di citosina e guanina, mesofilo psicrotrofo che è in grado di crescere fino a 40°C. Inoltre, è un batterio non sporigeno, non mobile, con metabolismo omofermentativo. Di conseguenza, *Lactococcus lactis* produce solo acido lattico a partire dal glucosio. Tale batterio è in grado di resistere a concentrazioni del 4% di NaCl in presenza di

un pH di 9,2. Esso si sviluppa in ambiente acido con un pH ottimale compreso tra 5,0 e 6,5. Le cellule di *Lactococcus lactis* sono cocchi che si raggruppano in coppie e corte catenelle e, a seconda delle condizioni di crescita, appaiono ovoidali. *Lactococcus lactis* è in grado di fermentare sia il lattosio sia numerosi zuccheri (esosi e pentosi). Esso è utilizzato in combinazione con altri batteri lattici (*Leuconostoc*) per la produzione di alcuni formaggi freschi e molli e il latticello e per la maturazione della panna da burrificare. Alcuni ceppi di *Lactococcus lactis* sono termodurici e alcuni sono in grado di produrre la batteriocina nisina (Volonterio, 2005).

Lactococcus lactis ha una notevole importanza nel settore alimentare grazie anche al suo status di GRAS, ovvero generalmente riconosciuto come sicuro, con pochi casi segnalati come patogeno opportunista.

4.3 I Bacilli

I Bacilli sono una classe tassonomica di batteri che comprende due ordini, *Bacillales* e *Lactobacillales*, che comprendono diversi microrganismi patogeni noti, quali *Bacillus cereus*. Invece, altre specie di *Bacillus* sono largamente impiegate come agenti di fermentazione in molti alimenti, come i prodotti lattiero-caseari, verdure, prodotti a base di carne e prodotti a base di pesce.

I Bacilli sono batteri Gram positivi, a forma di bastoncino, aerobi o aerobi facoltativi, mesofili o termofili che sono in grado di formare endospore in presenza di condizioni ambientali avverse e mancanza di nutrienti (Cocolin *et al.*, 2022).

I Bacilli si trovano in diversi ambienti, come suolo, pulviscolo atmosferico, alimenti, feci e matrici che vengono riscaldate a temperature di 80°C per 10 minuti, in modo da attivare le cellule vegetative, le quali si trasformano in endospore (Madigan *et al.*, 2022).

I batteri appartenenti al genere *Bacillus* sono caratterizzati da un'elevata diversità metabolica che gli permette di utilizzare diverse fonti nutritive, come carboidrati,

proteine e lipidi (Cocolin *et al.*, 2022). Molte specie di *Bacillus* sintetizzano enzimi extracellulari, come proteasi, lipasi e amilasi che degradano polimeri complessi, quali polisaccaridi, acidi nucleici, proteine e lipidi, consentendo all'organismo di usare i prodotti della degradazione come fonte di carbonio. Un grande numero di Bacilli produce anche antibiotici (Madigan *et al.*, 2022).

Le specie del genere *Bacillus* di interesse alimentare presentano un metabolismo aerobio facoltativo. Quindi, sono in grado di crescere sia in condizioni aerobie sia in assenza di ossigeno. Tuttavia, il metabolismo preferenziale è quello respirativo, utilizzando l'ossigeno come accettore finale di elettroni. Alcune specie di questo genere effettuano la respirazione anaerobica, riducendo i nitrati a nitriti. In assenza di accettori di elettroni, utilizzano la via fermentativa (Cocolin *et al.*, 2022).

Bacillus amyloliquefaciens è un batterio Gram positivo aerobio appartenente al genere *Bacillus* utilizzato in agricoltura, acquacoltura e idroponica per combattere i patogeni delle radici. Esso può essere riscontrato nel suolo e nell'ambiente acquatico. Questo batterio è in grado di produrre α -amilasi che è in grado di idrolizzare l'amido. Inoltre, *Bacillus amyloliquefaciens* è in grado di sintetizzare una fonte di subtilisina che catalizza la degradazione delle proteine in modo simile alla tripsina. *Bacillus amyloliquefaciens* è in grado di sintetizzare composti bioattivi, quali polisaccaridi, lipopeptidi, enzimi proteolitici e antibiotici che hanno proprietà antimicrobiche, antifungine e antitumorali.

Bacillus subtilis è noto anche come “bacillo del fieno” o “bacillo dell'erba”. *Bacillus subtilis* è un batterio Gram positivo presente nel suolo e nel tratto gastrointestinale dei ruminanti, degli umani e delle spugne marine. Esso ha una forma a bastoncino ed è in grado di formare un'endospora che è in grado di sopravvivere a condizioni ambientali avverse di temperatura ed essiccazione. *Bacillus subtilis* è un batterio anaerobio facoltativo, caratterizzato da flagelli che gli permettono di muoversi nei liquidi.

5. OBIETTIVI DELLA TESI

Il cece, *Cicer arietinum L.*, è una pianta erbacea annuale, una delle leguminose da granella più antiche e largamente utilizzate nel Medio ed Estremo Oriente (Baldoni e Giardini, 2000) ed è la terza per importanza mondiale, dopo il fagiolo e il pisello (Ranalli *et al.*, 2018).

Il cece è considerato un legume ricco di sostanze nutritive e composti benefici per la salute umana. Infatti, esso è caratterizzato da un alto contenuto in carboidrati, un buon livello di proteine, lipidi, vitamine, sali minerali, fibra alimentare e composti fenolici (Wang *et al.*, 2021). Grazie alla sua composizione chimica, il cece è considerato un alimento bilanciato. Inoltre, la farina di sua derivazione può essere utilizzata come ingrediente per la formulazione di alimenti funzionali ad alto valore aggiunto (Klongklaew *et al.*, 2022).

Tuttavia, uno dei principali svantaggi del cece, come avviene anche nella maggior parte delle *Leguminose*, è quello di sintetizzare sostanze biologicamente attive come difesa contro i predatori che causano effetti fisiologici avversi sull'uomo. Queste sostanze, chiamate fattori antinutrizionali, comprendono inibitori delle amilasi e della proteasi, acido fitico, saponine, tannini, lectine e α -galattosidi ed influenzano la biodisponibilità dei nutrienti e possono causare disturbi gastrointestinali e flatulenza (Sáez *et al.*, 2022).

Numerosi studi hanno dimostrato che la quantità di fattori anti nutrizionali può essere ridotta attraverso processi chimico-fisici e/o processi biotecnologici, come la fermentazione. La fermentazione è un'efficace strategia biotecnologica per migliorare le proprietà nutrizionali e nutraceutiche dei legumi e può determinare il rilascio di composti bioattivi. Inoltre, la fermentazione può favorire una variazione delle caratteristiche chimico-fisiche, organolettiche e di texture dei legumi e delle farine di loro derivazione (Sáez *et al.*, 2022). La fermentazione è un processo biotecnologico semplice ed economico, molto utilizzato nel settore alimentare non solo per la conservazione degli alimenti, ma anche per aumentare il valore

nutrizionale dei prodotti alimentari, producendo alimenti ad alto valore aggiunto, per conferire aromi, sapori e consistenze differenti agli alimenti e per eliminare sostanze nocive e tossiche (Garrido-Galand *et al.*, 2021).

I microrganismi utilizzati nel corso dei processi fermentativi, quali batteri lattici, lieviti e bacilli, producono diversi metaboliti attraverso il metabolismo dei carboidrati, proteine e lipidi. Questi microrganismi producono enzimi che idrolizzano le diverse macromolecole, determinando il rilascio di sostanze più accessibili all'organismo umano che migliorano la qualità nutrizionale degli alimenti. Ad esempio, la fermentazione della farina di ceci ad opera dei batteri lattici determina una riduzione del contenuto in fattori antinutrizionali, come acido fitico, saponine, tannini e inibitori delle proteasi (De Pasquale *et al.*, 2020). I lieviti, invece, durante il processo fermentativo attraverso la fermentazione alcolica producono alcol, anidride carbonica, acidi organici e diminuiscono la concentrazione di composti antinutrizionali.

Sulla base delle argomentazioni precedenti, lo scopo di tale lavoro è stato quello di esaminare le caratteristiche della farina di ceci dopo essere stata sottoposta ad un processo fermentativo. La fermentazione della farina di ceci è stata condotta da differenti specie di batteri lattici, lieviti e bacilli, in modo tale da selezionare i ceppi microbici più performanti e idonei per la formulazione di ingredienti da impiegare per la produzione di alimenti ad alto valore aggiunto. In particolare, è stata valutata la capacità di 18 ceppi microbici di svilupparsi nella matrice iniziale costituita da una miscela di farina di ceci e acqua in rapporto 1:2 p/p. Inoltre, è stata valutata la cinetica di acidificazione delle miscele inoculate durante le 96 ore di incubazione. Infine, i campioni ottenuti dal metabolismo di batteri lattici, lieviti e bacilli sono stati analizzati rispettivamente dopo 48, 72 e 24 ore incubazione per quanto riguarda il loro contenuto in proteine, peptidi e in molecole volatili.

6. MATERIALI E METODI

6.1 Condizioni di crescita dei microorganismi selezionati

In questo studio sono stati utilizzati differenti ceppi di lieviti, bacilli e batteri lattici isolati da diversi ambienti e matrici, come fiumi, canapa, prodotti lattiero-caseari, fecce di vino e carne. Per quanto riguarda i lieviti sono stati impiegati 4 diversi ceppi di *Yarrowia lipolytica* (PO11, PO17, Y3 e RO25), 2 ceppi di *Debaryomyces hansenii* (Y15A e Y17A) e 2 ceppi differenti di *Saccharomyces cerevisiae* (CRB1 e FB2). Per quanto riguarda i bacilli sono stati utilizzati 2 ceppi di *Bacillus subtilis* (B5C e B12C) e un ceppo di *Bacillus amyloliquefaciens* (B5M). Infine, i batteri lattici impiegati appartenevano a 5 differenti specie: *Latilactobacillus sakei* (M12A), *Latilactobacillus curvatus* (BS3), 2 ceppi di *Lactiplantibacillus plantarum* (LP82 e LP23), *Lactobacillus paracasei* (L) e 2 ceppi di *Lactococcus lactis* (LBG2 e FBG1P). Tutti i ceppi impiegati in questo studio appartengono alla collezione del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari (DISTAL) dell'Alma Mater Studiorum – Università di Bologna.

In Tabella 36 sono riportate le caratteristiche dei ceppi di microrganismi utilizzati, tra cui origine del ceppo, condizioni ottimali di crescita e terreno di coltura impiegato per la loro crescita.

Tabella 36: Caratteristiche dei ceppi dei microrganismi impiegati nello studio

| | Specie microbica | Ceppo | Origine | Condizioni di crescita nella farina di ceci | | |
|-----------------|--------------------------------------|-------|--------------------|---|----------------------|--|
| | | | | Terreno | Temperatura | Condizioni |
| Batteri lattici | <i>Latilactobacillus sakei</i> | M12A | Carne essiccata | MRS | 30°C | Ridotto contenuto di ossigeno (Vasetto con tappo a vite, 100 mL) |
| | <i>Latilactobacillus curvatus</i> | BS3 | Kefir | | | |
| | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | LP82 | | | | |
| | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | LP23 | Feccia Mazzari | | | |
| | <i>Lactobacillus paracasei</i> | L | Feccia Mazzari | | | |
| | <i>Lactococcus lactis</i> | LBG2 | | | | |
| | <i>Lactococcus lactis</i> | FBG1P | | M17 | | |
| Lieviti | <i>Debaryomyces hansenii</i> | Y17A | Carne essiccata | YPD | Temperatura ambiente | Agitazione (Beuta, 250 mL) |
| | <i>Debaryomyces hansenii</i> | Y15A | Carne essiccata | | | |
| | <i>Yarrowia lipolytica</i> | PO11 | Acqua del fiume Po | | | |
| | <i>Yarrowia lipolytica</i> | PO17 | Acqua del fiume Po | | | |
| | <i>Yarrowia lipolytica</i> | RO25 | Burro | | | |
| | <i>Yarrowia lipolytica</i> | Y3 | Alimenti congelati | | | |
| | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | CRB1 | Sourdough | | 30°C | Ridotto contenuto di ossigeno (Vasetto con tappo a vite, 100 mL) |
| | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | FB2 | Sourdough | | | |
| Bacilli | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | B5M | Feccia Mazzari | BHI | Temperatura ambiente | Agitazione (Beuta, 250 mL) |
| | <i>Bacillus subtilis</i> | B5C | Canapa | | | |
| | <i>Bacillus subtilis</i> | B12C | Canapa | | | |

Prima di essere stati utilizzati, i microrganismi sono stati ripresi dal mezzo di coltura in cui si trovavano e sono stati sottoposti a due fasi di rinfresco nel terreno microbiologico adeguato. I lieviti sono stati rinfrescati due volte sul terreno microbiologico di coltura Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) broth (Oxoid, Basigstone, UK). I ceppi di lievito *Y. lipolytica* e *D. hansenii* sono stati incubati in beuta a temperatura ambiente per 48-72 ore in agitazione, mentre i ceppi di *S. cerevisiae* sono stati ripresi in provetta ed incubati a 30°C per 48 ore. I ceppi di batteri lattici sono stati coltivati sul terreno di coltura MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) broth (Oxoid, Basigstone, UK) e sono stati incubati a 37°C per 24 ore. Infine, i bacilli

sono stati fatti crescere su terreno microbiologico Brain heart infusion (BHI) liquid medium (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) ed incubati a 37°C per 24 ore.

Prima del loro utilizzo, i microrganismi sono stati centrifugati a 13000 rpm, lavati con acqua fisiologica sterile (0,9% di NaCl) due volte e conservati a 4 °C fino al momento della prova.

6.2 Preparazione dei campioni di farina di ceci fermentata

I campioni di farina di ceci fermentata analizzati durante il lavoro sono stati ottenuti miscelando la farina di ceci (Molino Maraldi – Cesena, FC) con acqua in bottiglia in un rapporto 1:2 p/p. In Figura 37 è riportata la confezione della farina di ceci utilizzata per la realizzazione dei campioni e i suoi valori nutrizionali.



Figura 37: Confezione della farina di ceci impiegata e relativi valori nutrizionali

Le miscele di farina di ceci e acqua sono state inoculate con i ceppi di lieviti e di batteri lattici rispettivamente ad una concentrazione di circa 7 Log UFC/g e 8 Log UFC/g. I campioni sono stati incubati in condizioni di temperatura e concentrazione di ossigeno diversa in base al ceppo di microrganismo utilizzato e alle sue condizioni ottimali di crescita. I campioni nei quali sono stati inoculati i ceppi di lievito

(*Debaryomyces hansenii* Y17A e Y15A, *Yarrowia lipolytica* PO11, PO17, RO25 e Y3) e i ceppi di *Bacillus* (*Bacillus amyloliquefaciens* B5M e *Bacillus subtilis* B5C e B12C) sono stati miscelati all'interno di beute da 250 mL di volume e successivamente sono stati incubati a temperatura ambiente in agitazione per garantire il contatto della miscela con l'aria (Figura 38).



Figura 38: Campioni inoculati con ceppi di lieviti e bacilli in beuta

Invece, i campioni nei quali sono stati inoculati i ceppi di batteri lattici (*Lactilactobacillus sakei* M12A, *Lactilactobacillus curvatus* BS3, *Lactiplantibacillus plantarum* LP82 e LP23, *Lactobacillus paracasei* L, *Lactococcus lactis* LBG2 e FBG1P) e i lieviti *Saccharomyces cerevisiae* CRB1 e FB2, sono stati miscelati all'interno di vasetti da 100 mL con tappo a vite. Successivamente, tali campioni sono stati incubati a 30 °C con il tappo a vite leggermente svitato in staticità per ridurre la concentrazione di ossigeno presente nella miscela (Figura 39).



Figura 39: Campioni inoculati con ceppi di batteri lattici in vasetti sterili con tappo a vite

I campioni di farina di ceci e acqua inoculati con i ceppi microbici selezionati sono stati confrontati con un campione di controllo ottenuto allo stesso modo ma privo di inoculo ed analizzato solo immediatamente dopo la preparazione.

I campioni inoculati sono stati incubati nelle condizioni sopra descritte per 96 ore durante le quali, con cadenza di 24 ore, sono stati sottoposti ad analisi microbiologiche, analisi del pH e un'aliquota veniva prelevata per analisi successive.

6.3 Analisi microbiologiche

La fermentazione dei campioni di farina di ceci e acqua, operata dai ceppi di microrganismi, si è protratta per 96 ore. Durante l'arco del processo fermentativo sono stati effettuati i campionamenti microbiologici ogni 24 ore (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h) per registrare la curva di crescita dei microrganismi all'interno dei campioni inoculati e il profilo microbiologico di tutte le miscele.

I campionamenti microbiologici si articolano in alcuni step:

1. Preparazione dei terreni microbiologici;
2. Prelievo del campione;
3. Preparazione delle diluizioni decimali seriali;
4. Semina dell'inoculo e dispersione sul terreno di coltura;
5. Incubazione delle piastre e sviluppo microbico;
6. Conta delle colonie microbiche e quantificazione.

Si suppone che la carica microbica iniziale della farina di ceci tal quale sia pari a 10^8 UFC/g. Per la preparazione delle diluizioni seriali è stato prelevato 1 mL di farina di ceci tal quale ed è stato diluito con 9 mL di soluzione fisiologica sterile. In questo modo è stata preparata la diluizione -1, la quale avrà un carico microbico pari a 10^7 UFC/g. A questo punto è stato prelevato 1 mL della diluizione -1 ed è stato diluito in 9 mL di soluzione fisiologica sterile per la preparazione della diluizione -2. Lo stesso procedimento è stato effettuato per la realizzazione di tutte le diluizioni seriali, fino

alla diluizione -7 nella quale il carico microbico dovrebbe essere circa pari a 10 UFC/g.

