

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI**

**CAMPUS DI CESENA**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN**

**SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI**

**VALORIZZAZIONE BIOTECNOLOGICA DI FARINA DI CECI  
FERMENTATA CON MICRORGANISMI SELEZIONATI E  
SOTTOPOSTA A PROCESSO DI ALTE PRESSIONI DI  
OMOGENEIZZAZIONE**

Tesi in

42902 - LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA APPLICATA

Relatrice:

Prof.ssa Francesca Patrignani

Candidata:

Beatrice Bianchi

Matricola n° 980112

Correlatrici:

Dott.ssa Samantha Rossi

Dott.ssa Solidea Amadei

Anno Accademico 2022/2023

Sessione unica



# INDICE

1. INTRODUZIONE .....	1
1.1 IL CECE .....	2
1.1.1 Composizione chimica.....	4
1.1.1.1 Energia .....	4
1.1.1.2 Carboidrati.....	4
1.1.1.3 Fibra alimentare.....	5
1.1.1.4 Proteine e aminoacidi.....	6
1.1.1.5 Grassi .....	6
1.1.1.6 Vitamine .....	7
1.1.1.7 Sali minerali .....	8
1.2 LA FARINA DI CECI .....	9
1.3 CONSUMI E MERCATO .....	11
1.3.1 Consumi e mercato dei ceci .....	11
1.3.2 Consumi e mercato della farina di ceci.....	12
2. VALORIZZAZIONE DI FARINA DI CECI COME FONTE PROTEICA INNOVATIVA.....	14
2.1 FERMENTAZIONE.....	14
2.1.1 Microrganismi fermentativi .....	16
2.1.1.1 Batteri lattici (LAB).....	16
2.1.1.2 Lieviti.....	17
2.2 TRATTAMENTO HPH (High Pressure Homogenization).....	17
2.2.1 Funzionamento .....	19
3. OBIETTIVI .....	20
4. MATERIALI E METODI .....	22
4.1 CONDIZIONI DI CRESCITA DEI CEPPI DI BATTERI LATTICI E LIEVITI .....	22
4.2 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE E TRATTAMENTO HPH .....	22
4.3 ANALISI MICROBIOLOGICHE .....	23
4.4 DETERMINAZIONE DEL pH.....	24
4.5 QUANTIFICAZIONE DI PEPTIDI E PROTEINE SOLUBILI .....	25
4.5.1. Estrazione proteine da farine di legumi .....	25
4.5.2 Analisi OPA.....	25
4.5.3 Analisi Bradford.....	26
4.6 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) .....	27
4.7 ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE E FENOLI TOTALI .....	28
4.7.1 Processo di estrazione.....	28
4.7.2 Analisi DPPH.....	28
4.7.3 Analisi ABTS .....	29
4.7.4 Determinazione fenoli totali.....	31

4.8 ANALISI DEL COLORE.....	32
4.9 ANALISI DEL PROFILO IN MOLECOLE VOLATILI .....	32
4.10 ANALISI STATISTICA .....	33
5. RISULTATI E DISCUSSIONE .....	34
5.1. ANALISI MICROBIOLOGICHE E pH.....	34
5.2 QUANTIFICAZIONE DI PEPTIDI E PROTEINE SOLUBILI .....	36
5.3 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) .....	38
5.4 CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE E CONTENUTO DI FENOLI TOTALI .....	40
5.5 ANALISI DEL COLORE.....	45
5.6 ANALISI DEL PROFILO IN MOLECOLE VOLATILI .....	47
5.6.1 Analisi delle Componenti Principali (PCA) .....	52
6. CONCLUSIONI .....	57
7. BIBLIOGRAFIA .....	60

# 1. INTRODUZIONE

A causa delle nuove tendenze di mercato degli ultimi decenni, dovute ad un aumento di interesse e consapevolezza del consumatore verso la ricerca di alimenti più sostenibili e salutari, ci si sta spostando sempre di più verso la produzione di alimenti innovativi, ad alto valore aggiunto e possibilmente vegetali. Questo è dovuto al fatto che i prodotti di origine animale stanno creando sempre più un forte scompenso, sia da un punto di vista di mancato benessere dell'animale sia da un punto di vista ambientale e sostenibile (elevati sprechi e consumi di risorse). A tal proposito, le farine vegetali rappresentano una grande opportunità per lo sviluppo di alimenti innovativi, in quanto presentano un elevato valore nutrizionale e si prestano bene a svariate preparazioni, per cui sono molto versatili. Infatti, sono ricche di nutrienti come proteine, fibre, sali minerali e vitamine e presentano contenuti ridotti di grassi, zuccheri e sale. Inoltre, molte farine vegetali sono ottenute da scarti e sottoprodotti come bucce, polpa di frutta e semi danneggiati, e questo crea ulteriore valore.

Le farine di origine vegetale sono prodotte a partire da diverse matrici, quali legumi, cereali, radici e semi. Le più comuni e maggiormente utilizzate nell'industria alimentare sono le farine di cereali, composte prevalentemente da carboidrati. Da sempre la più utilizzata è la farina di frumento, anche se negli ultimi tempi ci si sta spostando sempre più verso farine senza glutine come farine di mais, riso e grano saraceno. Le farine di legumi, diversamente da quelle appena descritte, sono più ricche in proteine. Per questo motivo, stanno prendendo fortemente piede nell'industria alimentare perché viste dal consumatore come più salutari e meno caloriche.

Partendo dalla materia prima, i legumi sono i semi delle piante appartenenti alla famiglia delle leguminose e sono contenuti all'interno di appositi astucci chiamati baccelli. In commercio, si possono trovare sotto forma secca, che necessita ammollo prima della cottura, oppure già precotti e pronti all'uso. Hanno un elevato contenuto in carboidrati, proteine e fibra, un ridotto contenuto in grassi e un elevato contenuto in micronutrienti come sali minerali e vitamine. Questo li rende ottimi all'interno di uno stile di vita sano ed equilibrato. Infatti, ad oggi i legumi sono tra gli alimenti più consumati in tutto il mondo, sia per il loro alto valore nutrizionale sia per la tendenza del consumatore verso una dieta sempre più vegetale.

La quota proteica risulta essere quasi il doppio rispetto a quella dei cereali e molto vicina a quella della carne, tant'è che secondo i LARN è considerato 100 il valore biologico delle proteine carnee e 80 quello dei legumi. Infatti, sono gli alimenti che hanno il maggior contenuto proteico tra tutti i vegetali.

Oltre a sostituire i prodotti carnei, l'elevato valore nutrizionale dei legumi fa sì che possano essere utilizzati in diversi ambiti, in particolar modo sullo sviluppo di prodotti innovativi, ad alto valore aggiunto. Per rendere questo possibile è necessario sottoporli

a trattamenti di trasformazione, perché non possono essere utilizzati come tali. A tal proposito, dopo macinazione ed estrazione della frazione lipidica, si ottengono le farine di legumi, le quali presentano un contenuto proteico del 50% circa. Trasformando ulteriormente, dall'eliminazione dei carboidrati si ottengono i concentrati, con contenuto proteico di circa il 70%. Infine, per eliminazione della fibra insolubile, si ottengono gli isolati, che hanno un contenuto di proteine pari a circa il 90%.