Dopo la preparazione delle diluizioni decimali seriali, i campionamenti microbiologici sono stati effettuati inoculando un'aliquota nota di ogni diluizione sui terreni di coltura microbiologici selettivi attraverso il metodo per piastramento superficiale. In particolare, sono stati impiegati i seguenti terreni di coltura microbiologici:

- YPD addizionato di cloramfenicolo (YPD + C). Questo terreno di coltura favorisce la crescita e lo sviluppo dei lieviti, microrganismi unicellulari eucarioti ed eterotrofi, che necessitano di una fonte di carbonio per il loro sviluppo. Utilizzando tale terreno, la fonte di carbonio è rappresentata dal destrosio. Sono presenti anche altri nutrienti, quali amminoacidi che vengono forniti dal peptone presente e dall'estratto di lievito. Il cloramfenicolo viene aggiunto al terreno YPD per renderlo selettivo, perché è un antibiotico e quindi inibisce lo sviluppo dei batteri;
- De Man, Rogosa e Sharpe addizionato di cicloesimide (MRS + C). Il terreno di coltura MRS favorisce lo sviluppo dei batteri lattici, soprattutto dei batteri lattici appartenenti al genere *Lactobacillus*. Tale terreno è costituito da diverse fonti azotate, come digerito enzimatico di caseina, estratto di lievito ed estratto di carne. La fonte di carbonio è rappresentata dal glucosio. Inoltre, sono presenti alcuni micronutrienti, quali manganese fosfato, magnesio e poliossietilensorbitano monooleato che stimolano la crescita dei batteri lattici. Il terreno MRS contiene agenti selettivi, come citrato di sodio e solfato di ammonio che permettono la crescita solo dei batteri lattici e non quella di altri microrganismi. Inoltre, al terreno MRS è stato aggiunto il cicloesimide, un antibiotico che rende selettivo tale substrato e inibisce la proliferazione dei lieviti;

- Plate Count Agar (PCA). Il terreno PCA è un terreno non selettivo utilizzato per lo sviluppo dei microrganismi aerobi mesofili totali. Tale terreno microbiologico contiene triptone ed estratto di lievito come fonti azotate e glucosio come fonte di carbonio.

Le piastre contenenti il terreno YPD, PCA e MRS sono state ottenute per piastramento superficiale, inoculando 0,1 mL delle diluzioni seriali e successivamente spatolando. Le piastre con il terreno YPD e PCA sono state incubate a 30°C per 24-48 ore mentre le piastre di MRS sono state incubate a 37°C per 24 ore. Dopo il periodo di incubazione, la quantificazione dei microrganismi viene effettuata attraverso la conta delle colonie che sono crescite su ogni piastra ed esprimendo poi il risultato in unità formanti colonia (UFC)/g.

6.4 Determinazione del pH

Il pH dei campioni è stato misurato utilizzando come strumento un pH-metro (Mettler-Toledo, Switzerland), inserendo l'elettrodo di vetro all'interno del falcon da 5 mL che contiene il campione da analizzare. Per ogni campione sono state effettuate 3 letture ogni 24 ore (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h).

6.5 Analisi del contenuto peptidico e proteico

6.5.1 Estrazione delle proteine dalle farine di legumi

L'estrazione delle proteine dalla miscela di farina di ceci e acqua immediatamente dopo la produzione e al termine dell'incubazione è stata effettuata utilizzando una soluzione tampone Tris-base 50 mM con pH 8,5 a temperatura ambiente con un rapporto 1:10 m/V (massa/volume) tra campione secco e solvente. Quindi, nel caso della farina di ceci, 1 g di campione, contenente 0,333 g di acqua, è stato estratto con

3,333 mL di soluzione tampone. Questa operazione è stata effettuata all'interno di un falcon da 15 mL. A questo punto, i falcon sono stati posti in agitazione per un'ora in modo tale che il prodotto si solubilizzasse e l'estrazione potesse avvenire. Successivamente, i falcon sono stati sottoposti a centrifugazione a 15000 rpm per 10 minuti. Dopo la centrifugazione, il surnatante, di nostro interesse, è stato separato dal precipitato. Il surnatante è stato filtrato attraverso filtri Whatman da 0,4 µm e l'estratto ottenuto è stato conservato in congelatore all'interno di falcon a -20°C fino al momento dell'analisi. L'estratto prima di essere sottoposto ad analisi è stato diluito con acqua distillata in rapporto 1:10.

Per la preparazione della soluzione tampone Tris-base è di fondamentale importanza conoscere il suo peso molecolare, pari a 121,14 g/mol. Invece, la molarità della soluzione tampone Tris-base è definita dal protocollo analitico e deve essere pari a 50 mM che corrisponde a 0,05 mol/L. In base al volume di soluzione che si vuole preparare è possibile calcolare la massa di Tris-base che si deve pesare per preparare suddetta soluzione. La formula utilizzata per calcolare la massa in grammi di Tris-base da pesare per preparare la soluzione è la seguente:

$$m_{Tris-base} = M \times V \times MM_{Tris-base}$$

Per preparare 1 L di soluzione tampone Tris-base 50 mM si pesano 6,057 g di Tris-base. Tale massa viene solubilizzata in 700 mL di acqua distillata. La soluzione viene acidificata attraverso l'aggiunta di HCl in modo tale da raggiungere il pH di 8,5. Quando si raggiunge il pH desiderato, la soluzione viene portata a volume all'interno di un matraccio fino al volume di 1 L.

6.5.2 Saggio OPA

Il saggio OPA permette di valutare, determinare e quantificare la quantità di peptidi presenti nei campioni di farina di ceci fermentati da ceppi di microrganismi selezionati e nei campioni di farina di ceci tal quale. Il saggio OPA è un'analisi

spettrofotometrica semplice, sensibile e semplice, che utilizza come reagente l'ο-ftalaldeide per determinare la proteolisi che si verifica nei campioni. L'applicazione del saggio spettrofotometrico OPA per la valutazione del grado di degradazione delle proteine del campione rispecchia l'abilità nel quantificare gli amino gruppi che sono stati rilasciati durante la fermentazione: un vantaggio di tale analisi è quello di determinare con precisione il numero di legami peptidici che sono stati scissi durante l'idrolisi del substrato che contiene proteine. L'idrolisi delle proteine del campione determina la formazione di amino gruppi che reagiscono con l'ο-ftalaldeide e il β-mercaptoetanololo, formando un composto che assorbe alla lunghezza d'onda di 340 nm, come è rappresentato in Figura 40.

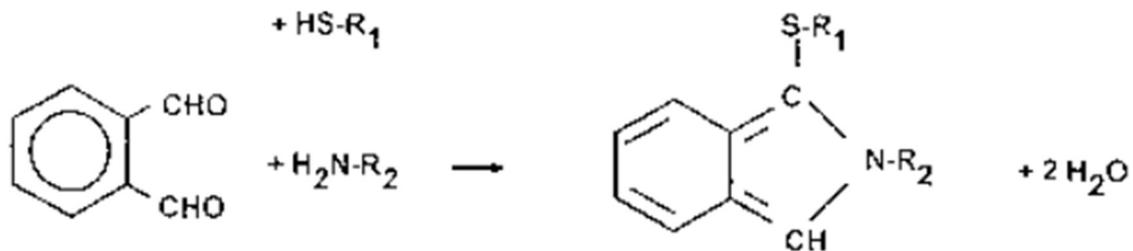


Figura 40: OPA reagisce con l'ammino gruppo per formare un composto che assorbe a 340 nm (Nielsen, Petersen & Dambmann, 2001)

L'assorbanza registrata durante l'analisi spettrofotometrica è simile per tutti gli amino gruppi e non è influenzata dall'ambiente circostante in cui le proteine vengono denaturate dal sodio dodecilsolfato (SDS). Di conseguenza, il background è costante per ogni determinato campione e gli amino gruppi rilasciati durante la proteolisi possono essere quantificati in maniera facile e accurata. L'inclusione del sodio dodecilsolfato nell'analisi favorisce la conclusione dell'idrolisi delle proteine e completa la reazione degli amino gruppi. Il saggio OPA è un'analisi accurata dato che determina tutti i prodotti che derivano dalla degradazione delle proteine.

L'analisi OPA viene effettuata in doppio sul campione di controllo immediatamente dopo la formulazione (0 h) e sui campioni ottenuti dopo 24 ore di incubazione con i

bacilli, 48 ore di fermentazione i batteri lattici e i lieviti FB2 e CRB1, e 72 ore di incubazione con i restanti lieviti selezionati.

Come prima operazione, è necessario preparare il reagente OPA liquido: per la sua preparazione sono stati pesati 25 mL di sodio tetraborato 100 mM, 2,5 mL di sodio dodecilsolfato (SDS) al 20%, 100 μ L di β -mercaptoetanolo e 1 mL di metanolo in cui sono stati sciolti 40 mL di polvere OPA. Dopo la miscelazione e l'omogenizzazione di tutti i reagenti, la soluzione ottenuta viene portata ad un volume di 50 mL con acqua distillata. Il reagente OPA pronto viene posto a 37°C prima di essere utilizzato.

I campioni di farina di ceci estratti sono stati diluiti 1:10 con acqua distillata.

A questo punto, in ogni cuvetta sono stati inseriti 950 μ L di reagente OPA e 50 μ L di campione. Le cuvette sono state agitate con un'ansa per fare in modo che le due parti si mescolassero. Successivamente, tali cuvette sono state poste al buio per due minuti a temperatura ambiente ed infine è stata letta e registrata l'assorbanza a 340 nm, utilizzando come strumento lo spettrofotometro (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Giappone). Il tempo di reazione in questo saggio è molto breve ed è necessario un solo reagente (reagente OPA preparata precedentemente) per inibire le attività enzimatiche e sviluppare il colore di reazione che permette di registrare l'assorbanza a 340 nm.

Per determinare la concentrazione di peptidi presenti nei campioni di farina di ceci fermentata è necessario costruire una retta di taratura/calibrazione con un amminoacido, nello specifico la serina, utilizzando varie concentrazioni: sono state preparate soluzioni diluite di serina standard a 0,01 mg/mL - 0,05 mg/mL - 0,1 mg/mL - 0,5 mg/mL - 1 mg/mL - 1,5 mg/mL. È stata scelta la serina come standard per la costruzione della retta di taratura dato che generalmente essa mostra una risposta molto simile alla media di quelle degli amminoacidi (Nielsen, Petersen & Dambmann, 2001). La curva di taratura presenta sull'asse delle ascisse la concentrazione di serina in mg/mL e sull'asse delle ordinate l'assorbanza a 340 nm.

Attraverso l'equazione della curva di taratura della serina standard è stato possibile calcolare la concentrazione dei peptidi presenti nei campioni fermentati di farina di ceci, espresso in mg/mL, applicando la seguente equazione:

$$\text{Concentrazione di peptidi} = \frac{Abs_{\text{campione}} - a}{b}$$

Dove Abs_{campione} è l'assorbanza del campione registrata a 340 nm, a e b sono i coefficienti della retta di taratura costruita con le varie concentrazioni di serina standard.

6.5.3 Saggio Bradford

La concentrazione proteica del campione (farina di ceci fermentata) è stata determinata e quantificata attraverso l'applicazione del saggio Bradford.

L'analisi Bradford è un metodo veloce, rapido ed affidabile, basato sulla colorazione del campione contenente proteine grazie all'utilizzo del reagente Bradford. Il reagente passa da una colorazione rossa a una colorazione blu nel momento in cui si lega alle proteine. Il saggio Bradford è un metodo spettrofotometrico, nel quale viene misurata e registrata l'assorbanza della soluzione a 595 nm. Infine, il contenuto proteico del campione viene calcolato attraverso l'estrapolazione della curva di taratura, la quale è stata preparata utilizzando albumina di siero bovino (BSA), e viene espresso in mg/mL.

Il saggio Bradford è stato svolto sui campioni di controllo immediatamente dopo la formulazione (0 h) e sui campioni ottenuti dopo 24 ore di incubazione con bacilli, 48 ore di fermentazione con batteri lattici e lieviti FB2 e CRB1, e 72 ore di incubazione con i restanti lieviti selezionati.

La prima operazione prevista dal saggio Bradford è la costruzione della retta di taratura con diverse concentrazioni della soluzione di albumina di siero bovino (BSA). Le soluzioni diluite di albumina di siero bovino devono avere una

concentrazione rappresentativa della soluzione da testare. Si prepara una soluzione madre stock di albumina di siero bovino, pesando 20 mg di SBA e diluendoli in 10 mL. In questo modo viene preparata la soluzione a concentrazione 2 mg/mL. A questo punto si procede con le diluzioni della soluzione per preparare le soluzioni diluite a concentrazioni rispettivamente di 1,0 – 0,8 – 0,5 – 0,3 – 0,2 – 0,1 mg/mL. Le soluzioni di albumina di siero bovino vengono analizzate allo spettrofotometro a 595 nm e le assorbanze registrate sono utilizzate per la costruzione della curva di taratura, ponendo sull'asse delle ascisse la concentrazione dell'albumina di siero bovino espressa in mg/mL e sull'asse delle ordinate i valori di assorbanza.

Durante l'analisi bisogna preparare il reagente Bradford. Il reagente Bradford (Bio-Rad Proteine Assay Dye Reagent Concentrate) è stato preparato seguendo le istruzioni riportate sul contenitore. Il volume di reagente da preparare viene scelto in base al numero di campioni e alle concentrazioni dello standard che si hanno, tenendo conto che serviranno 2,5 mL di reagente per ogni cuvetta con campione o standard secondo quanto indicato nell'etichetta della soluzione. Per la preparazione del reagente Bradford si diluisce 1 parte del reagente concentrato con 4 parti di acqua distillata. Il reagente diluito viene posto in una bottiglia coperta con alluminio e successivamente è stato filtrato con filtri Whatman da 0,25 µm in modo tale da eliminare eventuali particelle. Il reagente Bradford ottenuto può essere conservato a temperatura ambiente e può essere utilizzato per circa 2 settimane.

I campioni liquidi estratti con Tris-Base, come descritto nel protocollo di estrazione delle proteine da farine di legumi, vengono diluiti di un fattore 1:10 con acqua distillata. Si prelevano 100 µL di ogni campione e concentrazione dello standard BSA e si pongono all'interno di un falcon. Successivamente si aggiungono 5 mL di reagente Bradford preparato e si vortexa. In alternativa, si possono inserire 50 µL di campione o standard BSA in cuvetta e si aggiungono direttamente all'interno della cuvetta 2,5 mL di reagente Bradford preparato e mixare.

Le cuvette vengono riposte al buio per almeno 5 minuti a temperatura ambiente. L'assorbanza aumenta con il passare del tempo e per questo motivo i campioni non dovrebbero essere incubati per più di un'ora.

A questo punto le cuvette vengono inserite all'interno dello spettrofotometro per la lettura spettrofotometrica dell'assorbanza a 595 nm.

Per quantificare il contenuto proteico del campione, espresso in mg/mL, si effettua l'estrapolazione dalla retta di taratura e si utilizza la seguente formula:

$$\text{Concentrazione proteica} = \frac{\text{Abs}_{\text{campione}} - a}{b}$$

Dove $\text{Abs}_{\text{campione}}$ è l'assorbanza del campione registrata a 595 nm, a e b sono i coefficienti della retta di taratura costruita con le varie concentrazioni di albumina di siero bovino.

6.5.4 Saggio SDS-PAGE

Il saggio SDS-PAGE è una procedura analitica che ha lo scopo di valutare in maniera qualitativa/semi-quantitativa il grado di proteolisi subito dalle proteine della farina di ceci che si verifica durante il processo biotecnologico fermentativo. Quindi, la SDS-PAGE è un'analisi che permette di valutare la capacità proteolitica dei ceppi microbici impiegati durante la fermentazione della farina di ceci.

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE) è un'analisi rapida che permette di analizzare le molecole derivanti dall'idrolisi delle proteine, quali amminoacidi e peptidi. Quindi, la SDS-PAGE è un saggio utilizzato per identificare e separare il peso molecolare delle subunità proteiche derivanti dalla degradazione delle proteine e per valutare i cambiamenti nelle proteine della farina di ceci indotti dalla fermentazione (Liu *et al.*, 2023).

Il principio su cui si basa l'analisi elettroforetica SDS-PAGE è l'attività denaturante del sodio dodecilsolfato. Esso è in grado di interagire con le proteine in un rapporto

costante di 1,4 g di SDS ogni grammo di proteina. La separazione dei frammenti proteici avviene sfruttando la differenza tra i pesi molecolari, dato che il rapporto massa/carica per ogni proteina denaturata con SDS rimane costante.

Quando si applica un campo elettrico di corrente continua ad una soluzione a pH noto che contiene proteine, esse si muoveranno verso uno dei due elettrodi, ognuna con direzione e velocità determinate dalle proprie cariche superficiali e dimensioni. Nel caso della SDS-PAGE, tutte le proteine si muovono verso l'elettrodo positivo in virtù della carica netta negativa fornita dal SDS. Questo saggio permette di separare attraverso l'utilizzo di un campo elettrico le proteine dopo averle denaturate e caricate negativamente con l'SDS, usando come supporto un setaccio tridimensionale di acrilammide polimerizzata. L'SDS è un detergente ionico che conferisce carica negativa in media ogni 2 residui di amminoacido. Le proteine trattate con SDS vengono denaturate.

Il saggio SDS-PAGE è stato effettuato sui campioni di controllo immediatamente dopo la formulazione (0 h) e sui campioni ottenuti dopo 24 ore di incubazione con i bacilli, 48 ore di fermentazione con i batteri lattici e lieviti FB2 e CRB1, e 72 ore di incubazione con i restanti lieviti selezionati.

L'analisi SDS-PAGE sulla farina di ceci fermentata è stata svolta seguendo i protocolli riportati da Sofi *et al.* (2020) e Gamage Thushan Sanjeeva (2008) con alcune modifiche riportate in seguito.

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecilsolfato dei campioni di ceci è stata effettuata con il metodo Laemmli. Sono stati pesati 60 mg di ogni campione di farina di ceci fermentata a cui sono stati aggiunti 210 μ L di acqua distillata filtrata e 250 μ L di Laemmli Buffer 2X addizionati di β -mercaptoetanololo in concentrazione come indicato sulla confezione di Laemmli Buffer 2X.

Le concentrazioni di acqua distillata filtrata e Laemmli Buffer 2X usate sono state calcolate in base al contenuto di acqua presente nei campioni in esame. I campioni di farina di ceci sono composti da un rapporto farina: acqua pari a 1:2. Pesando 60

mg di campione avremmo 20 mg di farina di ceci e 20 mg di acqua. Per questo motivo vengono aggiunti solo 210 μL di acqua distillata filtrata al campione e non 250 μL come previsto per una diluizione 1:1 del Laemmli Buffer 2X.

I campioni così preparati sono stati bolliti per 5 minuti e successivamente centrifugati a 13600 rpm per 10 minuti.

A questo punto, i campioni sono stati caricati in gel di poliacrilammide in quantità pari a 20 μL e sono fatti correre in gel a una corrente costante di 50 mA per 30 minuti e poi ad una corrente di 90 mA fino a che le bande blu non arrivano in fondo al gel. Il Marker utilizzato è stato Precision Plus Protein All Blue Standards ed è stato caricato in quantità di 5 μL (o 10 μL).

Terminata la corsa delle bande blu, il gel viene prelevato dalla cella e viene posto in un contenitore contenente il colorante blu di Coomassie, in modo tale da colorare il gel. Dopo la colorazione, il gel viene decolorato con Destaining Buffer per rimuovere il colorante che non si era legato ai frammenti proteici.

Infine, il gel decolorato è stato visualizzato attraverso l'utilizzo di uno scanner.

6.6 Analisi del profilo in molecole volatili

L'analisi del profilo in molecole volatili è stata effettuata sul campione di controllo non inoculato e sui campioni inoculati dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione per i campioni inoculati rispettivamente con i bacilli, i batteri lattici e i lieviti.

L'analisi del profilo in composti volatili prevede l'utilizzo del gascromatografo come strumento, al quale è stato accoppiato lo spettrometro di massa come rivelatore. L'estrazione delle molecole volatili è stata effettuata attraverso la tecnica di microestrazione in fase solida (SPME-GC-MS).

All'interno della vial sono stati posti 3 g di campione e successivamente sono stati aggiunti 3 μL di standard interno che in questo caso era il 4-metil-2-pentanololo ad una concentrazione iniziale di 1000 ppm.

Le vials contenenti i campioni sono state riscaldate in un bagno a 45°C per 5 minuti. Dopodiché, la fibra (SPME Carboxen/PDMS, 85 µm, Stalleflex Supelco, Bellefonte, PA, USA) è stata introdotta ed esposta nello spazio di testa della vial per 20 minuti, mantenendo il campione alla stessa temperatura. Le molecole volatili adsorbite dalla fibra sono state desorbite nell'iniettore (250°C) del gascromatografo per 5 minuti.

L'analisi è stata eseguita utilizzando il gascromatografo Agilent Technology 7890 N, Network GC System combinato con lo spettrometro di massa HP 5975C con rivelatore selettivo di massa di rete (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). La colonna gascromatografica Chrompack CP-Wax 52 CB (Chrompack, Middelburg, Olanda) utilizzata possiede le seguenti caratteristiche: lunghezza di 50 m e diametro interno di 0,32 mm. L'analisi gascromatografica è stata effettuata in programmata, impostata nel seguente modo: temperatura di iniezione 50°C per 1 minuto, aumento di 4,5°C/minuto fino a 65°C, incremento di 10°C/minuti fino a 230°C e permanenza a 230°C. La temperatura dell'iniettore, dell'interfaccia e della sorgente ionica erano rispettivamente di 250, 250 e 230°C. Il gas carrier utilizzato era l'elio con un flusso di 1,0 mL/minuto. La frammentazione ionica delle molecole in uscita dalla colonna si è verificata con un impatto elettrico a 70 eV.

I composti volatili sono stati identificati attraverso l'uso del computer matching dei dati spettrali di massa con quelli dei composti contenuti nella libreria NIST (NIST/EPA/NIH Mass spectral Library, Version 1.6, United States of America) del 2011 e WILEY (sesta edizione, United States of America) del 1995.

7. RISULTATI E DISCUSSIONE

7.1 Analisi microbiologiche

Durante le 96 ore di incubazione è stato monitorato e registrato, ogni 24 ore, il carico microbico delle miscele di farina di ceci e acqua per quanto riguarda la crescita dei lieviti, batteri lattici e bacilli.

In Figura 41 è evidenziato il carico microbico dei ceppi di lievito inoculati nella miscela di farina di ceci e acqua durante le 96 ore di incubazione, a cadenza di 24 ore.

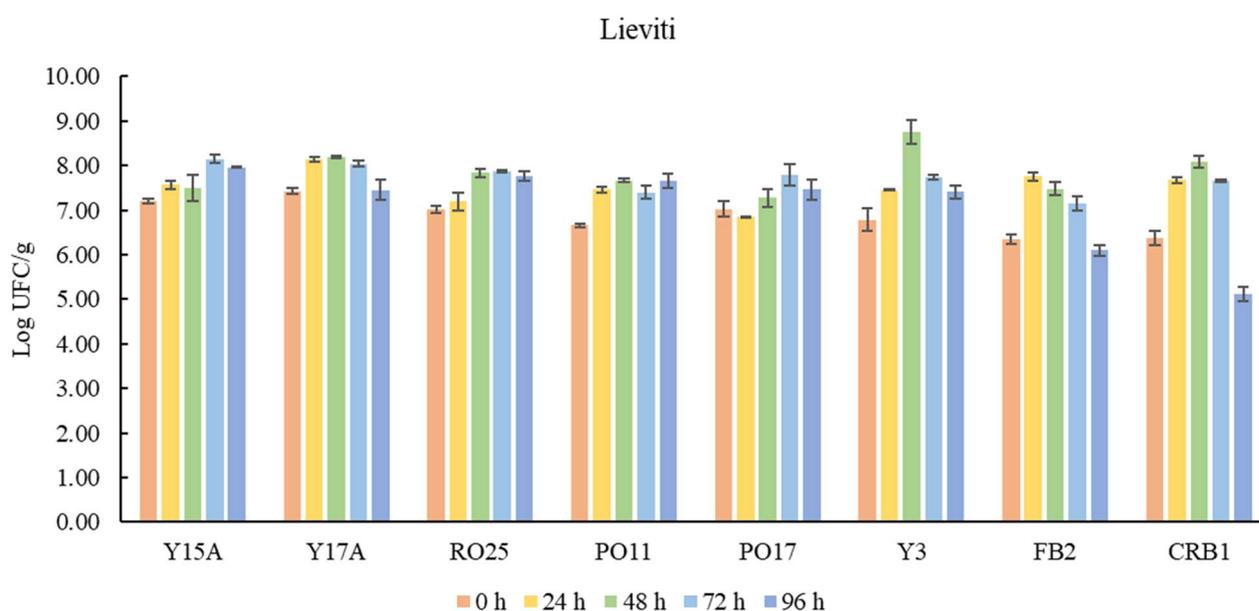


Figura 41: Carico microbico, espresso in Log UFC/g, dei ceppi di lievito inoculati nella miscela di farina di ceci e acqua, immediatamente dopo l'inoculo (0h) e dopo 24, 48, 72 e 96 ore di incubazione.

I ceppi di lieviti di *Yarrowia lipolytica* e *Debaryomyces hansenii*, dopo essere stati inoculati nelle miscele di farina di ceci e acqua, sono stati incubati a temperatura ambiente in beuta e in agitazione. La scelta di queste condizioni di crescita è stata influenzata dal metabolismo strettamente aerobio di tali lieviti inoculati. Infatti, *Debaryomyces hansenii* è un microrganismo anaerobio facoltativo (Vigliotta *et al.*, 2007), mentre *Yarrowia lipolytica* è un lievito strettamente aerobio che richiede alte concentrazioni di ossigeno per una crescita omogenea (Nicaud, 2012). I ceppi di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, dopo essere stati inoculati nelle miscele di farina di ceci e acqua, sono stati incubati a 30°C e in presenza di ridotto contenuto di ossigeno. La scelta di questa condizione di crescita è stata dettata dalla temperatura ottimale di crescita compresa tra 30°C e 35°C e dal metabolismo anaerobio facoltativo, caratterizzato da un doppio metabolismo: ossidativo e fermentativo (Madigan *et al.*, 2022).

Nella miscela di farina di ceci e acqua, tutti i ceppi di lieviti erano stati inoculati ad una concentrazione iniziale pari a 7 Log UFC/g. Durante le 96 ore di incubazione, tutti i lieviti sono stati in grado di sviluppare nei campioni, raggiungendo la massima concentrazione fra le 48 e le 72 ore di incubazione con valori intorno agli 8 Log UFC/g. I ceppi di lievito di *Yarrowia lipolytica* e *Debaryomyces hansenii* sono cresciuti all'interno delle miscele, raggiungendo valori massimi a 72 ore di incubazione. In particolare, i ceppi di *Yarrowia lipolytica* Y15A e Y17A sono i microrganismi che hanno raggiunto i carichi microbici maggiori a 72 ore, rispettivamente pari a 8,15 Log UFC/g e 8,04 Log UFC/g.

I ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* FB2 e CRB1 hanno evidenziato una cinetica di crescita microbica più rapida rispetto agli altri ceppi di lievito di *Yarrowia lipolytica* e *Debaryomyces hansenii*, raggiungendo valori massimi di carico microbico a 48 ore pari rispettivamente a 7,48 Log UFC/g e 8,09 Log UFC/g.

Infine, i ceppi di *Yarrowia lipolytica* e *Debaryomyces hansenii* fra le 72 e 96 ore di incubazione sono entrati in fase stazionaria e successivamente in fase di morte.

Infatti, in quelle 24 ore è possibile osservare il decremento del numero di microrganismi, dovuto all'esaurimento del nutriente limitante all'interno dei campioni e l'accumulo di composti tossici per la cellula. Invece, per quanto riguarda i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*, il declino della crescita microbica si è assistito fra le 48 e le 96 ore, dato che il loro sviluppo microbico era stato più rapido rispetto a quello degli altri lieviti.

I lattobacilli e i lattococchi inoculati nella miscela di farina di ceci e acqua hanno evidenziato una curva di crescita microbica simile a quella dei lieviti, ma il loro sviluppo microbico è stato più repentino.

In Figura 42 è evidenziato il carico microbico dei ceppi di batteri lattici inoculati nella miscela di farina di ceci e acqua durante le 96 ore di incubazione, a cadenza di 24 ore.

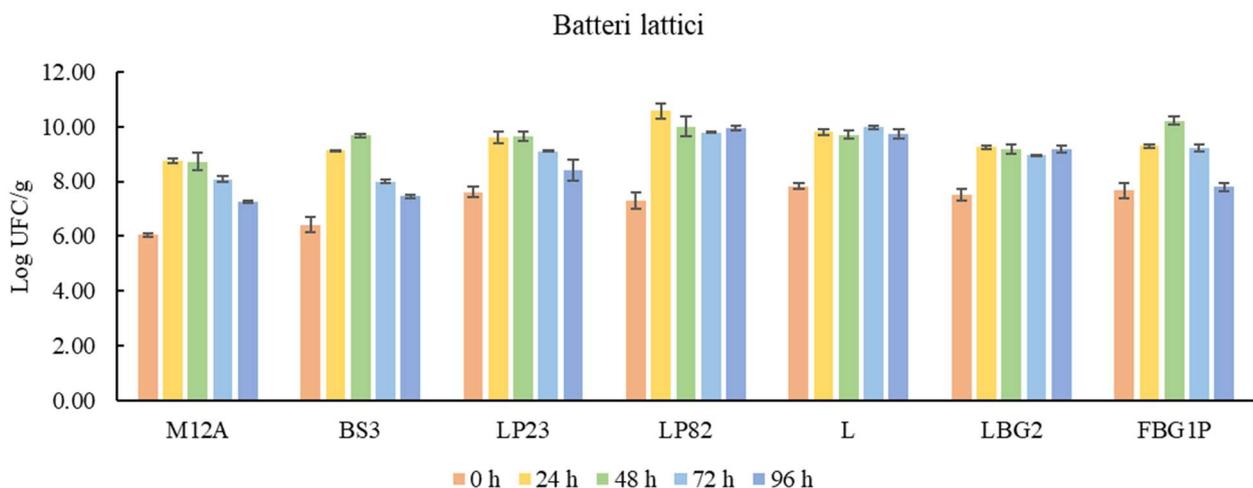


Figura 42: Carico microbico, espresso in Log UFC/g, dei ceppi di batteri lattici inoculati nella miscela di farina di ceci e acqua, immediatamente dopo l'inoculo (0h) e dopo 24, 48, 72 e 96 ore di fermentazione a 30 °C.

Inizialmente, le miscele di farina di ceci e acqua erano state inoculate con i batteri lattici in un intervallo di concentrazione compreso tra 6,04 Log UFC/g per il ceppo di *Lactobacillus sakei* M12A e 7,83 Log UFC/g per il ceppo di *Lactobacillus paracasei* L.

Indipendentemente dalla concentrazione dell'inoculo di partenza, tutti i ceppi di batteri lattici si sono sviluppati in maniera omogenea, come si può osservare dalla Figura 42. La massima crescita microbica dei batteri lattici si è registrata a 48 ore di incubazione, raggiungendo valori di carico microbico compresi tra 8,72 Log UFC/g e 10,21 Log UFC/g. In particolare, il ceppo di *Lactiplantibacillus plantarum* LP82 ha raggiunto il massimo sviluppo dopo 24 ore di incubazione, raggiungendo un carico microbico pari a 10,57 Log UFC/g. Invece, il ceppo di *Lactococcus lactis* FBG1P ha raggiunto il massimo sviluppo dopo 48 ore di incubazione con una concentrazione di 10,21 Log UFC/g.

Il batterio lattico *Latilactobacillus sakei* M12A è stato inoculato in minor concentrazione, pari a 6,04 Log UFC/g, tuttavia, è stato in grado di raggiungere il massimo sviluppo microbico dopo 24 ore di incubazione con una concentrazione di 8,76 Log UFC/g. Indipendentemente dalla concentrazione dell'inoculo iniziale, la crescita microbica di tale ceppo era simile a quella degli altri ceppi di batteri lattici inoculati.

Infine, tutti i ceppi di batteri lattici dalle 48 alle 96 ore di incubazione sono entrati in fase stazionaria e successivamente in fase di morte, tranne per i ceppi di *Lactiplantibacillus plantarum* LP82, *Lactobacillus paracasei* L e *Lactococcus lactis* LBG2 che sono rimasti in fase stazionaria. Infatti, dalla Figura 42 è possibile osservare la diminuzione del carico microbico dei ceppi M12A, BS3, LP23 e FBG1P, mentre per i ceppi LP82, L e LBG2 il carico microbico è rimasto costante dalle 48 alle 96 ore di incubazione.

La curva di crescita dei ceppi appartenenti al genere *Bacillus* è stata monitorata e registrata attraverso l'utilizzo del terreno non selettivo PCA, mediante il conteggio delle colonie cellulari che avevano la morfologia tipica dei bacilli inoculati.

In Figura 43 si può osservare il carico microbico dei ceppi di bacilli inoculati nella miscela di farina di ceci e acqua durante le 96 ore di incubazione, a cadenza di 24 ore.

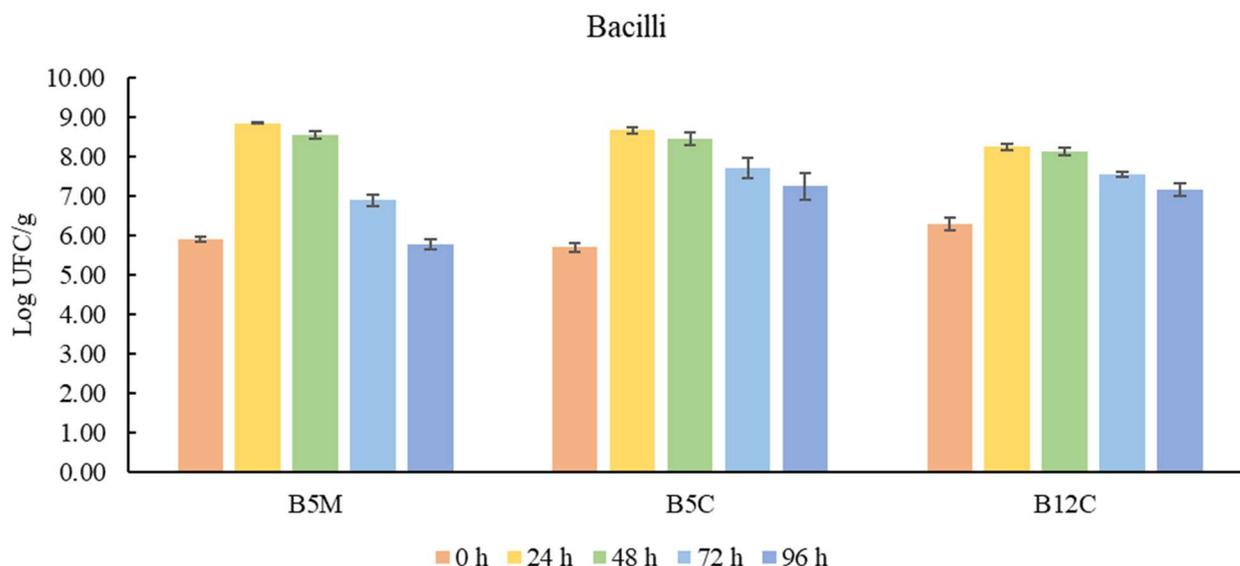


Figura 43: Carico microbico, espresso in Log UFC/g, dei bacilli inoculati nella miscela di farina di ceci e acqua, immediatamente dopo l'inoculo (0h) e dopo 24, 48, 72 e 96 ore di incubazione a 25°C in agitazione.

Il ceppo di *Bacillus amyloliquefaciens* B5M e i ceppi di *Bacillus subtilis* B5C e B12C sono stati inoculati nella miscela di farina di ceci e acqua con una concentrazione iniziale pari circa a 6 Log UFC/g. I campioni inoculati con i ceppi di *Bacillus* sono stati incubati a temperatura ambiente all'interno di beute in agitazione, in modo tale da favorire il loro metabolismo aerobio e la loro crescita.

La massima crescita microbica dei bacilli è stata registrata a 24 ore di incubazione, raggiungendo valori di carico microbico compresi tra 8,24 Log UFC/g per il ceppo di *Bacillus subtilis* B12C e 8,85 Log UFC/g per il ceppo di *Bacillus amyloliquefaciens* B5M.

Infine, dalle 24 ore di incubazione fino alle 96 si è assistito a un decremento del carico microbico dei ceppi di *Bacillus* inoculati a causa dell'esaurimento dei nutrienti e dell'accumulo di metaboliti tossici per la cellula.

7.2 Variazione di pH

Durante le 96 ore di incubazione è stato monitorata e registrata, ogni 24 ore, la variazione di pH delle miscele di farina di ceci e acqua inoculate con i microrganismi selezionati.

In Figura 44 è rappresentata la cinetica di acidificazione delle miscele di farina di ceci inoculate con i microrganismi selezionati durante le 96 ore di incubazione, a cadenza di 24 ore.