Focalizzandosi sulle farine di legumi, è bene distinguerle da quelle di cereali, in quanto presentano differenze significative nonostante alla vista siano molto simili: le farine di cereali sono più comuni, hanno elevato contenuto in carboidrati e più o meno contenuto in glutine (farina di frumento vs farina di riso); le farine di legumi hanno maggior contenuto proteico, non sviluppano glutine e, inoltre, si portano dietro un "aroma di legume" (oltre al colore tenue giallo/verde) da non sottovalutare, perché è facile riscontrarlo sul prodotto finito e non sempre l'aroma finale risulta gradevole al palato del consumatore. Proprio per questo, sono tuttora in atto varie ricerche per sviluppare nuove tecnologie di produzione, al fine di poter ottenere nuovi prodotti da inserire nella dieta quotidiana del consumatore, rendendolo più consapevole e propenso all'acquisto degli stessi.

## 1.1 IL CECE

Il cece (*Cicer arietinum* L.) è il terzo legume in ordine di importanza al mondo per produzione dopo il fagiolo (*Phaseolus vulgaris* L.) e il pisello (*Pisum sativum* L.). È coltivato in più di 40 Paesi, maggiormente nel sud e sudest dell'Asia (70% ca.), in India (60% ca.) e in Pakistan (10-15% ca.).

*Cicer arietinum* L. è stato uno dei primi legumi da granella ad essere addomesticato nel vecchio mondo (Van der Maesen, 1972).

Prove disponibili suggeriscono che abbia origine nella regione fertile nel sudest della Turchia adiacente alla Siria (van der Maesen, 1987).

Il cece è una pianta annuale che deriva dalla famiglia delle Fabaceae (Nwokolo and Smartt, 1996), ed è coltivato principalmente in zone temperate e semiaride.

Per praticità, viene classificato in due tipologie: *kabuli* (macrosperma) e *desi* (microsperma). La tipologia *kabuli* è caratterizzata da fiori bianchi, per mancanza di antocianine sugli steli, ed è molto più comune nelle zone del Mediterraneo, Asia occidentale, nord Africa, nord America e Australia (climi temperati); la tipologia *desi* presenta fiori rosa, per pigmentazione antocianica sugli steli, ed è molto coltivata in sud Asia, Etiopia, Iran, Messico e Australia (zone semiaride). Oltre al luogo di coltivazione, le due tipologie differiscono anche per colore e forma: i *desi* sono piccoli e di colore marrone scuro, mentre i *kabuli*, più utilizzati per il consumo diretto, sono più grandi e di color crema (Knights & Hobson, 2016).

Le differenze di aspetto e composizione chimica tra le due tipologie dipendono dalla regione e dalle condizioni di crescita, che ne influenzano la lunghezza della stagione vegetativa della pianta e/o la resistenza a varie malattie.

Secondo alcuni studi e pratiche antiche, le foglie del cece hanno proprietà astringenti e gli estratti ricavati da queste forniscono un trattamento contro diarrea o indigestione. In Egitto, i chicchi di ceci sono sempre stati utilizzati per aumentare il peso corporeo e curare mal di testa, gola e tosse. Inoltre, i chicchi immaturi venivano consumati crudi, mentre quelli maturi venivano essiccati, macinati in farina e utilizzati come sostituti del caffè o come mangime per gli animali.

La pianta del cece è ipogea e la crescita della plumula produce un germoglio eretto. Le foglie nascono singolarmente ad ogni nodo e si dispongono in fillotassi alternata. Generalmente sono unipennate composte. La prima vera foglia ha due/tre paia di foglioline più una terminale. Gli steli sono lunghi 3-5 mm e larghi 2-4 mm, mentre la radice primaria è lunga e produce radici laterali. La pianta ha una profonda radice a fittone con radici laterali, le radici penetrano nel terreno oltre i 120 cm (Sheldrake & Saxena, 1979). Tutte le superfici esterne alla pianta, tra cui la corolla, sono coperte da peli ghiandolari e aghiandolari.

Generalmente, i fiori sono presenti singolarmente in racemi ascellari, ma ci possono essere anche fiori gemelli. I fiori emergono sul racemo ascellare e su un pedicello, e sono lunghi dai 6 ai 13 mm. Il numero di baccelli per pianta può variare da pochissime unità ad oltre 1000. Il baccello è rigonfio, di forma romboidale, oblunga e ovale. Il riempimento dei baccelli dipende dal clima, solitamente varia dall'8,97 al 56,53% (Pundir et al., 1992).

Il cece è un'ottima fonte di carboidrati e proteine, queste ultime considerate di qualità migliore rispetto agli altri legumi. Presenta una quantità significativa di aminoacidi essenziali, fatta eccezione per quelli solforati che, però, possono essere integrati con l'aggiunta di cereali nella dieta quotidiana. Come tutti i legumi, anche i ceci contengono fattori anti-nutrizionali, i quali possono essere eliminati, o comunque ridotti, grazie a diverse tecniche di cottura.

In combinazione ad altri legumi e cereali, il cece presenta potenziali benefici per la salute umana, contribuendo alla prevenzione di malattie cardiovascolari, diabete di tipo II, malattie dell'apparato digerente ed alcune tipologie di cancro.

Negli ultimi tempi, la domanda di ceci è in crescente aumento a causa del loro elevato valore nutrizionale. Sono una buona fonte di carboidrati e proteine, ma anche di fibra, vitamine e minerali, sono poveri di grassi e privi di colesterolo. Inoltre, sono molto consumati anche per la loro versatilità: sono ottimi come tali e, allo stesso tempo, si prestano bene a svariate preparazioni (zuppe, insalate, hummus, farinate, falafel, burger vegetali, preparazioni dolci, etc...).

Dati recenti della FAO (Food and Agriculture Organization) sostengono che la produzione di ceci rappresenta circa il 13% della produzione di legumi totali in tutto il mondo, corrispondente a 9,96 milioni di tonnellate (FAO 2020).

### 1.1.1 Composizione chimica

Su 100 g di prodotto, il cece è costituito da circa 60,7 g di carboidrati (di cui circa 11 g di zuccheri), 17,4 g di fibra, 19,3 g di proteine e 6,04 g di grassi, aggiunti ad un quantitativo minore di micronutrienti quali vitamine e sali minerali (tabella 1).

Tab. 1. Valore nutrizionale di 100g di ceci.

fonte: U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2011.

Etichetta nutrizionale per 100 g di Ceci		
Valore energetico (calorie)	364	kcal
Proteine	19,3	g
Carboidrati	60,65	g
zuccheri	10,7	g
Grassi	6,04	g
saturi	0,626	g
monoinsaturi	1,358	g
polinsaturi	2,694	g
colesterolo	0	mg
Fibra alimentare	17,4	g
Sodio	24	mg
Alcol	0	g

#### 1.1.1.1 Energia

Tenendo sempre conto del fatto che la qualità nutrizionale può variare a seconda di molteplici fattori, come condizioni ambientali e climatiche, nutrizione e biologia del suolo, pratiche agronomiche e fattori di stress, si può approssimare che su 100 g di prodotto, il cece *desi* fornisce 14-18 MJ/kg (334-437 kcal/100 g), mentre *kabuli* 15-19 MJ/kg (357-446 kcal/100 g).

#### 1.1.1.2 Carboidrati

I carboidrati rappresentano la componente nutriente maggioritaria del cece e si distinguono in monosaccaridi, disaccaridi, oligosaccaridi e polisaccaridi.

I primi due, essendo di dimensioni minori, sono quelli a più pronto rilascio energetico. Nel cece i più ricorrenti monosaccaridi sono glucosio (0,7%), fruttosio (0,25%), ribosio (0,1%) e galattosio (0,05%) (Sanchez-Mata et al., 1998), mentre i disaccaridi più frequenti sono sucrosio (1-2%) e maltosio (0,6%).

Gli oligosaccaridi (2-4 unità monosaccaridiche) non vengono idrolizzati e assorbiti dal sistema digerente umano, pertanto passano nell'intestino dove possono essere idrolizzati dalla microflora intestinale, per questo motivo prendono il nome di fibra alimentare. Nel cece i più importanti sono raffiniosio (2,2%), stachiosio (6,5%), ciceritolo (3,1%) e verbascosio (0,4%). Ciceritolo e stachiosio rientrano nella categoria di oligosaccaridi denominata  $\alpha$ -galatto-oligosaccaridi (a-GOS), e costituiscono rispettivamente 50% e 35% di a-GOS totali. È stato dimostrato che un a-GOS ha un effetto diretto sulla composizione microbica intestinale, il che permette di promuovere la salute intestinale negli esseri umani (Fernando et al., 2010). Inoltre, è ipotizzabile che gli oligosaccaridi possano trovare coinvolgimento nei meccanismi antiossidanti e immunostimolatori nell'uomo, rientrando nella categoria dei prebiotici, importanti promotori della salute.

Infine, i polisaccaridi sono i carboidrati più complessi, costituiti da molte unità monosaccaridiche. Il principale polisaccaride dei ceci è l'amido (30-57%), composto a sua volta da amilosio e amilopectina, i quali differiscono tra loro per le diverse proprietà e sono essenziali insieme perché si formi il cosiddetto "granulo". A sua volta l'amido, in base alla digeribilità più o meno alta, può essere solubile, insolubile o resistente. La digeribilità dipende da specie di pianta, genotipo, caratteristiche chimiche e fisiche del granulo e metodo di preparazione dell'alimento.

### **1.1.1.3 Fibra alimentare**

La quota di carboidrati che non viene assorbita con la digestione prende il nome di fibra, la quale a sua volta può suddividersi in fibra solubile ed insolubile. La fibra solubile (generalmente costituita da oligosaccaridi), chiamata anche fibra alimentare, è quella che arriva all'intestino e viene scissa dalla microflora intestinale; mentre la fibra insolubile è quella che non viene scissa nemmeno a livello dell'intestino e, di conseguenza, viene eliminata attraverso le feci.

I legumi generalmente sono caratterizzati da un alto contenuto di fibra alimentare; infatti, nei ceci ne sono presenti ben oltre 17 g su 100 g. Un elevato contenuto di fibra alimentare nelle diete ha dimostrato di avere un effetto negativo sulla digeribilità dei nutrienti negli animali, soprattutto nei monogastrici (Choct et al., 1999; Hughes and Choct, 1999), ecco perché molti consumatori di ceci (e di legumi in generale) faticano a digerirli. Siccome la fibra è maggiormente contenuta nella "pellicola" esterna del legume, spesso è consigliato eliminarla per digerire meglio il prodotto.

C'è molta differenza riguardo il contenuto di fibra nelle tipologie *kabuli* e *desi* (rispettivamente 20-21% e 35-37%). Anche per questo motivo la tipologia *kabuli* è maggiormente consumata come tale, mentre *desi* si presta meglio a processi di trasformazione.

#### **1.1.1.4 Proteine e aminoacidi**

Le proteine rappresentano la seconda quota maggioritaria in termini di quantità, ma sono molto ben viste anche da un punto di vista qualitativo. Infatti, il cece è stato specificamente utilizzato per trattare la malnutrizione proteica “kwashiorkor” nei bambini (Krishna Murti, 1975).

Come risaputo, introdurre nella dieta le proteine è fondamentale, soprattutto per quel che riguarda gli aminoacidi essenziali, ovvero quegli aminoacidi che l'organismo umano non è in grado di autoprodurre. La composizione aminoacidica dei ceci è piuttosto bilanciata, costituita da alti livelli di lisina. L'unico limite riguarda gli aminoacidi solforati (metionina e cisteina), però è possibile compensare questa carenza accompagnando l'introduzione di ceci con quella di cereali che, contrariamente, sono poveri in lisina ma ricchi in aminoacidi solforati.

È stato osservato che il contenuto totale di proteine non è significativamente diverso tra varietà *kabuli* e *desi*, però le proteine della varietà *kabuli* presentano una maggiore capacità di assorbimento dell'olio rispetto a quelle della varietà *desi*. Ciò è dovuto alla presenza maggiore di aminoacidi apolari nella tipologia *kabuli* e, al contrario, meno presenti nella *desi*.

La solubilità delle proteine dei ceci risulta alta a valori di pH compresi tra 1 e 3 e tra 7 e 10, mentre raggiunge il minimo a pH 4, valore che rappresenta il punto isoelettrico delle proteine stesse (Boye et al., 2010).

Sapendo che la digeribilità del cece come tale è piuttosto limitata, germinazione e cottura dei semi di ceci possono contribuire ad aumentarla.

#### **1.1.1.5 Grassi**

I lipidi presenti nel cece si distinguono in poliinsaturi (62-67%), monoinsaturi (19-26%) e saturi (12-14%). Nonostante siano presenti in quantità minore rispetto a carboidrati e proteine, è stato rilevato che questa piccola quota abbia un effetto benefico specialmente per quanto concerne gli insaturi, mentre i saturi causano maggiormente danni come, ad esempio, problemi di tipo cardiovascolare.

Così come per le proteine, ci sono alcuni acidi grassi essenziali che devono essere obbligatoriamente introdotti con la dieta. I più importanti sono quelli omega-6 (acido linoleico) e omega-3 (acido linolenico). L'acido grasso maggiormente presente nei ceci è proprio il linoleico, che ha dimostrato un effetto ipocolesterolemizzante e

contribuisce a ridurre la probabilità di riscontrare aterosclerosi e malattie coronariche. Ecco perché gli alti livelli di acido linoleico presenti spiegano il basso livello di colesterolo in prove di alimentazione a base di ceci (Mathur et al., 1968; Jaya et al., 1979).

Il contenuto di acidi grassi dipende dalla cultivar (genotipo), dall'ambiente (tipologia di terreno, fattori climatici, malattie, parassiti, profilo stagionale in crescita) e dalla possibile interazione G x E. Alcuni studi di Gul et al. (2008) dimostrano che il cece piantato in autunno presenta un contenuto di acido oleico e linoleico rispettivamente del 35% e 63% sui grassi totali, mentre il cece piantato in primavera ne presenta rispettivamente 18% e 47%. Inoltre, questi studi hanno messo in chiaro che il contenuto di questi acidi, in media, nei ceci variava dal 21,23% al 30,52% e 51,77% e 60,79% rispettivamente per l'acido oleico e linoleico (Gul et al., 2008).