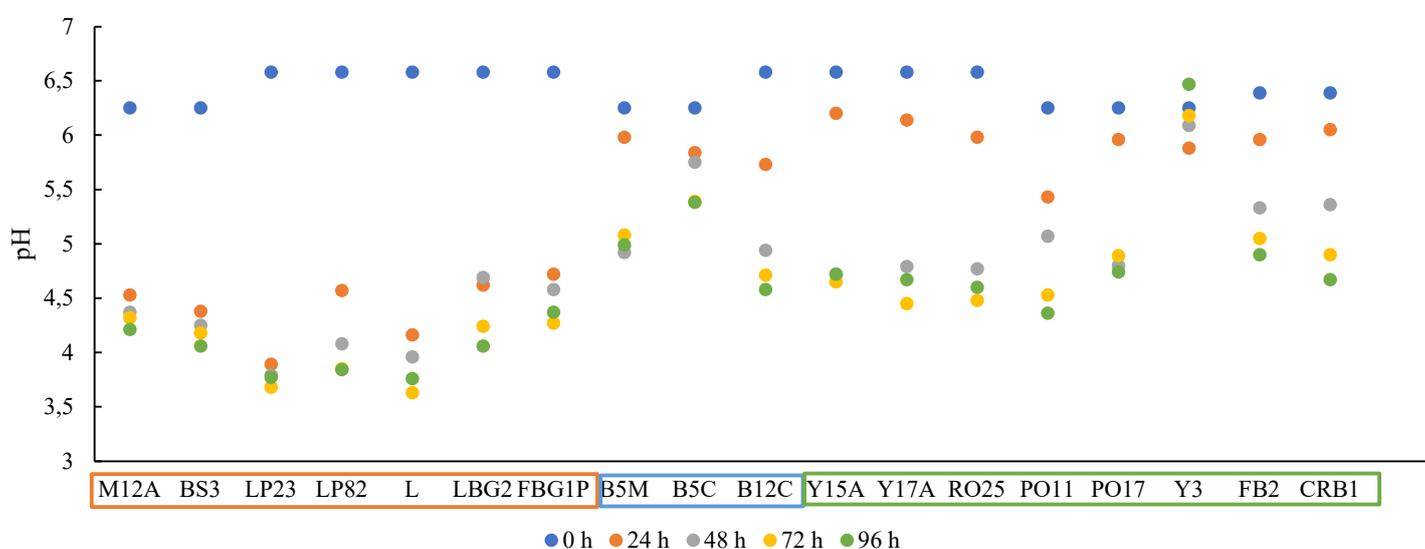


Figura 44: Cinetica di acidificazione delle miscele di farina di ceci inoculate con i microrganismi selezionati, quali batteri lattici (riquadro arancione), bacilli (riquadro blu) e lieviti (riquadro verde). I valori di pH sono stati rilevati durante l'incubazione dei campioni con cadenza regolare di 24 ore (0, 24, 48, 72 e 96 ore).

Il grafico riguardante la cinetica di acidificazione evidenzia che durante la crescita dei microrganismi all'interno dei campioni di farina di ceci e acqua si è assistito ad una variazione di pH ceppo dipendente.

Infatti, i batteri lattici hanno determinato un decremento maggiore del pH rispetto ai bacilli e ai lieviti. In particolare, i ceppi di *Lactiplantibacillus plantarum* LP23, *Lactobacillus paracasei* L e *Lactiplantibacillus plantarum* LP82 hanno determinato una rapida acidificazione dei campioni, raggiungendo valori di pH dopo 48 ore di incubazione rispettivamente di 3,79, 3,96 e 4,08.

Come si può osservare dal grafico, i ceppi di *Bacillus* hanno determinato un lieve abbassamento del pH delle miscele, passando da valori iniziali di pH di circa 6,3 a valori di circa 5,8 dopo 24 ore di incubazione. In particolare, il ceppo di *Bacillus subtilis* B12C ha determinato una maggiore acidificazione dei campioni, raggiungendo valori pari a 4,58 dopo 96 ore di incubazione. Al contrario, il ceppo di *Bacillus subtilis* B5C ha determinato un lieve abbassamento del pH, raggiungendo valori pari a 5,38 dopo 96 ore di incubazione.

Per quanto riguarda i lieviti, la cinetica di acidificazione dei campioni è strettamente correlata al ceppo di lievito preso in esame e alle condizioni di incubazione. Tutti i ceppi di lievito hanno determinato un abbassamento del pH durante le 96 ore di incubazione, partendo da valori iniziali di circa 6,4 e raggiungendo valori di circa 4,6 dopo 72 ore di incubazione, fatta eccezione per il ceppo di *Yarrowia lipolytica* Y3. Infatti, il ceppo di *Yarrowia lipolytica* Y3 ha registrato un aumento del pH durante le 96 ore di fermentazione, raggiungendo valori finali pari a 6,47 rispetto al valore iniziale di 6,25. In particolare, il ceppo *Debaryomyces hansenii* Y17A ha determinato una maggiore acidificazione dei campioni, raggiungendo valori pari a 4,45 dopo 72 ore di incubazione. I ceppi di *Yarrowia lipolytica* e *Debaryomyces hansenii* erano stati incubati in condizioni di aerobiosi a temperatura ambiente. In queste condizioni, i ceppi di lievito non effettuano la fermentazione, ma respirano per via ossidativa. D'altra parte, i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* erano stati incubati in condizioni di anaerobiosi a 30°C. In presenza di un ridotto contenuto di ossigeno, *Saccharomyces cerevisiae* predilige la via della fermentazione.

Sulla base dei risultati ottenuti dalle analisi microbiologiche e dalle cinetiche di acidificazione dei campioni inoculati con i microrganismi selezionati è stato possibile selezionare i tempi necessari per lo svolgimento e il completamento della fermentazione da parte dei diversi ceppi microbici. Nello specifico, i ceppi di lieviti di *Yarrowia lipolytica* e *Debaryomyces hansenii* richiedevano 72 ore di incubazione per raggiungere la fase stazionaria, mentre i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* necessitavano solo di 48 ore di incubazione. I batteri lattici richiedevano 48 ore di

incubazione per raggiungere la fase stazionaria di crescita, mentre i bacilli avevano bisogno di sole 24 ore di incubazione. Di conseguenza, basandosi sulle informazioni ottenute, le analisi successive di quantificazione del contenuto proteico e peptidico e del profilo in molecole volatili sono state effettuate sui campioni fermentati per 24, 48 e 72 ore rispettivamente per i bacilli, batteri lattici e lieviti, fatta eccezione per i ceppi di lievito di *Saccharomyces cerevisiae*, che sono stati analizzati dopo 48 ore di fermentazione.

7.3 Quantificazione del contenuto peptidico e proteico

I campioni di farina di ceci e acqua inoculati con bacilli, batteri lattici e lieviti, incubati rispettivamente per 24, 48 e 72 ore, fatta eccezione per i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* che furono selezionati a 48 ore, sono stati analizzati per quantificare il loro contenuto peptidico. I campioni inoculati sono stati confrontati con un campione di controllo non inoculato e analizzato immediatamente dopo la formulazione (0 h).

La quantificazione del contenuto peptidico dei campioni di farina di ceci fermentati è stata effettuata attraverso il saggio spettrofotometrico OPA.

In Figura 45 sono riportati i risultati, espressi come mg di serina equivalente/g di campione, del contenuto peptidico dei campioni di farina di ceci e acqua inoculati con i microrganismi selezionati.

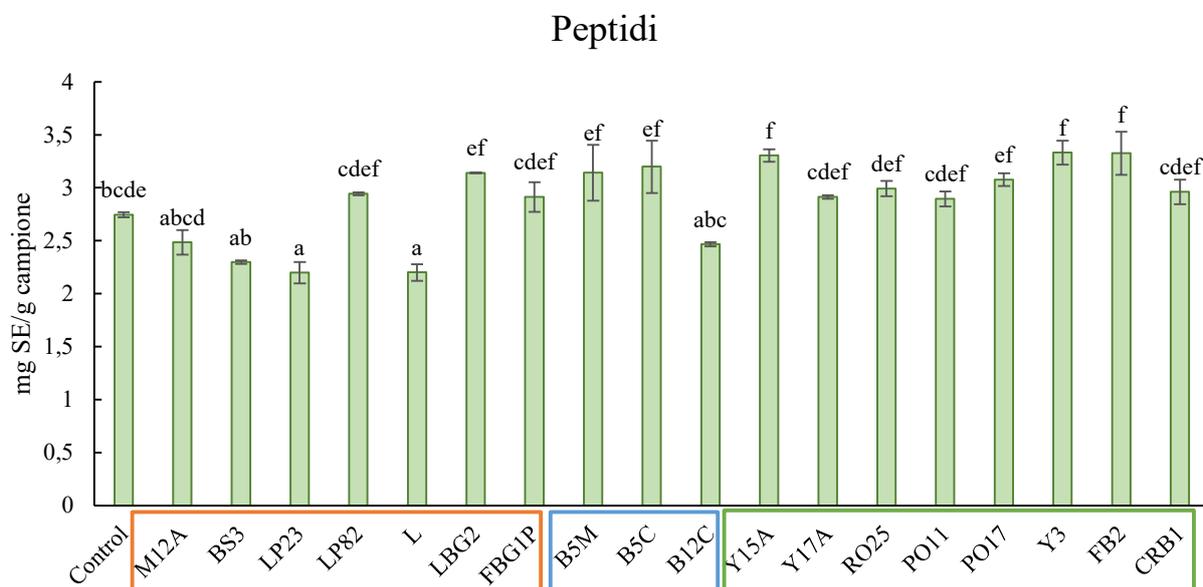


Figura 45: Concentrazione di peptidi, espressa in mg di Serina equivalente per g di campione (mg SE/g). L'analisi è stata svolta sul campione di controllo immediatamente dopo la formulazione (0h) e sui campioni ottenuti dopo 24 ore di incubazione con bacilli (riquadro blu), 48 ore di fermentazione con batteri lattici (riquadro arancione) e lieviti FB2 e CRB1 (riquadro verde), e 72 ore di incubazione con i restanti lieviti selezionati (riquadro verde). Lettere diverse rappresentano valori significativamente diversi ($p < 0.05$) fra tutti i campioni.

Dai risultati della Figura 45 si può osservare che il contenuto peptidico dei campioni inoculati dipendeva dai ceppi microbici utilizzati nella sperimentazione.

Infatti, i campioni di farina di ceci e acqua in cui erano stato inoculati i ceppi di batteri lattici, dopo 48 ore di incubazione, avevano subito un significativo decremento del contenuto in peptidi rispetto al campione di controllo. In particolare, tra i batteri lattici, i ceppi di *Lactiplantibacillus plantarum* LP23 e *Lactobacillus paracasei* L hanno evidenziato un significativo decremento del contenuto peptidico dei campioni inoculati rispetto al campione di controllo, raggiungendo concentrazioni rispettivamente pari a 2,2 e 2,2 mg serina Eq/g campione. Tuttavia,

tra i batteri lattici fanno eccezione i ceppi LP82, LBG2 e FBG1P. I campioni di farina di ceci inoculati con *Lactiplantibacillus plantarum* LP82, *Lactococcus lactis* LBG2 e *Lactococcus lactis* FBG1P hanno evidenziato un aumento del contenuto in peptidi, anche se non significativo rispetto al campione di controllo. I risultati ottenuti dalla fermentazione di *Lactiplantibacillus plantarum* LP82 sono in linea con quanto riportato da Liu *et al.* (2023), i quali avevano registrato durante la fermentazione della farina di ceci da parte di *Lactiplantibacillus plantarum* un'intensa attività proteolitica e conseguente aumento della concentrazione peptidica della farina di ceci.

Dai risultati dall'analisi OPA è possibile anche osservare che i campioni di farina di ceci e acqua in cui erano stati inoculati i ceppi di *Bacillus*, dopo 24 ore di incubazione, non avevano subito una significativa modificazione. I ceppi di *Bacillus amyloliquifaciens* B5M e *Bacillus subtilis* B5C hanno determinato un aumento del contenuto in peptidi nei campioni, ma non significativo rispetto al campione di controllo. D'altra parte, il ceppo di *Bacillus subtilis* B12C ha determinato una diminuzione del contenuto peptidico nel campione in cui era stato inoculato, anche se non significativo rispetto al controllo. Questi risultati sono in accordo con quanto riportato da Wang *et al.* (2021), i quali avevano evidenziato che la fermentazione dei ceci da parte di *Bacillus subtilis* aveva determinato un aumento del contenuto peptidico, soprattutto dopo 12 ore di fermentazione. Si può quindi dedurre che i bacilli non hanno avuto un grande impatto sulla proteolisi e sull'aumento della concentrazione dei peptidi dei campioni di farina di ceci e acqua fermentati.

Per quanto riguarda i campioni di farina di ceci e acqua inoculati con i ceppi di lievito, dopo 48 ore per i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* e dopo 72 ore per i ceppi di *Yarrowia lipolytica* e *Debaryomyces hansenii*, tutti i campioni hanno evidenziato un aumento del contenuto in peptidi. In particolare, i ceppi di *Debaryomyces hansenii* Y15A, *Yarrowia lipolytica* Y3 e *Saccharomyces cerevisiae* FB2 sono i ceppi che hanno dimostrato un significativo incremento del contenuto peptidico dei campioni in cui erano stati inoculati rispetto al campione di controllo, raggiungendo

concentrazioni rispettivamente di 3,3, 3,3 e 3,3 mg serina Eq/g campione. I risultati ottenuti dal saggio OPA sono in linea con quanto riportato da Groenewald *et al.* (2014), i quali avevano evidenziato l'attività proteolitica di *Yarrowia lipolytica* e il suo possibile utilizzo nella fase di maturazione per la produzione di formaggi e insaccati. Anche per quanto riguarda *Debaryomyces hansenii*, i risultati ottenuti dall'analisi spettrofotometrica sono in linea con le evidenze di Volonterio (2005) che afferma la capacità di tale lievito di produrre proteasi con conseguente idrolisi delle proteine e aumento del contenuto peptidico. Infine, i risultati dell'analisi per quanto riguarda i campioni inoculati con *Saccharomyces cerevisiae* sono in linea con quanto riportato da Aruna *et al.* (2017), i quali hanno dimostrato che durante la fermentazione delle bucce di igname da parte di *Saccharomyces cerevisiae* BY4743 si è assistito ad un incremento del contenuto peptidico di tale materia prima.

I campioni di farina di ceci e acqua fermentati con bacilli, batteri lattici e ceppi di lievito di *Saccharomyces cerevisiae*, e ceppi di lievito di *Yarrowia lipolytica* e *Debaryomyces hansenii* rispettivamente per 24, 48 e 72 ore sono stati analizzati per quantificare il loro contenuto proteico. Il campione di controllo è stato sottoposto all'analisi per la determinazione del contenuto in proteine solubili immediatamente dopo la formulazione (0 h).

La quantificazione del contenuto di proteine solubili dei campioni ottenuti da una miscela di farina di ceci fermentati è stata effettuata attraverso il saggio spettrofotometrico Bradford.

In Figura 46 sono riportati i risultati, espressi come mg di albumina di siero bovino (BSA) equivalenti/g di campione, del contenuto proteico dei campioni di farina di ceci e acqua inoculati con i microrganismi selezionati.

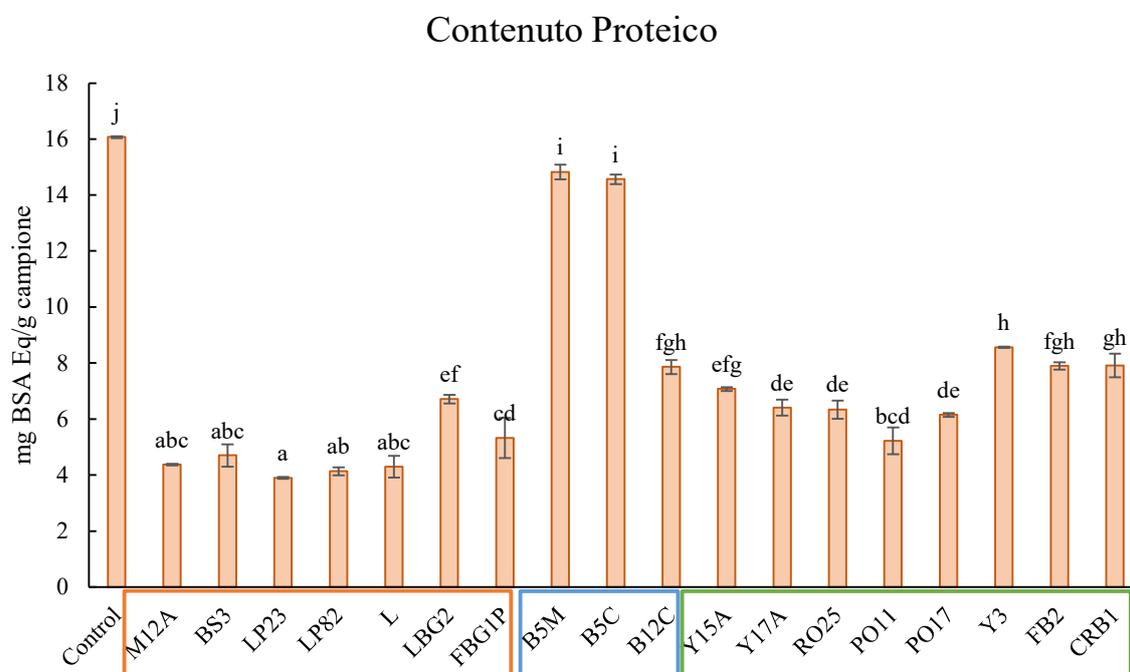


Figura 46: Contenuto proteico, espresso in mg di albumina sierica bovina equivalente per g di campione (mg BSA eq/g). L'analisi è stata svolta sul campione di controllo immediatamente dopo la formulazione (0h) e sui campioni ottenuti dopo 24 ore di incubazione con bacilli (riquadro blu), 48 ore di fermentazione con batteri lattici (riquadro arancione) e lieviti FB2 e CRB1 (riquadro verde), e 72 ore di incubazione con i restanti lieviti selezionati (riquadro verde). Lettere diverse rappresentano valori significativamente diversi ($p < 0.05$) fra tutti i campioni.