Il contenuto lipidico è anche il maggior responsabile del *flavour*, che nel caso dei ceci apporta un tipico aroma di “*nutty*” (nociola). Per contro, bisogna fare attenzione a fenomeni ossidativi, perché portano alla degradazione del prodotto e allo sviluppo di *off flavours*, con conseguente irrancidimento degli acidi grassi presenti. Lo sviluppo di *off flavours* può risultare un problema durante la conservazione dei ceci, perché comporta una riduzione della *shelf-life*, anche se questo è maggiormente verificato in legumi a maggiore contenuto lipidico, come arachide e soia.

### 1.1.1.6 Vitamine

Il cece possiede un alto contenuto di vitamine idrosolubili, tra cui vitamine del gruppo B (inclusi folati) e vitamina C, ma anche liposolubili come vitamina A, E e K (tabella 2).

Tab. 2. Vitamine nei semi di ceci.

Fonte: *British Journal of Nutrition* (2012), 108, S11–S26

Vitamins	Chavan <i>et al.</i> <sup>(12)*†</sup>	Wang & Daun <sup>(56)*†</sup>		Ciftci <i>et al.</i> <sup>(72)†‡</sup>	USDA <sup>(32)*†</sup>
		K	D		K
Retinol (A)	–	ND	ND	–	ND
Vitamin C	2.15–6.00	1.34	1.65	–	4.0
Vitamin (D <sub>2</sub> + D <sub>3</sub> )	–	ND	ND	115.4	ND
Thiamin (B <sub>1</sub> )	0.028–0.40	0.4	0.29	–	0.477
Riboflavin (B <sub>2</sub> )	0.15–0.30	0.26	0.21	–	0.212
Niacin (B <sub>3</sub> )	1.6–2.90	1.22	1.72	–	1.541
Pantothenic acid (B <sub>5</sub> )	–	1.02	1.09	–	1.588
Pyridoxine (B <sub>6</sub> )	0.55	0.38	0.30	–	ND
Cyanocobalamin (B <sub>12</sub> )	–	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, Kabuli; 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.

### **1.1.1.6.1 Vitamine idrosolubili**

Le vitamine del gruppo B solubili in acqua comprendono tiamina niacina (B3), acido pantotenico (B5), piridossina (B6) e acido folico (B9). I folati (vitamina B9) sono essenziali per la crescita di nuove vite, tanto che le donne in gravidanza devono assumere acido folico sotto forma di integratori perché devono introdurne il doppio. Il cece contiene 150-557  $\mu$ /g di folati. Ci sono evidenze su come l'acido folico aiuta a prevenire tumori indotti da DNA danneggiato (Christensen, 1996; Giovannucci et al., 1998; Coppen and BolanderGouaille, 2005).

L'acido L-ascorbico (vitamina C) è un forte antiossidante ed è necessario per la produzione di collagene nei tessuti connettivi e per la sintesi della carnitina (importante per il metabolismo degli acidi grassi). Il cece ne contiene 4 mg/100 g.

### **1.1.1.6.2 Vitamine liposolubili**

La vitamina A (retinolo) contribuisce al mantenimento della salute della mucosa delle membrane e della pelle, alla crescita ossea, alla riproduzione e alla vista. I ceci in realtà non contengono vitamina A di per sé, ma sono fonte di carotenoidi, ovvero i precursori della vitamina stessa. Ne esistono di moltissimi tipi, il più comune è il  $\beta$ -carotene, il quale è anche maggiormente presente negli alimenti. I carotenoidi sono responsabili della colorazione del cece; in base al quantitativo presente la colorazione può variare dall'arancione/rossastro al giallo.

La vitamina E esiste in almeno otto differenti forme sia per i tocoferoli che per i tocotrienoli, ma in natura sono presenti soltanto  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -tocoferolo e  $\alpha$  e  $\beta$ -tocotrienolo. La vitamina E è un antiossidante ancora più forte rispetto alla vitamina A e C. Contribuisce a limitare l'ossidazione del colesterolo delle lipoproteine LDL e previene la formazione di coaguli di sangue. Svolge anche un importante ruolo sulla funzione immunitaria, sulla riparazione del DNA e su altri processi metabolici. In letteratura è riportato che la forma  $\alpha$ -tocoferolo è la più attiva a livello dell'organismo umano come antiossidante, mentre la forma  $\gamma$ -tocoferolo è quella più potenzialmente protettiva contro le infiammazioni.

Infine, la vitamina K (fillochinone) è molto importante nella modificazione di alcune proteine, necessaria per coagulazione del sangue, metabolismo osseo e salute vascolare. Il cece contiene poca vitamina K rispetto ad altri vegetali a foglia, però ne ha più dei frutti e di molti prodotti animali (Nutrient Data Laboratory, USDA Agricultural Research Service, 2005).

### **1.1.1.7 Sali minerali**

I ceci sono molto ricchi in minerali come K, Ca, P, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu e Se perché il seme ed altre parti edibili della pianta riescono ad assorbirli dal terreno (Tabella 3). Pertanto, il cece è fonte per l'uomo di molteplici minerali essenziali, ma bisogna tener conto del fatto che la concentrazione di questi è comunque molto variabile e dipende dal genotipo e dalle condizioni ambientali e del suolo.

Tab. 3. Contributo di minerali di una singola porzione da 100 g di ceci secondo RDA o AI (Assunzione Adeguata) per adulti.

Fonte: [www.nap.edu](http://www.nap.edu)

Mineral	Maximum adult US RDA or AI <sup>a</sup> (mg)	Amount in 100g of cooked chickpea <sup>b</sup> (mg)	Percent contribution to adult RDA or AI
Potassium (K)	4700	291	6
Calcium (Ca)	1200	49	4
Phosphorus (P)	700	168	24
Magnesium (Mg)	420	48	11
Iron (Fe)	18	2.9	16
Zinc (Zn)	11	1.5	14
Manganese (Mn)	2.3	1.0	43
Copper (Cu)	0.9	0.35	39
Selenium (Se)	0.055	0.004	7

È possibile affermare che, per un adulto medio, consumare 100 g di ceci cotti apporta il 44% dell'assunzione giornaliera raccomandata di diversi minerali; per i bambini, lo stesso quantitativo fa sì che la dose venga addirittura superata.

Considerando i minerali maggiormente presenti, il potassio è coinvolto nel metabolismo energetico, svolgendo un ruolo critico nel mantenimento del potenziale di membrana cellulare; il fosforo è coinvolto in meccanismi di struttura e in diversi metabolismi fondamentali per l'uomo; il calcio detiene un ruolo fondamentale per lo sviluppo di ossa e denti.

## 1.2 LA FARINA DI CECI

La farina di ceci si ottiene dalla macinazione dei semi essiccati del cece. A livello industriale, il processo si compone di tutta una serie di fasi, ma volendo si può ottenere anche a livello casalingo.

Innanzitutto, si effettua una cernita dei semi per eliminare eventuali impurità rimaste dalla pianta o dai baccelli. A seguire, si pone la materia prima in ammollo per ammorbidirla e per eliminare più facilmente la "pellicola" esterna. A questo punto, i ceci vengono sciacquati e lasciati essiccare per poi essere macinati. In caso di macinazione a pietra si ottiene un prodotto di qualità superiore, altrimenti la macinazione viene effettuata in appositi cilindri. Una volta ottenuta la farina, questa viene confezionata in contenitori o sacchi per la distribuzione e il consumo. La scelta del metodo di estrazione influenza fortemente le caratteristiche delle proteine dei ceci;

pertanto, è necessario tenere in considerazione le proprietà che si desiderano ottenere nel prodotto finale quando si seleziona uno degli approcci produttivi (Aluko, 2018). Un vantaggio è dato dal fatto che la trasformazione della materia prima cece in farina mantiene quasi completamente tutte le proprietà del cece stesso: proteine vegetali, acidi grassi essenziali tra cui  $\alpha$ -linoleico, vitamine (gruppo B, C, A e K) e sali minerali. È scorretto dire che la farina di ceci è una sostituta alle farine comuni di cereali, in quanto i valori nutrizionali rispettivi sono diversi: come si può osservare in tabella 4, le farine di cereali contengono molti più carboidrati mentre quelle di legumi contengono più proteine. Si può però affermare che sono un'ottima alternativa, soprattutto se si vuole ottenere e/o consumare un prodotto a ridotto contenuto di carboidrati e più elevato contenuto proteico.

Tab. 4. Composizione approssimativa (g/100 g) di farina di frumento e farina di ceci. Lettere diverse nella stessa colonna rappresentano differenze significative ( $p < 0,05$ ).

Kind of flour	Chickpea Cultivar	Moisture	Crude protein	Crude fat	Crude fibre	Ash	Carbohydrates (by difference)
Wheat		10.81d	13.73a	1.40a	0.16a	0.78a	73.12c
Chickpea White	Andaluz	7.94b	24.65e	7.22f	1.36c	3.27b	55.56a
	Lechoso	8.02b	23.46cd	6.26d	1.14b	3.31b	57.81b
	Pedrosillano	8.47c	25.18f	4.62c	1.37c	3.46d	56.90ab
	Sinaloa	8.02b	23.09c	6.34de	1.41c	3.27b	57.87b
Chickpea Whole	Andaluz	7.98b	23.63d	6.87ef	2.72e	3.30b	55.50a
	Lechoso	7.44a	23.06c	6.76e	2.75ef	3.38c	56.61ab
	Pedrosillano	8.21bc	24.93ef	3.81b	2.78f	3.46d	56.81ab
	Sinaloa	7.26a	22.48b	6.58e	2.64d	3.44d	57.60b

Negli ultimi anni, data la spinta sempre maggiore del consumatore verso uno stile di vita sano ed equilibrato, le farine di legumi, tra cui la farina di ceci, hanno visto un aumento della domanda.

Come già ribadito, una caratteristica fondamentale di questa farina è “l’aroma di legume” che porta con sé. Questo è irrilevante per alcuni tipi di prodotti ma da tenere sotto controllo in altri. Ad esempio, se la si utilizza per ottenere una “fake” frittata l’aroma di cece può anche essere gradito, ma non si può affermare lo stesso se si vuole ottenere un prodotto da forno come, ad esempio, un biscotto.

## 1.3 CONSUMI E MERCATO

### 1.3.1 Consumi e mercato dei ceci

A livello globale, la produzione di ceci risulta essere molto eterogenea tra i diversi Paesi, raggiungendo un totale di circa 16,1 milioni di tonnellate (dati FAOSTAT del 2020). Questi dati stimano al primo posto l'India con ben oltre 9 milioni di tonnellate che corrispondono a circa il 67,7% del totale, seguita dall'Australia con 2 milioni di tonnellate (circa il 14% del totale), e il Myanmar al terzo posto con 0,6 milioni di tonnellate (circa il 4% del totale). A seguire, altri Paesi vedono produzioni minori, tra cui Etiopia, Turchia, Pakistan, Stati Uniti, Messico; tuttavia, ottenere dati relativi a produzione e commercializzazione di ceci risulta molto difficile, creando incertezza nella valutazione della produzione globale.

Nelle seguenti figure 2 e 3, sono riportati i dati forniti dalla FAO in cui si possono osservare: produzioni e superfici coltivate a livello globale e aumento annuale di rendimento dei ceci, a partire dall'anno 1961 fino al 2017, rispettivamente.

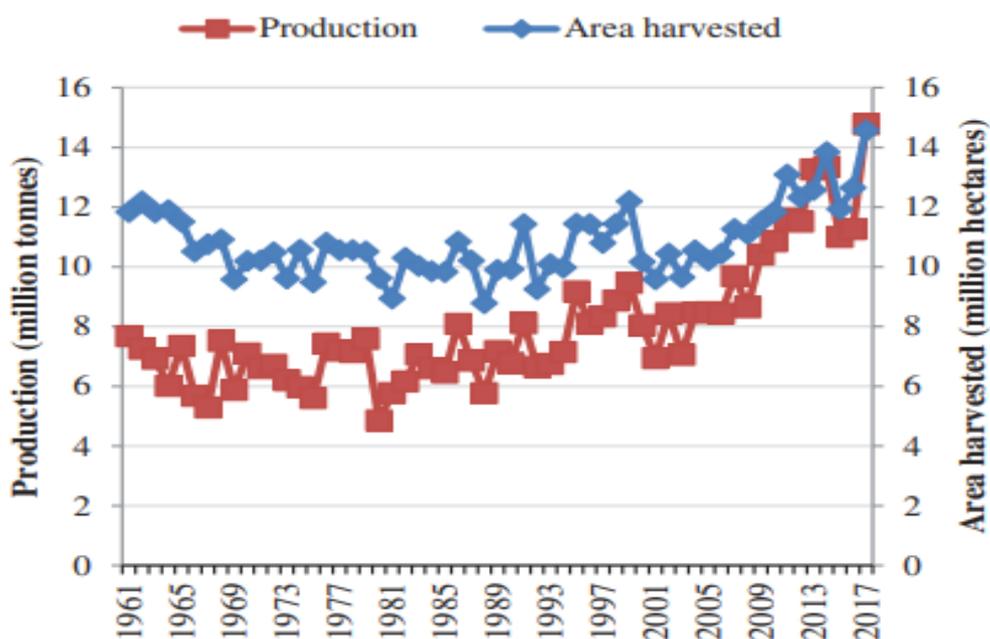


Fig. 2. Produzione (milioni di tonnellate) e superficie coltivata (milioni di ettari) di ceci in tutto il mondo, dal 1961 al 2017.

Fonte: Food and Agriculture Organization (FAO) (2019).