Dal saggio spettrofotometrico Bradford è possibile evidenziare che le miscele di farina di ceci e acqua in cui erano stati inoculati i ceppi di bacilli, dopo 24 ore di incubazione, i ceppi di batteri lattici e i ceppi di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, dopo 48 ore di incubazione, e i ceppi di lieviti *Yarrowia lipolytica* e *Debaryomyces hansenii*, dopo 72 ore di incubazione, avevano subito un significativo decremento del contenuto di proteine solubili rispetto al campione di controllo. In particolare, tra i ceppi di batteri lattici *Lactiplantibacillus plantarum* LP23 è il ceppo che ha dimostrato una maggiore riduzione della concentrazione proteica dei campioni in

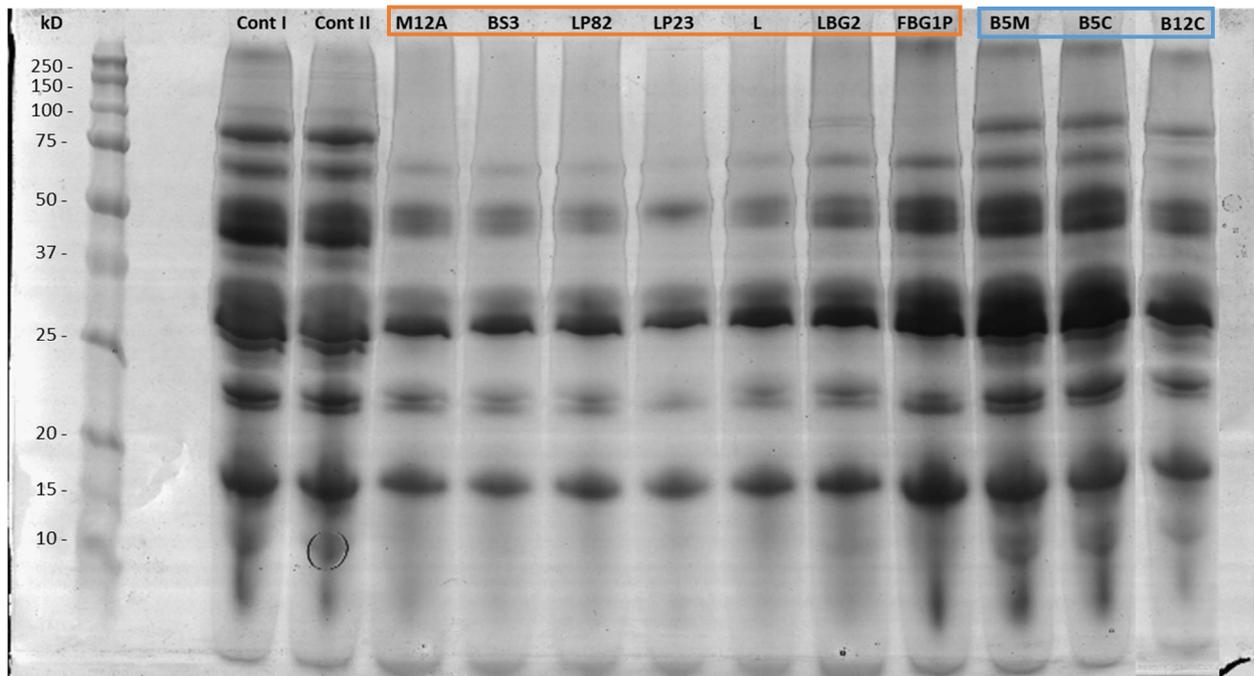
esame, raggiungendo il valore di 3,9 mg BSA Eq/g campione. D'altra parte, tra i ceppi di bacilli *Bacillus subtilis* B12C è il ceppo che ha evidenziato una significativa riduzione del contenuto in proteine solubili dei campioni, raggiungendo una concentrazione pari a 7,9 mg BSA Eq/g campione. Per quanto riguarda i lieviti, il ceppo di *Yarrowia lipolytica* PO11 è il ceppo che ha dimostrato un maggior decremento del contenuto proteico dei campioni fermentati, raggiungendo il valore di 5,2 mg BSA Eq/g campione. Questi risultati sono dovuti non solo dal fatto che alcuni ceppi selezionati e impiegati nello studio hanno dimostrato avere attività proteolitica, ma anche perché tutti i microrganismi per poter crescere necessitano di proteine. Di conseguenza, il consumo delle proteine da parte dei microrganismi per la loro crescita ha determinato una diminuzione del loro contenuto nella farina di ceci fermentata.

Per tutti i ceppi microbici si è assistito ad una diminuzione significativa del contenuto di proteine solubili dei campioni in esame rispetto al campione di controllo, fatta eccezione per i ceppi di *Bacillus amyloliquefaciens* B5M e *Bacillus subtilis* B5C. Infatti, i ceppi B5M e B5C hanno evidenziato una diminuzione del contenuto proteico dei campioni rispetto al controllo, ma nettamente inferiore rispetto a quella di tutti gli altri ceppi. Il contenuto proteico dei campioni in cui erano stati inoculati i ceppi di *Bacillus amyloliquefaciens* B5M e *Bacillus subtilis* B5C, dopo 24 ore di incubazione, erano rispettivamente di 14,8 e 14,6 mg BSA Eq/g campione, rispetto ai 16,0 mg SBA Eq/g campione del campione di controllo dopo formulazione (0 h).

Infine, le miscele di farina di ceci e acqua inoculate con i microrganismi e il campione di controllo, conservato a tempo 0, sono stati analizzati per valutare il grado di proteolisi subito dalle proteine al termine dell'incubazione, corrispondente a 24, 48 e 72 ore rispettivamente per i campioni inoculati con bacilli, batteri lattici e lieviti, fatta eccezione per i campioni inoculati con *Saccharomyces cerevisiae* il cui termine di fermentazione selezionato era dopo 48 ore.

La valutazione del grado di proteolisi subito dalle proteine della farina di ceci è stata effettuata attraverso il saggio elettroforetico su gel SDS-PAGE.

In Figura 47a e 47b sono riportate le immagini dei gel SDS-PAGE dei campioni di farina di ceci e acqua inoculati con i microrganismi selezionati.



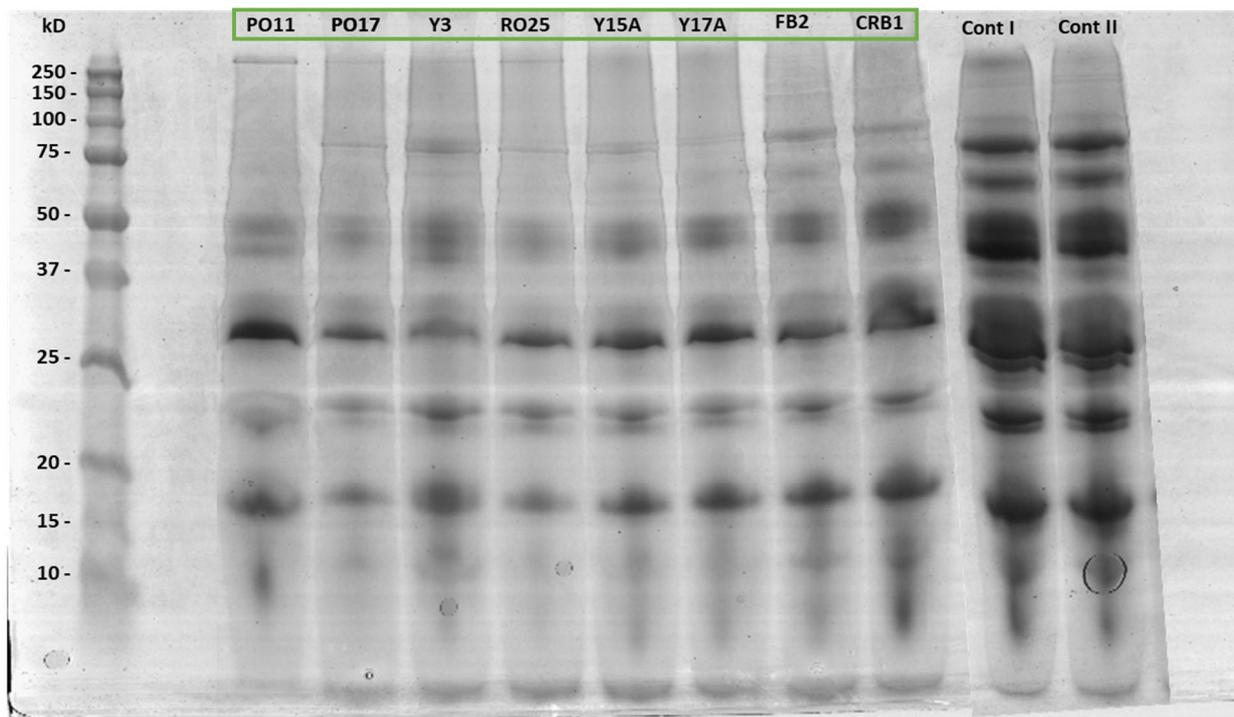


Figura 47a e 47b: L'elettroforesi su gel SDS-PAGE dei campioni ottenuti dalla fermentazione di miscele di farina di ceci e acqua attraverso l'uso di microrganismi selezionati. L'analisi è stata svolta su campioni di controllo immediatamente dopo la formulazione (0h) e sui campioni ottenuti dopo 24 ore di incubazione con bacilli (riquadro blu), 48 ore di fermentazione con batteri lattici (riquadro arancione) e lieviti FB2 e CRB1 (riquadro verde), e 72 ore di incubazione con i restanti lieviti selezionati (riquadro verde). Marcatori di peso molecolare nella prima corsia e loro valori in kDa sulla sinistra.

Scendendo lungo il gel, il peso molecolare dei peptidi diminuisce. Di conseguenza, maggiore è la grandezza del peptide, più in alto si posizionerà nel gel. Invece, minore è la grandezza del peptide formatosi durante il metabolismo microbico, più correrà lungo il gel e andrà a formare una banda verso il basso. Inoltre, maggiore è la colorazione scura della banda, maggiore è il numero di peptidi di quel peso molecolare che la caratterizzano. D'altra parte, minore è la colorazione della banda, minore sarà il contenuto peptidico.

Dal saggio elettroforetico su gel SDS-PAGE è possibile evidenziare che i ceppi microbici hanno dimostrato avere una differente capacità proteolitica nei confronti delle proteine della farina di ceci. Attraverso questa analisi è possibile mettere in luce che i campioni di farina di ceci e acqua in cui erano stati inoculati i ceppi di bacilli, dopo 24 ore di incubazione, i ceppi di batteri lattici e i ceppi di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, dopo 48 ore di incubazione, e i ceppi di lieviti *Yarrowia lipolytica* e *Debaryomyces hansenii*, dopo 72 ore di incubazione, avevano subito il fenomeno di proteolisi, in maniera diversificata in base al ceppo considerato, rispetto ai campioni di controllo non fermentati.

Le Figure 47a e 47b illustrano che tra tutti i ceppi microbici impiegati nello studio, i ceppi di batteri lattici, dopo 48 ore di incubazione, hanno determinato una maggiore proteolisi dei campioni in esame. I campioni di controllo possedevano peptidi aventi peso molecolare di 250 kDa e 100 kDa. Al termine della fermentazione, i campioni inoculati con i ceppi di batteri lattici non possedevano più quei peptidi, fatta eccezione per i lattococchi LBG2 e FBG1P. Inoltre, i peptidi con peso molecolare di 75 kDa presenti nei campioni di controllo erano assenti in tutti i campioni inoculati con i ceppi di batteri lattici, tranne nel campione inoculato con il ceppo *Lactococcus lactis* LBG2. Invece, i peptidi con peso molecolare di 70 kDa, presenti nei campioni di controllo, erano visibili anche in tutti i campioni inoculati con i batteri lattici, ma con colorazione più chiara, pertanto in concentrazione minore. La banda corrispondente ai peptidi con peso molecolare di 50 kDa, presente nei campioni di controllo, durante il processo fermentativo si è ridotta notevolmente nei campioni inoculati con i batteri lattici, fatta eccezione per i lattococchi che invece presentavano una banda di colorazione più scura rispetto a quella generata dai lattobacilli. Inoltre, i peptidi con peso molecolare di 22 kDa, contenuti nei campioni di controllo, si erano ridotti nelle miscele di farina di ceci inoculati con i batteri lattici. Infine, i peptidi con peso molecolare di 16 kDa erano contenuti in tutte le miscele dove erano stati inoculati i batteri lattici. Dalla valutazione visiva dei gel SDS-PAGE è possibile evidenziare che in generale i batteri lattici hanno una notevole capacità proteolitica,

dato che sono caratterizzati da un sistema proteolitico molto sviluppato e complesso. Infatti, essi possiedono proteinasi extracellulari di parete che sono in grado di idrolizzare le proteine in peptidi di dimensioni diverse e un sistema di peptidasi intracellulare che degrada i peptidi in amminoacidi (Savijoki *et al.*, 2006). Per questi motivi, in generale i batteri lattici sono utilizzati per la produzione di diversi alimenti fermentati, come formaggi, prodotti a base di carne fermentati e bevande fermentate. All'interno dei batteri lattici, i lattobacilli sono i microrganismi che hanno dimostrato avere una capacità proteolitica più marcata. D'altra parte, i lattococchi hanno determinato una minore proteolisi delle proteine della farina di ceci, dato che alcune bande presenti nei campioni di controllo sono rimaste o si sono solamente schiarite. Quindi, da questi risultati si può evidenziare che i lattococchi, quando inoculati in un sistema come quello della farina di ceci, hanno una minore attività proteolitica dei lattobacilli. I risultati ottenuti dai saggi spettrofotometrici OPA e Bradford, combinati all'analisi SDS-PAGE, hanno confermato la minore capacità proteolitica dei lattococchi rispetto ai lattobacilli. L'analisi Bradford aveva, infatti, evidenziato che il contenuto proteico dei campioni inoculati con tali ceppi era maggiore rispetto a quello dei campioni in cui erano stati aggiunti deliberatamente i lattobacilli, e ciò descriveva un'idrolisi minore delle proteine in peptidi rispetto ai ceppi di lattobacilli. I lattobacilli hanno idrolizzato maggiormente le proteine della farina di ceci e in questo modo hanno prodotto peptidi di piccole dimensioni. Tali peptidi, oltre ad essere stati prodotti dai lattobacilli, sono anche stati consumati dagli stessi per la loro crescita. Infatti, dall'analisi OPA si può osservare che il contenuto peptidico dei campioni inoculati con i lattobacilli era inferiore di quello dei campioni in cui erano stati aggiunti i lattococchi. Ciò era confermato dall' SDS-PAGE che mostrava l'assenza dei peptidi a più alto peso molecolare nei campioni fermentati con lattobacilli, contrariamente a quanto mostrato per i campioni inoculati con i lattococchi che hanno idrolizzato le proteine della matrice, ma in misura inferiore, e hanno prodotto peptidi di maggiori dimensioni che non sono stati utilizzati durante il loro metabolismo fermentativo.

Invece, per quanto riguarda i ceppi di *Bacillus*, dalla Figura 47a è possibile osservare che tali microrganismi, dopo 24 ore di incubazione, non hanno determinato nessuna differenza rispetto ai campioni di controllo. Di conseguenza, dati i risultati ottenuti dai saggi OPA e Bradford, combinati all'analisi SDS-PAGE, si può affermare che i bacilli non hanno espresso attività proteolitica nella matrice di farina di ceci. In particolare, tra i ceppi di bacilli, il ceppo *Bacillus subtilis* B12C è quello che ha dimostrato avere una maggiore attività proteolitica. Infatti, esso non ha determinato la scomparsa di nessuna banda presente nei campioni di controllo, ma la loro colorazione si è attenuata. Ad esempio, le bande a 250, 100, 75, 50, 30, 22 e 16 kDa sono rimaste inalterate nei campioni in cui erano state inoculate i ceppi di *Bacillus amyloliquefaciens* B5M e *Bacillus subtilis* B5C, mentre nel campione in cui era stato inoculato *Bacillus subtilis* B12C erano rimaste, ma si erano scolorite. Questi risultati sono in linea con quanto osservato dalle due analisi spettrofotometriche che avevano evidenziato una lieve attività proteolitica portata avanti dal ceppo di *Bacillus subtilis* B12C.

Per quanto riguarda i ceppi di lieviti, dalla Figura 47b è possibile osservare che tali microrganismi, dopo 48 ore di incubazione per i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* e dopo 72 ore di incubazione per i ceppi di *Yarrowia lipolytica* e *Debaryomyces hansenii*, hanno espresso la loro attività proteolitica, la quale risulta differente per ogni ceppo preso in considerazione. In particolare, i ceppi di *Yarrowia lipolytica* PO11 e PO17 sono i microrganismi che hanno dimostrato avere una maggiore attività proteolitica rispetto a tutti gli altri lieviti. D'altra parte, invece, i ceppi di lievito che hanno dimostrato avere una minore attività proteolitica sono stati i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* FB2, ma soprattutto CRB1. Infatti, tali ceppi mostravano la presenza di peptidi aventi peso molecolare di 100 e 75 kDa che invece erano scomparsi in tutti i campioni inoculati con gli altri lieviti. I risultati ottenuti dal saggio elettroforetico con gel SDS-PAGE sono in linea con quanto riportato da Groenewald *et al.* (2014), i quali avevano evidenziato la marcata attività proteolitica di *Yarrowia lipolytica* e il suo possibile utilizzo nella fase di maturazione per la

produzione di formaggi e insaccati. Anche per quanto riguarda *Debaryomyces hansenii*, i risultati ottenuti dall'analisi elettroforetica sono in linea con le evidenze di Volonterio (2005) che afferma la capacità di tale lievito di produrre proteasi con conseguente idrolisi delle proteine e formazione di amminoacidi e peptidi di piccole dimensioni. Inoltre, i campioni inoculati con i ceppi *Debaryomyces hansenii* Y15A, *Yarrowia lipolytica* e *Saccharomyces cerevisiae* FB2 sono quelli che hanno dimostrato avere un maggiore contenuto peptidico, come dimostrato dal saggio OPA. Quindi, si può affermare che i risultati dell'analisi spettrofotometrica OPA del contenuto peptidico dei campioni inoculati con i microrganismi selezionati sono stati confermati dall'analisi elettroforetica su gel SDS-PAGE che ha valutato la diversa capacità proteolitica dei ceppi impiegati.

7.4 Analisi del profilo in molecole volatili

I campioni di farina di ceci e acqua inoculati con bacilli, batteri lattici e lieviti, incubati rispettivamente per 24, 48 e 72 ore, fatta eccezione per i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* che furono selezionati a 48 ore, sono stati analizzati per determinare il loro profilo in molecole volatili. I campioni inoculati sono stati confrontati con un campione di controllo non inoculato e analizzato immediatamente dopo la formulazione (0 h).

La determinazione del profilo in molecole volatili dei campioni di farina di ceci fermentati è stata effettuata attraverso l'analisi gascromatografica SPME-GC-MS, accoppiata alla microestrazione in fase solida (SPME) per l'estrazione dei composti volatili e allo spettrometro di massa (MS) come rivelatore.

In Figura 48 sono riportate le diverse classi di composti volatili, espressi in % relativa, rilevati nel campione di controllo e nei campioni di farina di ceci e acqua inoculati con i microrganismi selezionati.