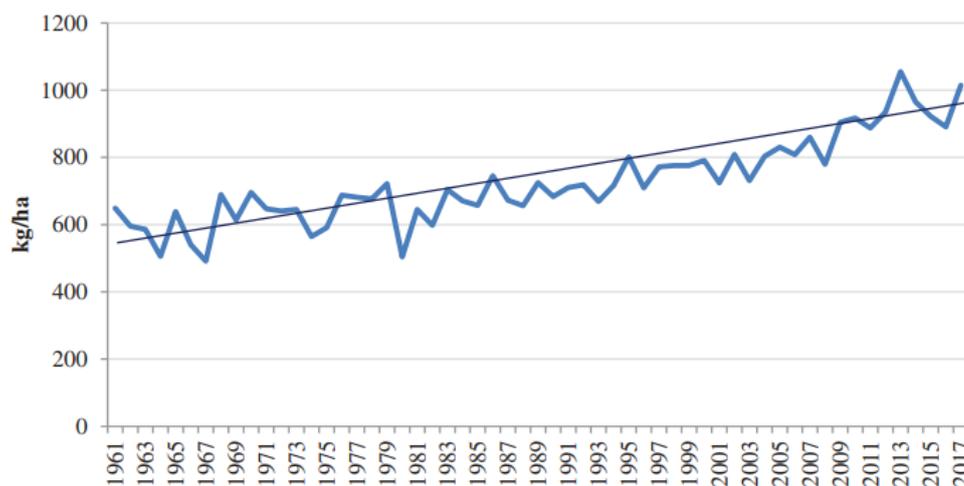


Fig. 3. Rendimenti mondiali annui di ceci (kg/ha) e linea di tendenza dal 1961 al 2017. Fonte: Food and Agriculture Organization (FAO) (2019).

Interessante è anche la produzione di ceci in Paesi in via di sviluppo, dove in certi luoghi supera addirittura, in termini di rendimento, la produzione in Paesi sviluppati. In Europa la produzione di ceci è più limitata, in quanto la maggior parte della domanda viene colmata dalle importazioni. Il maggior Paese produttore è la Spagna (200 mila tonnellate), seguita da Francia, Italia, Portogallo e Grecia.

In Italia, dati ISTAT stimano una produzione di circa 46 mila tonnellate nel 2020, concentrate maggiormente in zone del sud della penisola (Calabria, Puglia e Sicilia). Nonostante l'aumento della produzione rispetto agli anni precedenti, è necessario importare perché la produzione interna non soddisfa a pieno la domanda.

### 1.3.2 Consumi e mercato della farina di ceci

Analogamente ai ceci, anche per la farina di ceci si è osservato un aumento della domanda negli ultimi anni, in quanto la tendenza è quella di orientarsi verso un'alimentazione prettamente vegetale o, comunque, verso una diminuzione del consumo di carne e altri prodotti di origine animale. La farina di ceci è un ottimo ingrediente per diverse preparazioni a base vegetale, molto versatile ed utilizzata nei vari Paesi per diverse preparazioni. Ad esempio, al nord Italia la si utilizza per ottenere farinate, mentre nei Paesi orientali è molto comune utilizzarla per produrre hummus e falafel.

Secondo un rapporto di ricerca di Global Market Insights, Inc., il mercato globale della farina di ceci valeva 1,1 miliardi di dollari nel 2018 e dovrebbe raggiungere i 1,5 miliardi di dollari entro il 2025 (Size, 2019). Questa stima è dovuta all'aumento della consapevolezza del consumatore riguardo alla crescente domanda di alimenti vegetali e riguardo alla salute.

La popolarità della farina di ceci cresce sempre di più perché è vista dal consumatore come un ingrediente innovativo, alternativo alle farine tradizionali di cereali, privo di glutine e ricco in proteine, adatto anche a diete vegetariane e vegane.

La crescita di mercato più rapida è avvenuta in Asia Pacifica, dove è aumentato il consumo di alimenti a base di legumi e cereali. Anche Europa e America del Nord hanno visto un aumento della domanda, questa volta dovuto all'aumento della domanda di prodotti vegani e gluten-free.

Di conseguenza, il forte aumento della domanda ha portato ad un aumento della produzione stessa di farina di ceci. In India (maggior Paese produttore di ceci a livello globale) gran parte dei ceci prodotti sono utilizzati per produrre farina di ceci, a sua volta utilizzata per ottenere prodotti come il Bhaji, street food tipico della zona.

## 2. VALORIZZAZIONE DI FARINA DI CECI COME FONTE PROTEICA INNOVATIVA

Date alcune caratteristiche indesiderate tipiche della farina di ceci, tra cui l'“aroma di legume”, il carico microbico potenzialmente elevato (possibilità di sviluppo di microrganismi patogeni e degradativi e/o composti tossici) e la scarsa digeribilità, sono in atto studi e ricerche per trovare dei trattamenti che possano migliorare la matrice di partenza, in modo da utilizzarla per la formulazione di prodotti innovativi. Tra i vari trattamenti utilizzati ad effetto benefico sono presenti la fermentazione (pratica tradizionale) ed il trattamento HPH (*High Pressure Homogenization*). La fermentazione è un processo tradizionale già utilizzato in diversi ambiti, mentre il trattamento HPH è più innovativo e prevede l'utilizzo di alte pressioni di omogeneizzazione.

### 2.1 FERMENTAZIONE

La fermentazione è definita come un processo metabolico ATP-rigenerante che avviene in assenza di ossigeno, in cui i prodotti di scissione del substrato organico fungono sia da accettori sia da donatori di idrogeno.

Può anche essere descritta come un processo biologico nel quale i microrganismi convertono i substrati in nuovi prodotti, come enzimi, biomasse e metaboliti primari e secondari (Adebo et al., 2017).

È spontanea quando la specie microbica che svolge la fermentazione è selezionata dalle condizioni che si creano rispetto alla normale popolazione presente (condizioni di aw, pH, etc...), mentre è guidata se le condizioni di processo sono stabilite dall'operatore, per cui gli inoculi standard vengono selezionati in laboratorio.

Ciò che si verifica è una degradazione delle proteine ad opera di microrganismi fermentativi, che le idrolizzano a peptidi bioattivi (piccole molecole costituite da poche unità aminoacidiche) o aminoacidi liberi. Tra i microrganismi utilizzati nella fermentazione di alimenti e bevande, si possono menzionare muffe o funghi (es., *Aspergillus spp.*, *Mucor spp.*, e *Rhizopus spp.*), batteri (es., *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, e *Streptococcus spp.*) e lieviti (es., *Saccharomyces spp.*) (Borresen et al., 2012).

Solitamente, quando si utilizzano miscele di colture starter, ciò che si vuole ottenere è un processo chiamato proto-cooperazione, ovvero un'interazione tra diversi microrganismi che beneficiano l'uno dell'altro, nonostante riescano a sopravvivere anche separatamente (ad esempio, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* proto-cooperano durante la fermentazione per l'ottenimento dello yogurt).

La fermentazione è un processo applicato agli alimenti da molti secoli. Tra gli alimenti fermentati più conosciuti ed utilizzati a livello globale sono presenti salsa di soia, tempeh, miso e kombucha in Europa e Sud Asia; yogurt, formaggi, salami, kefir e quark in Europa e salse di peperoncino ed altri dall’Africa (Xiang et al., 2019). Oltre agli alimenti, anche molte bevande sono ottenute tramite il processo fermentativo, tra cui birra, the, caffè, vino e cedro. Anche il pane deriva dalla fermentazione di cereali; mentre sottaceti o olive derivano da frutta e vegetali fermentati (Campbell-Platt, 1994). Da sempre, la fermentazione è utilizzata come tecnica di conservazione e di ottenimento di cibi tradizionali e nutritivi. Più recentemente, è utilizzata anche per ottenere nuovi sapori, consistenze ed aromi, intenti a favorire il piacere gastronomico (Xu et al., 2019). Infatti, è un processo indispensabile per ottenere cambiamenti biochimici desiderati ed è volto a migliorare la sicurezza dei prodotti, ma permette anche di sviluppare nuovi aromi e consistenze e di arricchire la dieta in termini di valori nutrizionali (aumenta i composti desiderati e abbatte quelli indesiderati). Infine, permette di ridurre il consumo di energia perché riduce i tempi di cottura. Entrando più nel dettaglio, tra le funzioni che apporta agli alimenti si possono riscontrare:

- Funzione conservativa dovuta alla formazione di metaboliti ad attività antimicrobica;
- Miglioramento della sicurezza per inibizione di microrganismi patogeni e composti tossici, ad opera di agenti antimicrobici quali batteriocine, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, acidi organici e diacetile;
- Miglioramento del valore nutrizionale per produzione di aminoacidi essenziali, vitamine, minerali e acidi grassi a corta catena;
- Aumento della digeribilità del prodotto;
- Definizione della qualità organolettica del prodotto.

Alcuni alimenti sono fermentati per definizione, come quelli citati poco sopra, ma è ormai risaputo che la fase di fermentazione si può applicare anche dove non è strettamente necessaria, per l’ottenimento di un prodotto di più alta qualità.

Infatti, da qualche tempo viene applicata alle farine di legumi, tra cui la farina di ceci. Lo scopo è quello di aggiungere valore a questo ingrediente, per poterlo utilizzare come fonte proteica innovativa nella formulazione di prodotti innovativi.

La fermentazione della farina di ceci da parte di microrganismi selezionati può provocare una diminuzione significativa di acido fitico (90%), saponina (55%) e inibitori della tripsina (40%).

Inoltre, è stato scoperto che il processo di fermentazione contribuisce a migliorare diverse proprietà come consistenza, aroma e gusto; nonché miglioramenti nei livelli di aminoacidi essenziali tra cui metionina, cisteina, fenilalanina, tirosina e treonina rispetto alla farina non lavorata (Angulo-Bejarano et al., 2008).

Dal momento che i legumi hanno raggiunto negli anni un'enorme domanda globale, alimenti a base di legumi fermentati saranno sempre più presenti sugli scaffali dei supermercati. Pertanto, sono molto richieste in tutto il mondo sia nuove tecniche di fermentazione sicure sia un approccio di ricerca più sistematico.

## **2.1.1 Microrganismi fermentativi**

### **2.1.1.1 Batteri lattici (LAB)**

La fermentazione è un processo che avviene ad opera di microrganismi. Quelli maggiormente attivi, solitamente predominanti nelle fermentazioni, sono i batteri lattici. Sono Gram positivi, omofermentanti o eterofermentanti, possono essere sporigeni o asporigeni e possono fermentare sia monosaccaridi esosi e pentosi sia disaccaridi. Hanno un'elevata attività proteolitica ma sono molto esigenti a riguardo; infatti, non riescono a sintetizzare tutti gli aminoacidi a partire da azoto inorganico. Contrariamente, hanno attività lipolitica scarsa. Inoltre, sono produttori di esopolisaccaridi (capsule attaccate alla cellula o materiale escreto nel mezzo, importanti per la struttura e le proprietà funzionali) e di batteriocine (sostanze proteiche GRAS a ristretto spettro d'azione che inibiscono la crescita di altri batteri, tra cui degradativi e patogeni).

Un aspetto molto importante è che, grazie al miglioramento di sapore e consistenza che apportano i LAB con la fermentazione agli alimenti, la domanda degli stessi aumenta.

#### **2.1.1.1.1 *Lactiplantibacillus plantarum***

*Lactiplantibacillus plantarum* è un batterio lattico appartenente alla famiglia delle *Lactobacillaceae*, genere *Lactiplantibacillus*, specie *plantarum*. Appartenendo al genere *Lactiplantibacillus* presenta una forma bacillare, che può variare da 0,5 a 10 micron di larghezza. È Gram positivo, anaerobio aerotollerante e asporigeno. È un batterio lattico molto versatile e flessibile, cresce a valori di pH compresi tra 3,4 e 8,8 e in un range di temperatura che va da 12°C a 40°C, ma non cresce oltre i 45°C.

Possiede un metabolismo omofermentante - eterofermentante facoltativo, quindi può condurre fermentazione omolattica producendo lattato oppure eterolattica producendo lattato più etanolo. In presenza di pentosi, quest'ultimo viene subito convertito ad acetato. Ha un sistema proteolitico complesso, riesce a degradare i peptidi ma anche a sintetizzare aminoacidi *ex-novo*.

### 2.1.1.2 Lieviti

I lieviti sono funghi unicellulari che non operano una vera e propria fermentazione, bensì una lievitazione biologica. Tutti hanno metabolismo ossidativo aerobio (respirazione), mentre solo alcuni, in assenza di ossigeno, hanno un metabolismo fermentativo. Si riproducono per via asessuata (tramite gemmazione/scissione) oppure sessuata (con conseguente formazione di spore).

#### 2.1.1.2.1 *Debaryomyces hansenii*

*Debaryomyces hansenii* è un lievito appartenente alla famiglia delle *Saccharomycetaceae*, genere *Debaryomyces*, specie *hansenii*. È un lievito osmo-, halo- e xerotollerante.

Presenta range di temperature ottimali di crescita tra 20°C e 25°C, ma è capace di sviluppare anche tra 5°C e 10°C, e *D. hansenii var. hansenii* cresce addirittura a 35°C. Per quel che riguarda la tolleranza al pH, la crescita di *D. hansenii* è molto debole a pH 2,5 ma ha una buona crescita nell'intervallo di pH 3-8 (Butinar et al., 2005).

A pH 5 ha una buona tolleranza al sale, e questa capacità scende a valori di pH di 3 e 7. Inoltre, presenta un'elevata tolleranza al ClO<sub>2</sub> (biossido di cloro, potente biocida). È produttore di tossine, tra cui micocine, che utilizza per distruggere altre specie di lievito competitive.

Ha la capacità di sintetizzare molecole antimicrobiche quali acido caprilico e acido caproico, che conferiscono attività antibatterica e antifungina al lievito stesso. Queste proprietà lo rendono un organismo di interesse nel campo della biotecnologia ambientale e medica (Gullo et al., 2014).

La sua presenza è molto comune nei formaggi sia molli sia duri e semiduri, ma anche in carni tra cui salsicce senza pelle, salsicce solfite e non solfite e carni macinate.

La quasi totalità dei ceppi è aploide, con conseguente riproduzione vegetativa che avviene per gemmazione multilaterale. Più raramente, alcuni si accoppiano e diploidizzano, ma solo in forma transitoria, ossia avviene la fusione delle due cellule ad esclusione dei nuclei.