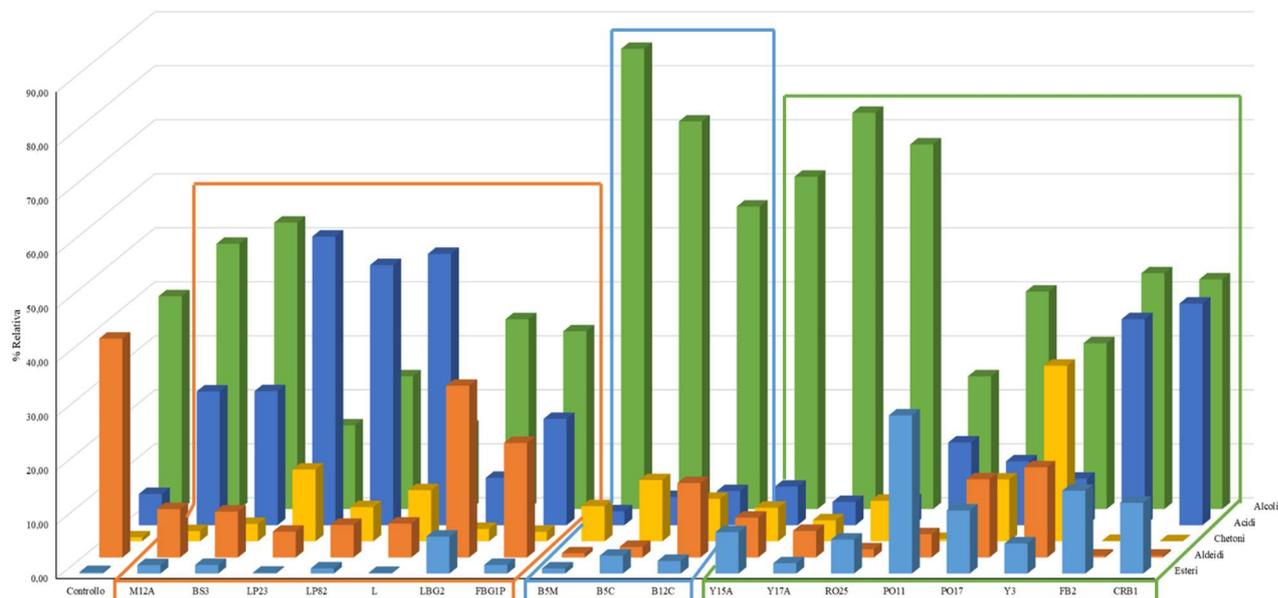


Figura 48: Classi di composti volatili, espressi in % relativa, rilevati nel controllo non inoculato e nei i campioni di farina di ceci inoculati con batteri lattici (riquadro arancione), bacilli (riquadro blu) e lieviti (riquadro verde) dopo rispettivamente 48, 24 e 72 dall'incubazione, fatta eccezione per i campioni inoculati con *S. cerevisiae* FB2 e CRB1 che erano stati incubati per 48 ore a 30°C.

Come si può osservare dalla Figura 48, nel campione di controllo al tempo iniziale sono presenti prevalentemente aldeidi e alcoli, rispettivamente il 40,53% e il 39,41%. All'interno della classe delle aldeidi, l'aldeide maggiormente presente nel campione di controllo è rappresentata dall'esanale, presente per il 33,93%.

I ceci sono semi leguminosi caratterizzati da un basso contenuto di grassi. Tuttavia, il cece è costituito prevalentemente da acidi grassi insaturi, quali l'acido linoleico, acido oleico, acido linolenico e acidi grassi monoinsaturi (Rachwa-Rosiak *et al.*, 2015). Inoltre, i ceci contengono enzimi, come lipasi e proteasi, che inducono modificazioni ossidative e idrolitiche nei grassi e nelle proteine presenti,

determinando la produzione di molecole volatili, quali aldeidi a corta catena, chetoni, alcoli, acidi, esteri, alcani e terpeni responsabili di odori e sapori sgradevoli (Xu *et al.*, 2019). Le principali vie di produzione dei composti volatili nei legumi sono l'ossidazione degli acidi grassi insaturi liberi, la degradazione degli amminoacidi e la degradazione dei carotenoidi. Ognuna di queste molecole volatili formatasi ha un odore specifico, ma la percezione dell'aroma complessivo è dovuto spesso ad una miscela di note diverse provenienti da un numero molto elevato di molecole. Nonostante l'interesse crescente verso i legumi, queste molecole volatili che si generano nella granella delle *Leguminose*, quali il cece, a causa della degradazione di lipidi e proteine e successiva trasformazione degli acidi grassi e amminoacidi in molecole volatili, sono responsabili della non accettabilità di tali prodotti da parte dei consumatori finali e della loro limitata espansione sul mercato (Karolkowski *et al.*, 2021).

In particolare, le aldeidi costituiscono la principale classe chimica di composti volatili identificati nei legumi. Esse si generano a causa dell'ossidazione degli acidi grassi presenti nel cece e sono una delle classi di molecole responsabili del sapore e odore sgradevole dei ceci. Tra le aldeidi maggiormente presente nei legumi, quali il cece, si trova l'esanale, la quale può rappresentare anche la metà della percentuale relativa totale delle aldeidi presenti. Tale molecola è tipica dei legumi e del cece e conferisce ai legumi un odore grasso, verde ed erbaceo. Maggiore è la quantità di esanale presente nel legume, minore è la sua accettabilità da parte del consumatore finale, a causa dei sapori e odori sgradevoli che conferisce alla materia prima (Karolkowski *et al.*, 2021). L'esanale è l'aldeide maggiormente presente nel campione di controllo al momento della formulazione (0 h) e nei campioni di farina di ceci e acqua fermentati. Tuttavia, durante il processo fermentativo dei campioni di farina di ceci operato da batteri lattici, bacilli e lieviti si è assistito ad una significativa diminuzione della percentuale relativa di esanale, fatta eccezione per i campioni che erano stati inoculati con i ceppi di *Lactococcus lactis* FBG1P e LBG2 e il ceppo di *Yarrowia lipolytica* PO17. Infatti, questi ceppi microbici hanno

determinato una riduzione del contenuto di esanale meno marcata rispetto agli altri microrganismi testati e, al termine del periodo di incubazione, i campioni ottenuti dal loro metabolismo possedevano ancora rispettivamente il 12,69%, 14,41% e 10,27% di esanale. In questo modo, la fermentazione ha permesso di ridurre la concentrazione di tale molecola, determinando un miglioramento delle caratteristiche sensoriali e organolettiche della farina di ceci fermentata e quindi una maggiore accettabilità da parte del consumatore finale. Questo aspetto particolarmente positivo della fermentazione della farina di ceci è in linea con quanto riportato da Xu *et al.* (2019), i quali hanno affermato che la modificazione chimica, il trattamento termico, l'idrolisi enzimatica e la fermentazione sono strategie utilizzate per ridurre i sapori e gli odori indesiderati nei prodotti a base di legumi.

Oltre alle aldeidi, nel campione di controllo sono presenti in percentuale elevata anche gli alcoli, pari al 39,41%. L'alcol presente in maggiore quantità nel campione di controllo è l'1-esanolo, il cui contenuto è pari al 25,07%.

Gli alcoli sono la classe di composti che comprende il maggior numero di molecole volatili. Gli alcoli derivano principalmente dall'ossidazione degli acidi grassi liberi dopo la raccolta dei semi di legumi (Chang *et al.*, 2022) e dalla degradazione degli amminoacidi (Karolkowski *et al.*, 2021). Come riportano Chang *et al.* (2022) e Xu *et al.* (2019), nei ceci sono presenti una vasta gamma di alcoli, tra cui si ritrova anche l'1-esanolo. L'1-esanolo determina odori caratteristici, quali odore di limone, odore di erba ed erbaceo (Chang *et al.*, 2022).

Come si può osservare dalla Figura 48, durante il processo fermentativo si è assistito ad un incremento della concentrazione di alcuni composti, ad una riduzione di altre molecole e alla produzione di nuovi composti dell'aroma. In particolare, i composti volatili prodotti in maggiore quantità durante il processo fermentativo dei campioni erano rappresentati da alcoli e acidi.

Nel campione di controllo la concentrazione di alcoli era elevata a causa dell'elevato contenuto di 1-esanolo. Nei campioni di farina di ceci e acqua in cui erano stati

inoculati i batteri lattici, la produzione di alcoli era ceppo dipendente. Infatti, i ceppi di *Latilactobacillus sakei* M12A e *Latilactobacillus curvatus* BS3 hanno determinato un aumento del contenuto in alcoli rispetto al campione di controllo. D'altra parte, tutti gli altri ceppi di batteri lattici avevano determinato una riduzione della concentrazione di alcoli, soprattutto i ceppi di *Lactiplantibacillus plantarum* LP82 e LP23 e il ceppo di *Lactobacillus paracasei* L. Invece, tutti i ceppi di *Bacillus* inoculati nei campioni hanno determinato un aumento significativo del contenuto di alcoli rispetto al campione di controllo, soprattutto etanolo e 1-esanolo. Per quanto riguarda i lieviti, la produzione di alcoli era ceppo dipendente. Infatti, i ceppi di *Debaryomyces hansenii* Y15A e Y17A e il ceppo di *Yarrowia lipolytica* RO25 hanno prodotto una quantità notevole di alcoli, soprattutto etanolo, 3-metil-1-butanolo e alcol fenilelico. D'altra parte, i ceppi di *Yarrowia lipolytica* Y3 e PO11 hanno determinato una diminuzione del contenuto di alcoli rispetto al controllo. I ceppi di *Yarrowia lipolytica* PO17 e i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* FB2 e CRB1 non hanno determinato né un aumento né una riduzione del contenuto in alcoli rispetto al campione di controllo.

Per quanto riguarda gli acidi, i campioni di farina di ceci e acqua inoculati con i ceppi di batteri lattici hanno evidenziato un aumento notevole del contenuto in acidi, in maniera particolare acido acetico, soprattutto nei campioni inoculati con *Lactiplantibacillus plantarum* LP23 e LP82 e *Lactobacillus paracasei* L. Questo fenomeno è dovuto al metabolismo dei batteri lattici, i quali in condizioni di anaerobiosi, e quindi durante i processi fermentativi, convertono il glucosio in acidi organici. D'altro canto, i ceppi di lattococchi hanno determinato un aumento del contenuto in acidi dei campioni rispetto al campione di controllo, ma non così marcato come gli altri ceppi di batteri lattici. I campioni inoculati con i ceppi di *Bacillus* hanno evidenziato un aumento lieve del contenuto in acidi. Infine, i ceppi di lievito hanno determinato un aumento della concentrazione di acidi, in maniera particolare i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* FB2 e CRB1. Infatti, i ceppi di lievito di *Debaryomyces hansenii* e *Yarrowia lipolytica* erano stati incubati in

presenza di ossigeno. In queste condizioni, tali ceppi hanno respirato producendo pochi acidi. Al contrario, i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* erano stati incubati in condizioni di ridotto contenuto di ossigeno e in queste condizioni *Saccharomyces cerevisiae* fermenta, producendo notevoli quantità di acidi, soprattutto acido butanoico, come riporta Duncan *et al.* (2023).

Per quanto riguarda gli esteri, la loro concentrazione è rimasta pressoché bassa nei campioni in cui erano stati inoculati i batteri lattici, fatta eccezione per il ceppo di *Lactococcus lactis* LBG2 che ha determinato un aumento del contenuto in esteri rispetto al campione di controllo. I campioni inoculati con i bacilli hanno evidenziato un lieve aumento della concentrazione in esteri rispetto al controllo. Invece, tutti i ceppi di lieviti selezionati che erano stati inoculati nei campioni di farina di ceci hanno determinato un aumento significativo del contenuto in esteri, in maniera particolare il ceppo di *Yarrowia lipolytica* PO11.

Nel campione di controllo il contenuto in chetoni era basso. Tuttavia, durante il processo fermentativo nei campioni di farina di ceci e acqua inoculati con i batteri lattici, il contenuto in chetoni è aumentato, soprattutto nei campioni in cui erano stati inoculati i ceppi di *Lactiplantibacillus plantarum* LP23 e LP83 e il ceppo di *Lactobacillus paracasei* L. Anche nei campioni inoculati con i bacilli si è assistito ad un aumento della concentrazione di chetoni. Per quanto riguarda le miscele di farina di ceci e acqua in cui erano stati inoculati i ceppi di lievito, la produzione di chetoni è ceppo dipendente. Infatti, tutti i ceppi di *Debaryomyces hansenii* e *Yarrowia lipolytica*, ad eccezione del ceppo di *Yarrowia lipolytica* PO11, hanno determinato un aumento del contenuto in chetoni, soprattutto il ceppo di *Yarrowia lipolytica* Y3. Al contrario, il ceppo di *Yarrowia lipolytica* PO11 e i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* FB2 e CRB1 non hanno prodotto chetoni, la cui concentrazione è rimasta molto bassa e quindi simile a quella del campione di controllo.

Al fine di discriminare il campione di controllo e i campioni di farina di ceci e acqua fermentati è stata effettuata un'analisi statistica dei componenti principali (PCA) relativa ai composti volatili contenuti nelle miscele di farina di ceci immediatamente dopo la formulazione (campione di controllo) e nei campioni di farina di ceci e acqua in cui erano stati inoculati i microrganismi selezionati.

In Figura 49 sono riportati i dati ottenuti tramite PCA relativa ai composti volatili presenti nel campione di controllo e nei campioni di farina di ceci inoculati con i microrganismi selezionati.

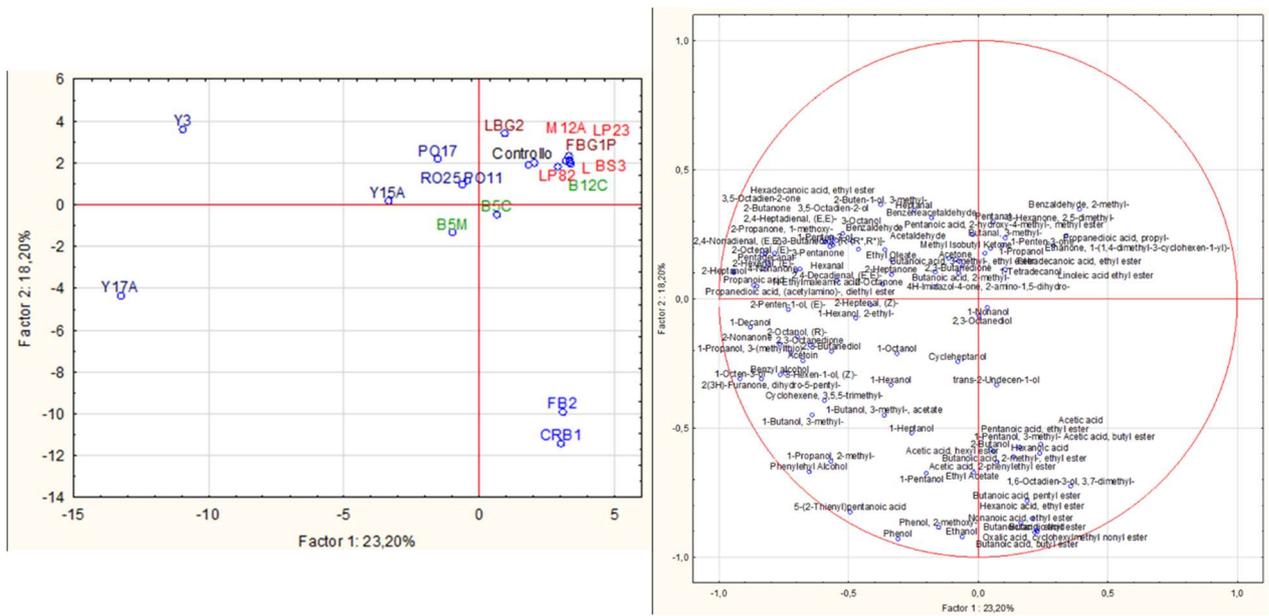


Figura 49: Proiezioni dei casi (a sinistra) e variabili (a destra) ottenuti tramite PCA relativa ai composti volatili contenuti nelle miscele di farina di ceci immediatamente dopo la formulazione (Controllo) e nei campioni inoculati con bacilli (verdi), batteri lattici (rossi) e lieviti (blu) al termine dell'incubazione corrispondente a 24 ore per i bacilli, 48 ore per i batteri lattici e *S. cerevisiae* FB2 e CRB1, e 72 ore per i restanti lieviti.

La distanza tra i diversi campioni lungo i due piani fattoriali indica la diversità tra di essi. In particolare, la componente del piano fattoriale 1 spiega il 23.20% della varianza e la componente 2 il 18.20%.

Dalla Figura 49 si può osservare che i campioni che maggiormente differiscono dal campione di controllo, presente nel quadrante in alto a destra, sono i campioni in cui

erano stati inoculati il ceppo di *Yarrowia lipolytica* Y3, il ceppo di *Debaryomyces hansenii* Y17A e i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* FB2 e CRB1. Il ceppo di *Yarrowia lipolytica* Y3 e il ceppo di *Debaryomyces hansenii* Y17A si differenziano dal campione di controllo lungo il piano fattoriale 1, mentre i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* discriminano dal campione di controllo lungo il piano fattoriale 2. Il campione in cui era stato inoculato *Yarrowia lipolytica* Y3 si discosta dal campione di controllo dato che esso è caratterizzato dalla presenza di molecole volatili come acido propanoico, 2-butanone e 1-metossi-2-propanone. Il campione in cui era stato inoculato *Debaryomyces hansenii* Y17A si differenzia dal campione di controllo dato che è caratterizzato da molecole, quali fenolo, 3-metil-1-butanol e 1-decanolo. Infine, i campioni inoculati con i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* FB2 e CRB1 si discostano dal campione di controllo per la presenza di acido acetico ed acido butanoico. Dall'analisi statistica PCA è possibile dedurre che i campioni in cui erano stati inoculati i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* sono simili, come ci si aspettava dal punto di vista teorico.

Dal grafico dell'analisi PCA è possibile osservare che tutti gli altri campioni si sono dimostrati simili al campione di controllo, dato che non si sono discostati da esso. Questo fenomeno è dovuto dalla forte differenza che i campioni inoculati con i ceppi di lievito Y3, Y17A, CRB1 e FB2 rispetto al controllo e gli altri campioni. Ciò ha provocato un avvicinamento degli altri campioni al controllo ed una forte riduzione della percentuale di varianza. Per questo motivo, tale analisi PCA è considerata poco affidabile e significativa, pertanto sono state effettuate diverse analisi PCA per evidenziare similitudini e differenze tra il campione di controllo e i campioni inoculati con i ceppi microbici appartenenti alla stessa specie.

7.4.1 I Bacilli

I campioni di farina di ceci e acqua in cui erano stati inoculati i ceppi di bacilli sono stati confrontati con il campione di controllo per quanto riguarda la composizione in molecole volatili attraverso analisi statistica delle componenti principali (PCA).

In Figura 50 sono riportati i dati ottenuti tramite PCA relativa ai composti volatili presenti nel campione di controllo e nei campioni inoculati con i ceppi di bacilli, la cui componente del piano fattoriale 1 spiega il 61.63% della varianza e la componente 2 il 22.16%.

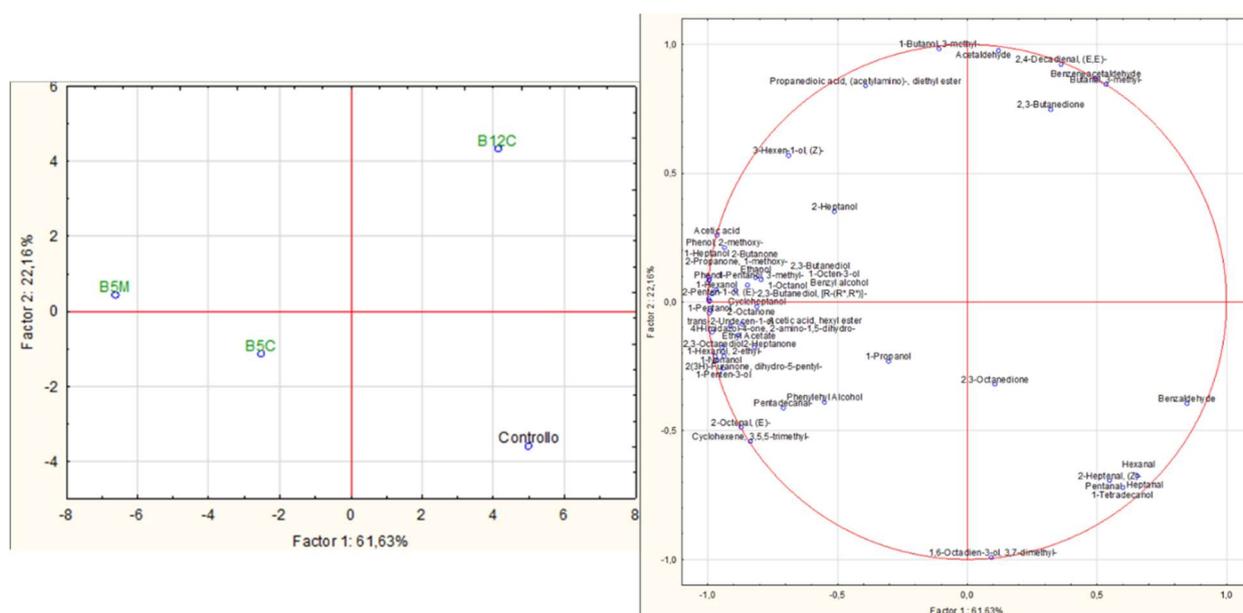


Figura 50: Proiezioni dei casi (a sinistra) e variabili (a destra) ottenuti tramite PCA relativa ai composti volatili contenuti nelle miscele di farina di ceci immediatamente dopo la formulazione (Controllo) e nei campioni inoculati con bacilli dopo 24 ore di incubazione a temperatura ambiente in agitazione.

Dalla Figura 50 è possibile evidenziare che i campioni di farina di ceci inoculati con i diversi ceppi di bacilli differiscono dal campione di controllo. I campioni inoculati con il ceppo di *Bacillus amyloliquefaciens* B5M e *Bacillus subtilis* B5C si differenziano dal campione di controllo lungo il piano fattoriale 1 ed erano caratterizzati dalla presenza di acido acetico, 2-metossifenolo ed etanolo per primo campione menzionato e da 1-penten-3-olo, 1-nonanolo e pentadecanale contenuti nel

secondo campione. Il campione inoculato con il ceppo di *Bacillus subtilis* B12C si differenzia dal campione di controllo lungo il piano fattoriale 2, dato che è caratterizzato da molecole volatili, quali acetaldeide e 2,3-butanedione. Quindi, dall'analisi PCA che mette a confronto il campione di controllo e i campioni inoculati con i ceppi di *Bacillus* è possibile affermare che tutti i campioni in cui sono stati aggiunti i diversi ceppi di bacilli sono diversi dal controllo ma anche fra loro. Infatti, i campioni inoculati con i bacilli B5M e B5C erano raggruppati insieme a sinistra del grafico mentre il campione ottenuto da B12C si trovava nel quadrante in alto a destra.

7.4.2 I Batteri Lattici

I campioni di farina di ceci e acqua in cui erano stati inoculati i ceppi di batteri lattici sono stati confrontati con il campione di controllo per quanto riguarda la composizione in molecole volatili attraverso analisi statistica delle componenti principali (PCA) illustrata in Figura 51.

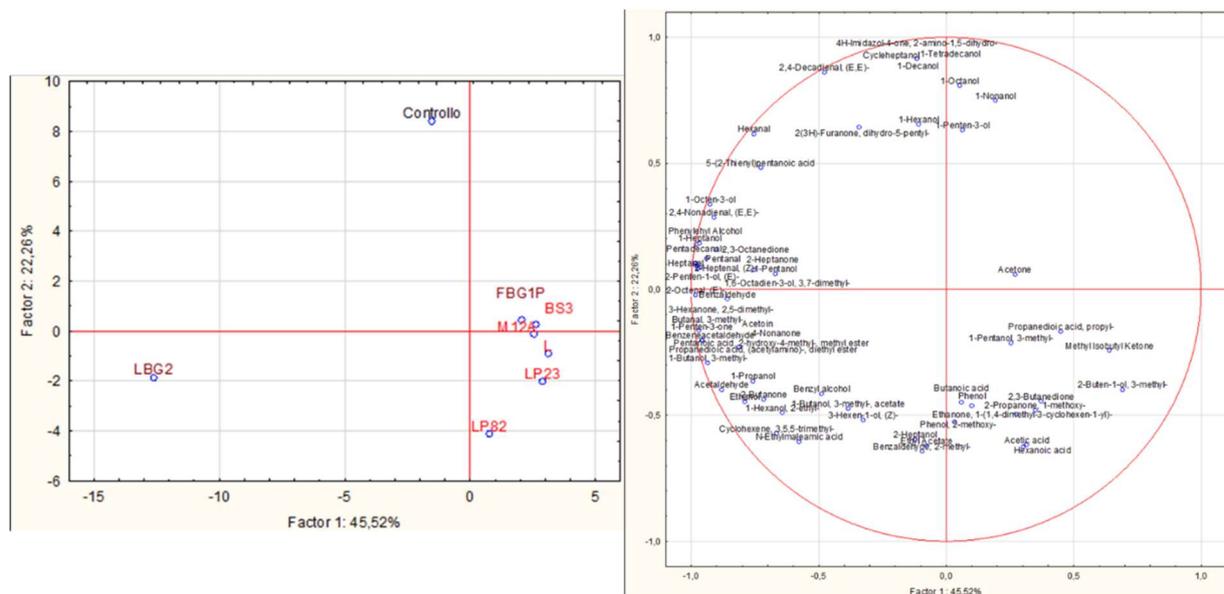


Figura 51: Proiezioni dei casi (a sinistra) e variabili (a destra) ottenuti tramite PCA relativa ai composti volatili contenuti nelle miscele di farina di ceci immediatamente dopo la formulazione (Controllo) e nei campioni inoculati con batteri lattici dopo 48 ore di incubazione a 30°C.

Dalla Figura 51 è possibile evidenziare che i campioni di farina di ceci inoculati con i diversi ceppi di batteri lattici differiscono dal campione di controllo sui due piani fattoriali 1 e 2 che spiegavano una varianza rispettivamente pari al 45.52% e al 22.26%. I campioni di farina di ceci e acqua inoculati con i ceppi di *Lactiplantibacillus plantarum* LP82 e LP23, il ceppo di *Latilactobacillus sakei* M12A, il ceppo di *Latilactobacillus curvatus* BS3, il ceppo di *Lactobacillus paracasei* L e il ceppo di *Lactococcus lactis* FBG1P si differenziano dal campione di controllo lungo il piano fattoriale 2 e si raggruppavano fra loro a causa della presenza in tutti i campioni di molecole volatili come acido acetico, acido esanoico, 3-metil-1-pentanololo, 3-metil-2-buten-1-olo, acido butanoico e 2,3-butanedione. Il campione di farina di ceci e acqua inoculato con il ceppo di *Lactococcus lactis* LBG2 si differenzia dal campione di controllo sia lungo il piano fattoriale 1 che lungo il piano fattoriale 2 posizionandosi nel quadrante in basso a sinistra. Il campione ottenuto dalla fermentazione di LBG2 si differenziava anche dai restanti campioni fermentati dai batteri lattici lungo il piano fattoriale 2. Infatti, la sua composizione era caratterizzata dalla presenza di acetaldeide, 1-propanolo e 3-metil-1-butanolo.

7.4.3 I Lieviti

I campioni di farina di ceci e acqua in cui erano stati inoculati i ceppi di lieviti sono stati confrontati con il campione di controllo per quanto riguarda la composizione in molecole volatili attraverso analisi statistica dei componenti principali (PCA) riportata in figura 52.

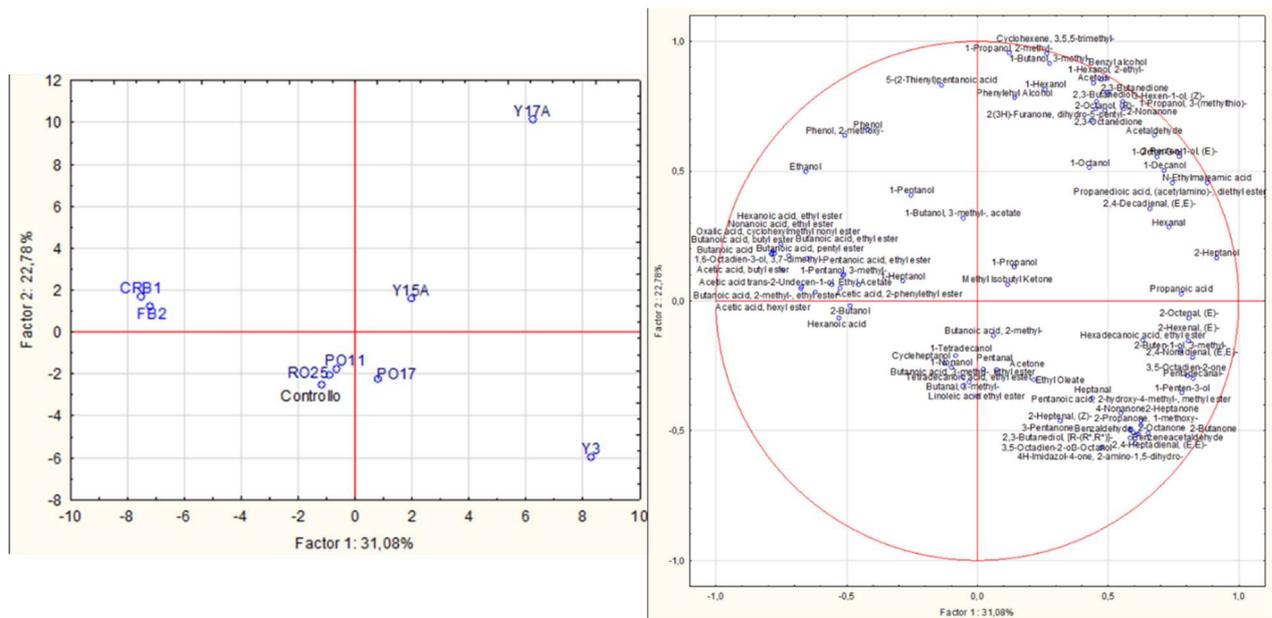


Figura 52: Proiezioni dei casi (a sinistra) e variabili (a destra) ottenuti tramite PCA relativa ai composti volatili contenuti nelle miscele di farina di ceci immediatamente dopo la formulazione (Controllo), nei campioni fermentati con *S. cerevisiae* CRB1 e FB2 dopo 48 ore di incubazione a 30°C e nei campioni inoculati con i restanti lieviti incubati per 72 ore a temperatura ambiente in agitazione.

Dalla Figura 52 è possibile evidenziare che i campioni di farina di ceci inoculati con i diversi ceppi di lieviti differiscono dal campione di controllo sui due piani fattoriali 1 e 2 che spiegavano una varianza rispettivamente pari al 31.08% e al 22.78%. I campioni di farina di ceci e acqua inoculati con i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* FB2 e CRB1 si differenziano dal campione di controllo lungo il piano fattoriale 1 posizionandosi nel riquadro in alto a sinistra rispetto al controllo che si trovava in basso a sinistra, dato che erano caratterizzati dalla presenza di molecole volatili, quali 3-metil-1-pentanololo ed etanolo. I campioni di farina di ceci inoculati con il ceppo di *Debaryomyces hansenii* Y15A si discrimina dal campione di controllo lungo il piano fattoriale 2, grazie alla presenza di molecole volatili quali acido propanoico e 2-eptanololo. I campioni in cui erano stati inoculati i ceppi di *Debaryomyces hansenii* Y17A e *Yarrowia lipolytica* Y3 sono quelli che presentano più differenze rispetto al campione di controllo. Il campione in cui era stato inoculato

il ceppo di *Debaryomyces hansenii* Y17A si differenzia dal campione di controllo lungo il piano fattoriale 1 e lungo il piano fattoriale 2 posizionandosi nel riquadro in alto a destra, in quanto era caratterizzato dalla presenza di 1-esanolo, 3-metil-1-butanolo e 2-metil-1-propanolo. Invece, il campione di farina di ceci in cui era stato inoculato il ceppo di *Yarrowia lipolytica* Y3 differisce dal campione di controllo lungo il piano fattoriale 1 e lungo il piano fattoriale 2 posizionandosi in basso a destra, grazie a molecole volatili, quali 1-penten-3-olo e 2-butanone. Infine, i campioni in cui erano stati inoculati i ceppi di *Yarrowia lipolytica* PO11, PO17 e RO25 sono risultati simili al campione di controllo e simili fra loro.

8. CONCLUSIONI

In questo studio sono state valutate le caratteristiche della farina di ceci sottoposta ad un processo fermentativo, in modo tale da selezionare i ceppi di microrganismi più performanti e idonei per la produzione di ingredienti funzionali ad alto valore aggiunto a base di farina di ceci fermentata. In particolare, è stata valutata la capacità di 18 ceppi microbici, quali ceppi di batteri lattici, bacilli e lieviti, di svilupparsi nella matrice iniziale composta da una miscela di farina di ceci e acqua in rapporto 1:2 p/p e di guidare il processo fermentativo della materia prima.

Dai risultati ottenuti dalle analisi microbiologiche è stato evidenziato che i ceppi di *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii* e *Saccharomyces cerevisiae* hanno dimostrato avere una buona capacità di crescere e di svilupparsi all'interno dei campioni di farina di ceci e acqua. In particolare, il ceppo di *Yarrowia lipolytica* Y3 ha dimostrato avere la migliore capacità di crescita e sviluppo all'interno dei campioni, raggiungendo il valore massimo di carico microbico dopo 48 ore di incubazione.

In generale, i batteri lattici, considerando sia i lattobacilli sia i lattococchi, hanno evidenziato una buona capacità di adattamento alla materia prima idratata e di crescita al suo interno. In particolare, il ceppo di lattobacillo *Lactiplantibacillus plantarum* LP82 e il ceppo di lattococco *Lactococcus lactis* FBG1P hanno raggiunto i valori massimi di carico microbico rispettivamente dopo 24 e 48 ore di incubazione, dimostrando un'ottima abilità di svilupparsi all'interno della farina di ceci.

Per quanto riguarda i ceppi di *Bacillus*, essi hanno dimostrato avere un'efficace e simile capacità di crescere e svilupparsi nelle miscele di farina di ceci e acqua. In particolare, il ceppo di *Bacillus amyloliquefaciens* B5M è stato in grado di svilupparsi meglio e con maggiore facilità, raggiungendo valori massimi di crescita microbica dopo 24 ore di incubazione.

Inoltre, il metabolismo dei ceppi microbici selezionati e impiegati in questo studio, quali lieviti, batteri lattici e lieviti, ha provocato una modificazione del pH delle

miscele di farina di ceci e acqua durante il processo fermentativo. Durante la fermentazione si è assistito ad un abbassamento del pH dei campioni in cui erano stati inoculati i ceppi microbici a causa della sintesi di diversi metaboliti, ma la cinetica di acidificazione differiva per ogni microrganismo preso in considerazione. La riduzione del pH durante il processo fermentativo ha permesso la creazione di ambiente selettivo e inospitale per diversi microrganismi. In particolare, i batteri lattici sono i microrganismi che hanno determinato una maggiore riduzione del pH e tra di essi i ceppi che hanno evidenziato un maggiore abbassamento del pH sono stati *Lactiplantibacillus plantarum* LP23, *Lactiplantibacillus plantarum* LP82 e *Lactobacillus paracasei* L.

Lo studio e la valutazione delle cinetiche di sviluppo dei diversi microrganismi inoculati nei campioni di farina di ceci e acqua hanno permesso di individuare il momento in cui i diversi ceppi microbici entravano in fase stazionaria. In questo modo, sulla base dei risultati ottenuti dalle analisi microbiologiche dei campioni inoculati con i microrganismi selezionati è stato possibile selezionare i tempi necessari per lo svolgimento e il completamento della fermentazione da parte dei diversi ceppi. Nello specifico, i tempi necessari per effettuare e completare la fermentazione della farina di ceci idratata erano di 24 ore per i bacilli, 48 ore per i batteri lattici e i ceppi di lievito di *Saccharomyces cerevisiae*, e 72 ore per i ceppi di lievito di *Yarrowia lipolytica* e *Debaryomyces hansenii*. Questi tempi di incubazione sono stati utilizzati per lo svolgimento delle successive analisi di quantificazione del contenuto proteico e peptidico e del profilo in molecole volatili.

Il metabolismo fermentativo dei microrganismi selezionati ha influenzato il contenuto in peptidi e proteine delle miscele di farina di ceci e acqua. La determinazione e la quantificazione del contenuto peptidico dei campioni inoculati con i microrganismi selezionati hanno permesso di valutare la capacità proteolitica dei diversi ceppi microbici. L'analisi spettrofotometrica OPA ha permesso di quantificare il contenuto peptidico dei campioni inoculati con i ceppi microbici, valutando la loro attività proteolitica. Alcuni ceppi microbici hanno determinato un

aumento del contenuto in peptidi rispetto al campione di controllo, mentre altri ceppi hanno causato una diminuzione del contenuto peptidico dei campioni inoculati rispetto al controllo. I microrganismi che hanno determinato la maggiore produzione di peptidi sono stati i lieviti, soprattutto *Debaryomyces hansenii* Y15A, *Yarrowia lipolytica* Y3 e *Saccharomyces cerevisiae* FB2. Tra i batteri lattici, i ceppi che hanno prodotto maggiori quantità di peptidi sono stati *Lactiplantibacillus plantarum* LP82, *Lactococcus lactis* LBG2 e *Lactococcus lactis* FBG1P. D'altra parte, i ceppi di *Bacillus* non hanno dimostrato una forte attività proteolitica, in quanto non hanno modificato il contenuto peptidico e proteico delle miscele di farina di ceci.

L'analisi spettrofotometrica Bradford ha permesso di quantificare il contenuto di proteine solubili dei campioni inoculati con i ceppi microbici, valutando la loro attività proteolitica. Tutti i ceppi microbici avevano determinato una diminuzione del contenuto proteico dei campioni rispetto al campione di controllo. I microrganismi che hanno determinato la maggiore riduzione di proteine solubili sono stati i batteri lattici, soprattutto *Lactiplantibacillus plantarum* LP23. Invece, i bacilli non hanno determinato una notevole riduzione del contenuto in proteine solubili, fatta eccezione per il ceppo di *Bacillus subtilis* B12C che ha dimezzato la concentrazione proteica del campione di controllo. Infine, i ceppi di lieviti hanno determinato una riduzione significativa del contenuto proteico rispetto al campione di controllo. In particolare, tra tutti i ceppi di lievito, il ceppo di *Yarrowia lipolytica* PO11 ha determinato la maggiore riduzione del contenuto in proteine solubili rispetto al campione di controllo.

La valutazione della capacità proteolitica dei diversi ceppi microbici è stata effettuata attraverso l'analisi elettroforetica su gel SDS-PAGE. I microrganismi che hanno determinato la maggiore proteolisi dei campioni di farina di ceci e acqua sono stati i batteri lattici, in quanto sono dotati di un sistema proteolitico molto sviluppato e performante. In particolare, il ceppo di *Lactiplantibacillus plantarum* LP23 ha determinato il maggiore grado di idrolisi delle proteine. D'altra parte, i ceppi di bacilli non hanno determinato una proteolisi marcata, fatta eccezione per il ceppo di

Bacillus subtilis B12C che comunque ha presentato risultati meno marcati rispetto ai batteri lattici e lieviti in esame. Infine, i ceppi di lievito hanno determinato la degradazione delle proteine della farina di ceci rispetto al campione di controllo. In particolare, tra tutti i ceppi di lievito, i ceppi di *Yarrowia lipolytica* PO11 e PO17 hanno dimostrato di avere la maggiore attività proteolitica.

Per l'ottenimento di un ingrediente funzionale ad alto valore aggiunto a base di farina di ceci, dal punto di vista nutrizionale e salutare, è molto importante considerare sia gli aspetti funzionali dell'ingrediente fermentato sia le sue caratteristiche sensoriali e organolettiche. Il metabolismo fermentativo dei ceppi microbici selezionati ha influenzato il profilo in composti volatili dei campioni di farina di ceci fermentata, causando un aumento della concentrazione di composti già presenti, la riduzione di altre molecole e la formazione di nuovi composti dell'aroma. In particolare, durante il processo fermentativo si è assistito ad un aumento della concentrazione di alcoli e acidi nei campioni in cui erano stati inoculati i ceppi di batteri lattici, bacilli e lieviti. Infatti, i campioni in cui erano stati aggiunti i ceppi di bacilli, quali *Bacillus amyloliquefaciens* B5M e *Bacillus subtilis* B5C, erano caratterizzati da un'alta concentrazione di alcoli, come etanolo, 2-metossifenolo, 1-penten-3-olo e 1-nonanolo. D'altra parte, i campioni fermentati da parte dei ceppi di batteri lattici, quali *Lactiplantaibacillus plantarum* LP82 e LP23 e *Lactobacillus paracasei* L, avevano registrato un alto contenuto di alcoli e acidi, come acido acetico, acido butanoico, acido esanoico, 3-metil-1-pentanololo e 1-propanolo. Invece, i campioni in cui erano stati inoculati i ceppi di lieviti, come *Debaryomyces hansenii* Y15A e Y17A e *Yarrowia lipolytica* RO25, avevano evidenziato un aumento della concentrazione in alcoli, quali 3-metil-1-butanolo, etanolo e fenolo. Infine, i campioni fermentati da parte dei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* FB2 e CRB1 avevano registrato un incremento del contenuto in acidi, come acido butanoico e acido acetico. Durante la fermentazione non si è assistito solo all'incremento del contenuto di alcune molecole, ma anche alla diminuzione di altre, come le aldeidi. Infatti, il contenuto aldeidico dei campioni si è ridotto notevolmente rispetto al

campione di controllo. In particolare, l'esanale è la molecola appartenente alla classe delle aldeidi per la quale si è assistito al maggiore decremento della sua concentrazione durante la fermentazione. Questa conseguenza della fermentazione microbica è un aspetto particolarmente positivo, in quanto le aldeidi sono strettamente associate al sapore e all'odore sgradevole dei legumi. In questo modo, la fermentazione ha permesso di ridurre la concentrazione di esanale e di aldeidi in generale, determinando un miglioramento delle caratteristiche organolettiche della farina di ceci fermentata e quindi una maggiore accettabilità da parte del consumatore finale. Inoltre, la produzione di molecole volatili appartenenti alle categorie di acidi e alcoli ha determinato un abbassamento del pH dei campioni inoculati con i microrganismi selezionati, come è stato possibile osservare nel paragrafo relativo alla quantificazione della variazione di pH.

Sulla base dei risultati ottenuti dalle seguenti analisi si può affermare che ogni ceppo microbico ha dimostrato avere una diversa capacità proteolitica ed è stato in grado di conferire alla farina di ceci fermentata delle caratteristiche particolari. In particolare, fra i ceppi di batteri lattici, i ceppi di *Lactiplantibacillus plantarum* LP23 e LP82 sono quelli che hanno dimostrato avere una maggiore importanza dal punto di vista tecnologico per la formulazione di ingredienti innovativi ad alto valore aggiunto a base di farina di ceci fermentata. Il ceppo di *Bacillus subtilis* B12C è il ceppo di *Bacillus* che ha dimostrato avere le migliori performances per la produzione tecnologica. Infine, i ceppi di lieviti che sembrano essere i più idonei per la produzione di ingredienti funzionali ad alto valore aggiunto a base di farina di ceci sono *Debaryomyces hansenii* Y15A, *Yarrowia lipolytica* Y3 e PO17 e *Saccharomyces cerevisiae* FB2. Per una selezione futura dei ceppi microbici per la produzione di ingredienti funzionali ad alto valore aggiunto a base di farina di ceci, sarebbe interessante applicare trattamenti non termici alla farina di ceci, come le alte pressioni di omogenizzazione (HPH), per valutare l'effetto di questi trattamenti sui composti biodisponibili presenti e gli aspetti legati alla proteolisi da parte dei microrganismi. Oltre agli aspetti tecnologici, è molto importante tenere in

considerazione anche gli aspetti organolettici e sensoriali dei prodotti ottenuti dalla fermentazione della farina di ceci con microrganismi selezionati, dato che influenzano notevolmente il gradimento, la preferenza e l'accettabilità dell'alimento da parte del consumatore finale. Per questo motivo, sarebbe interessante effettuare test affettivi di gradimento sui consumatori finali attraverso panel test. In aggiunta agli aspetti tecnologici e organolettici, sarebbe interessante valutare gli aspetti salutistici e nutrizionali dei prodotti ottenuti dalla fermentazione della farina di ceci con i ceppi microbici selezionati, in quanto durante la proteolisi microbica si potrebbero generare peptidi bioattivi, i quali possono determinare un effetto positivo per la salute umana. Per questa ragione, sarebbe interessante ricercare e individuare gli eventuali peptidi bioattivi che si generano e che si trovano nei prodotti ottenuti dalla fermentazione della farina di ceci con microrganismi selezionati.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Prof.ssa Francesca Patrignani per avermi accompagnato in questo percorso e per essere stata sempre presente per qualsiasi dubbio e chiarimento. In maniera particolare però ringrazio la correlatrice Samantha Rossi per tutti i consigli che mi ha dato, per il tempo che mi ha dedicato e soprattutto per la fiducia che ha sempre avuto in me e nelle mie capacità.

Un grazie speciale va alla mia famiglia, sia quella più stretta, come mamma Cinzia, babbo Luigi e Chiara, ma anche a quella più allargata di zii, cugini e nonni, che mi hanno sempre accompagnata nei momenti più belli e più difficili senza mai allontanarsi e che hanno sempre creduto in me.

Ringrazio tutte le mie amiche e amici per avermi sempre dato la carica ed essermi stati vicini in qualsiasi momento.

Ringrazio le mie colleghe e colleghi di questo percorso, ma soprattutto Serena per tutte le giornate e i pranzi insieme, per tutte le risate e le chiacchierate fatte, come se ci conoscessimo da sempre.

Infine, ultimo ma non per importanza, ringrazio Stefano per avermi dato i consigli migliori quando ne avevo bisogno, per aver sempre creduto in tutto ciò che ho fatto, senza mai giudicarmi, e per essere stato sempre presente in tutti i miei traguardi, piccoli e grandi.

BIBLIOGRAFIA

Aluko, R. E. (2018). Food protein-derived peptides: Production, isolation, and purification. In *Proteins in food processing* (pp. 389-412). Woodhead Publishing.

Aruna, T. E., Aworh, O. C., Raji, A. O., & Olagunju, A. I. (2017). Protein enrichment of yam peels by fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* (BY4743). *Annals of Agricultural Sciences*, 62(1), 33-37.

Baldoni, G. *Coltivazioni erbacee*. Padova, Libreria universitaria (2021).

Baldoni, R., & Giardini, L. *Coltivazioni erbacee: cereali e proteaginose*. Bologna, Pàtron Editore (2000).

Beopoulos, A., Desfougeres, T., Sabirova, J., Zinjarde, S., Neuvéglise, C., & Nicaud, JM (2010). The hydrocarbon-degrading oily yeast *Yarrowia lipolytica*. In *Handbook of microbiology of hydrocarbons and lipids*.

Bourgeois, C., Mescle, J., & Zucca, J. *Microbiologia alimentare: aspetti microbiologici della sicurezza e della qualità*. Milano, Tecniche nuove (1990).

Brígida, A. I., Amaral, P. F., Coelho, M. A., & Goncalves, L. R. (2014). Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 101, 148-158.

Butinar, L., Santos, S., Spencer-Martins, I., Oren, A., & Gunde-Cimerman, N. (2005). Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS microbiology letters*, 244(2), 229-234.

Chang, L., Lan, Y., Bandillo, N., Ohm, J. B., Chen, B., & Rao, J. (2022). Plant proteins from green pea and chickpea: Extraction, fractionation, structural characterization and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 123, 107165.

Cocolin, L., Gobbetti, M., & Neviani, E. *Microbiologia alimentare applicata*. Rozzano (MI), CEA (2022).

Csutak, O., Corbu, V., Stoica, I., Ionescu, R., & Vassu, T. (2015). Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica* CMGB32. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 6, 545-553.

De Pasquale, I., Pontonio, E., Gobbetti, M., & Rizzello, C. G. (2020). Nutritional and functional effects of the lactic acid bacteria fermentation on gelatinized legume flours. *International Journal of Food Microbiology*, 316, 108426.

De Pasquale, I., Verni, M., Verardo, V., Gómez-Caravaca, A. M., & Rizzello, C. G. (2021). Nutritional and functional advantages of the use of fermented black chickpea flour for semolina-pasta fortification. *Foods*, 10(1), 182.

Duncan, J. D., Setati, M. E., & Divol, B. (2023). Redox cofactor metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and its impact on the production of alcoholic fermentation end-products. *Food Research International*, 163, 112276.

Garrido-Galand, S., Asensio-Grau, A., Calvo-Lerma, J., Heredia, A., & Andrés, A. (2021). The potential of fermentation on nutritional and technological improvement of cereal and legume flours: A review. *Food Research International*, 145, 110398.

Ghavidel, R. A., & Prakash, J. (2007). The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and in vitro starch

and protein digestibility of some legume seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 1292–1299.

Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Polo, A., & Rizzello, C. G. (2020). The sourdough fermentation is the powerful process to exploit the potential of legumes, pseudo-cereals and milling by-products in baking industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(13), 2158-2173.

Gómez, M., Bonastre, O., Rosell, C. M., Pando, V., Fernández E. (2008). Studies on cake quality made of wheat-chickpea flour blends. *LWT – Food science and technology*, 41, 1701 – 1709.

Groenewald, M., Boekhout, T., Neuvéglise, C., Gaillardin, C., van Dijck, P. W., & Wyss, M. (2014). *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical reviews in microbiology*, 40(3), 187-206.

Gül, M. K., Egesel, C. Ö., & Turhan, H. (2008). The effects of planting time on fatty acids and tocopherols in chickpea. *European Food Research and Technology*, 226, 517-522.

Gullo, M., Giudici, P., & Solieri, L. (2014). Yeasts ecology in olive oil: a relevant biotechnological potential. *Biomed research international*, 2014.

Jukanti, A. K., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L., & Chibbar, R. N. (2012). Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. *British Journal of Nutrition*, 108(S1), S11-S26.

Karolkowski, A., Guichard, E., Briand, L., & Salles, C. (2021). Volatile compounds in pulses: A review. *Foods*, 10(12), 3140.

Kaur, R., & Prasad, K. (2021). Technological, processing and nutritional aspects of chickpea (*Cicer arietinum*) - A review. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 448-463.

Klongklaew, A., Banwo, K., Soodsawaeng, P., Christopher, A., Khanongnuch, C., Sarkar, D., & Shetty, K. (2022). Lactic acid bacteria based fermentation strategy to improve phenolic bioactive-linked functional qualities of select chickpea (*Cicer arietinum* L.) varieties. *NFS Journal*, 27, 36-46.

Krzyczkowska, J., & Fabiszewska, A. U. (2015). *Yarrowia lipolytica*-Niekonwencjonalne drożdże w biotechnologii. *Postępy Mikrobiologii*, 54(1).

Latham, M.C. Human nutrition in the developing world (No. 29). *Agribusiness organization* (1997).

Liu, Y., Zhu, S., Li, Y., Sun, F., Huang, D., & Chen, X. (2023). Alternations in the multilevel structures of chickpea protein during fermentation and their relationship with digestibility. *Food Research International*, 112453.

Madigan, M., Bender, K., Buckley, D., Sattley, W., & Stahl D. *Brock Biologia dei microrganismi: microbiologia generale, ambientale e industriale* (16.th ed.). Milano – Torino, Pearson (2022).

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl D. *Brock Biologia dei microrganismi: microbiologia generale, ambientale e industriale* (14.th ed.). Milano – Torino, Pearson (2016).

Madzak, C., & Beckerich, J. M. (2013). Heterologous protein expression and secretion in *Yarrowia lipolytica*. *Yarrowia lipolytica: biotechnological applications*, 1-76.

McGee, H. *Il cibo e la cucina: scienza, storia e cultura degli alimenti*. Roma, Ricca (2016).

Nicaud, J. M. (2012). *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 29(10), 409-418.

Nielsen, P. M., Petersen, D., & Dambmann, C. J. J. O. F. S. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of food science*, 66(5), 642-646.

Nobile, C. G. M., Carreras, J., Grosso, R., Inga, M., Silva, M., Aguilar, R., ... & Martinez, M. J. (2013). Proximate composition and seed lipid components of “kabuli”-type chickpea (*Cicer arietinum* L.) from Argentina. *Agricultural Sciences*, 2013.

Nwokolo, E., & Smartt, J. *Food and feed from legumes and oilseeds*. London, England: Chapman & Hall (1996).

Pardossi, A., Gianquinto, G., Santamaria, P., & Incrocci, L. *Orticoltura: principi e pratica*. Milano, Edagricole (2018).

Pietrangeli, P., & Rolle, R. (2019). *Debaryomyces hansenii*: An Updated Overview of Its Biotechnological Potential. *Frontiers in microbiology*, 10, 2090. doi: 10.3389/fmicb.2019.02090

Rachwa-Rosiak, D., Nebesny, E., & Budryn, G. (2015). Chickpeas — composition, nutritional value, health benefits, application to bread and snacks: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(8), 1137-1145.

Ranalli, P., Parisi, B., & Torricelli, R. *Cece e lenticchia: coltivazione, scelta delle cultivar e post-raccolta*. Milano, Edagricole (2018).

Ratledge, C, Tan K-H. (1990). In *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*, Verachtert HJ, De Mot R (eds). Marcel Dekker: New York; 223–253.

Rincón, F., Martínez, B., & Ibáñez, M. V. (1998). Proximate composition and antinutritive substances in chickpea (*Cicer arietinum* L) as affected by the biotype factor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78(3), 382-388.

Sáez, G. D., Sabater, C., Fara, A., & Zárata, G. (2022). Fermentation of chickpea flour with selected lactic acid bacteria for improving its nutritional and functional properties. *Journal of Applied Microbiology*, 133(1), 181-199.

Sanjeeva, T. (2008). *Physico-chemical properties of chickpea flour, starch and protein fractions and their utilization in low-fat pork bologna* (Doctoral dissertation, University of Saskatchewan).

Sarmiento, A., Barros, L., Fernandes, A., Carvalho, A. M., Ferreira, I. CRF (2015). Valorization of traditional foods: nutritional and bioactive properties of *Cicer arietinum* L. an *Lathyrus sativus* L. pulse. *Journal of the Science of food and agriculture*, 95, 179 – 185.

Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 71, 394-406.

Secchi, G. *I nostri alimenti: caratteristiche merceologiche e nutritive dei prodotti alimentari*. Milano, Hoepli (1979).

Sofi, S. A., Singh, J., Muzaffar, K., Mir, S. A., & Dar, B. N. (2020). Effect of germination time on physico-chemical, functional, pasting, rheology and electrophoretic characteristics of chickpea flour. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 2380-2392.

Tesi, R. *Principi di orticoltura e ortaggi d'Italia*. Bologna, Edagricole (1994).

Turco, I. (2018). Alimentazione e salute: ruolo dei polifenoli contenuti nei legumi nella prevenzione delle patologie dismetaboliche.

Valero, E., Schiavo, S., Ficarella, A., & Casella, S. (2019). *Debaryomyces hansenii*: An extremely versatile yeast. *Industrial biotechnology*, 15(3), 175-185.

Vigliotta, G., Di Giacomo, M., Carata, E., Massardo, D. R., Tredici, S. M., Silvestro, D., ... & Alifano, P. (2007). Nitrite metabolism in *Debaryomyces hansenii* TOB-Y7, a yeast strain involved in tobacco fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 75, 633-645.

Volonterio, A. G. *Microbiologia degli alimenti*. Milano, CEA (2005).

Wang, J., Li, Y., Li, A., Liu, R. H., Gao, X., Li, D., ... & Xue, Z. (2021). Nutritional constituent and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review. *Food Research International*, 150, 110790.

Xu, M., Jin, Z., Lan, Y., Rao, J., & Chen, B. (2019). HS-SPME-GC-MS/olfactometry combined with chemometrics to assess the impact of germination on flavor attributes of chickpea, lentil, and yellow pea flours. *Food Chemistry*, 280, 83-95.

Zhang, X., Zhang, S., Xie, B., & Sun, Z. (2021). Influence of lactic acid bacteria fermentation on physicochemical properties and antioxidant activity of chickpea yam milk. *Journal of Food Quality*, 2021, 1-9.

Zhao, L., Zhou, Y., Liang, L., Godana, E. A., Zhang, X., Yang, X., ... & Zhang, H. (2023). Changes in quality and microbiome composition of strawberry fruits following postharvest application of *Debaryomyces hansenii*, a yeast biocontrol agent. *Postharvest Biology and Technology*, 202, 112379.