## 2.2 TRATTAMENTO HPH (High Pressure Homogenization)

Da diverso tempo è risaputo che i trattamenti termici classici applicati agli alimenti, che hanno lo scopo di migliorarne e allungarne la shelf-life e migliorarne la sicurezza microbiologica, apportano agli alimenti stessi diverse caratteristiche indesiderate; ad esempio, provocano la perdita di molti composti nutrizionali come vitamine e sali minerali, cambiamenti di colore, sapore e texture. Per tale motivo, sono in atto ricerche verso trattamenti innovativi che possano avere gli stessi effetti sul prodotto, o

addirittura migliorarlo. In primo luogo, il miglioramento è ricercato da un punto di vista di sicurezza microbiologica (deve eguagliare il trattamento classico e abbattere microrganismi potenzialmente patogeni e/o degradativi) e, secondariamente, si cerca di influire meno sul prodotto finito, utilizzando trattamenti principalmente non termici, in modo da non alterare le caratteristiche organolettiche e sensoriali, o ancor meglio migliorarle ed esaltarle.

Nonostante la maggior parte di queste tecnologie non termiche sia stata utilizzata in primo luogo come alternativa al trattamento termico per l'inattivazione microbica (Knorr, 1999; Knorr, Zenker, Heinz, & Lee, 2004; Lado & Yousef, 2002; Shah, 2007; Wan, Coventry, Sanguansri, & Versteeg, 2009), diverse prove hanno dimostrato la loro abilità in campo funzionale.

A tal proposito, un trattamento innovativo valido è quello che prevede l'utilizzo di alte pressioni di omogeneizzazione (trattamento HPH - *High Pressure Homogenization*), finalizzate soprattutto a migliorare la sopravvivenza di ceppi positivi (come, ad esempio, microrganismi probiotici) e a migliorare la funzionalità complessiva degli stessi. Il trattamento HPH ha recentemente dimostrato buone potenzialità nella formulazione di alimenti funzionali, principalmente probiotici. Infatti, nel settore lattiero-caseario funzionale, è stato proposto per la produzione di latti e formaggi fermentati probiotici con proprietà sensoriali o funzionali migliorate, nel senso di miglioramento della vitalità del ceppo rispetto allo stoccaggio refrigerato e alla cinetica di fermentazione accelerata (Burns, Patrignani, et al., 2008; Patrignani et al., 2009). Inoltre, Lanciotti et al. (2007) hanno dimostrato che l'HPH, in funzione allo sforzo e al trattamento applicato, è in grado di modificare sia la cinetica di fermentazione sia l'attività enzimatica di batteri lattici starter e non starter senza avere effetti dannosi sulla vitalità cellulare.

Il trattamento HPH appartiene alla classe delle "tecnologie emergenti" e viene utilizzato nel settore alimentare in diverse applicazioni come preparazione di nanoemulsioni, inattivazione microbica ed enzimatica, distruzione cellulare per estrazione dei componenti intracellulari e modifica di strutture di biopolimeri alimentari per guidarne le funzionalità. Tutti questi effetti sono resi possibili grazie alle intense sollecitazioni che il trattamento applica durante il passaggio del prodotto attraverso la valvola di omogeneizzazione.

Diversi studi hanno valutato gli effetti dell'HPH sulla modifica di proprietà reologiche, termiche e microstruttura delle proteine del cece in dispersione. Whang et al. (2022) hanno studiato l'effetto combinato di trattamenti ad ultrasuoni e pH sulle proprietà schiumogene di un isolato proteico di cece, ed hanno scoperto che era caratterizzato da proprietà emulsionanti ideali alla forza ionica e all'ambiente di pH appropriati.

Altri studi hanno dimostrato che i vantaggi dell'HPH sono stati applicati nel settore alimentare a diversi prodotti, come isolati di soia proteici, dispersioni di farina di buccia di pompelmo e maionesi a ridotto contenuto di grassi. In sintesi, il trattamento

risulta essere un mezzo consolidato per modificare le proprietà funzionali di proteine e polisaccaridi (Alvarez-Sabatel et al., 2015). Tuttavia, questi studi non sono stati segnalati. Pertanto, è stato studiato come il trattamento HPH modifica la dispersione proteica di ceci, come un potenziale modo per migliorare le proprietà funzionali della dispersione stessa, tra cui proprietà reologiche, omogeneità granulometrica delle micelle proteiche e solubilità proteica. Ciò ha contribuito ad ampliare la vasta gamma di applicazione dei ceci nell'industria alimentare.

Sulla farina di ceci, applicando il trattamento HPH contemporaneamente al trattamento termico tradizionale, sicuramente si verifica un effetto sinergico sulle proprietà reologiche delle sospensioni; tuttavia, l'effetto sulla distribuzione e sulla stabilità gelo-disgelo è limitata.

### **2.2.1 Funzionamento**

Il trattamento non termico HPH funziona grazie alla pressione dinamica, applicando uno stress meccanico che comporta turbolenza, cavitazione e taglio. Modifica le proprietà del fluido e dei suoi componenti, quindi influenza la struttura di amido e proteine. Provoca riduzione del diametro delle particelle, cambiamento di solubilità, modifiche di interazione, alterazione della viscosità e altri cambiamenti chimico-fisici. Per quanto concerne l'effetto sull'amido, la ricerca ha dimostrato l'impatto che questo trattamento ha in particolar modo sulla reologia e sulle proprietà termiche. Una maggiore concentrazione di amido tende a dare maggiore viscosità della sospensione, che a sua volta provoca una maggiore resistenza dei sistemi amidacei agli effetti del trattamento.

Per le proteine, Zhao et al. hanno studiato l'effetto del livello della pressione del trattamento su aggregazione proteica e conformazione strutturale, ed è stato scoperto che l'HPH influenza principalmente la struttura secondaria della maggior parte delle proteine globulari.

### 3. OBIETTIVI

Per soddisfare le richieste di mercato più recenti, i produttori di alimenti sono alla ricerca di prodotti ad alto valore nutrizionale, preferibilmente vegetali, perché visti come più salutari dal consumatore. A tal proposito, il cece (*Cicer arietinum L.*) risulta un'ottima materia prima per l'ottenimento di questi prodotti perché è di origine vegetale, senza glutine, economico, facilmente reperibile e ottimo sia da consumare come tale sia se lavorato per ottenere prodotti più complessi. Inoltre, presenta una tabella nutrizionale gradita dal consumatore, perché rappresenta una buona fonte di proteine, di fibra alimentare, di sali minerali e vitamine.

Oltre ad essere utilizzato come tale, il cece può essere essiccato e macinato per l'ottenimento di una farina. La farina di ceci si differenzia dalle classiche farine di cereali perché presenta un contenuto maggiore di proteine; quindi, può essere utilizzata come alternativa alla classica farina di grano, in modo da ricavarne un prodotto più proteico e meno ricco in carboidrati.

Diversi studi hanno confermato che la farina di ceci (così come le farine di legumi in generale) presenta benefici maggiori in seguito al processo fermentativo condotto con microrganismi selezionati. Infatti, il beneficio nutrizionale dei legumi può essere migliorato mediante trattamenti come la fermentazione prima della loro incorporazione come ingredienti in formulazioni alimentari (Angulo-Bejarano et al., 2008). Ciò è dimostrato dal fatto che i processi biotecnologici come la fermentazione sono metodi semplici ed economici utilizzati per migliorare le proprietà funzionali e i valori nutraceutici dei prodotti a base di legumi, provocando cambiamenti desiderabili nella disponibilità di nutrienti, consistenza e caratteristiche fisico-chimiche (Angulo-Bejarano et al., 2008, Song et al., 2008).

La fermentazione svolta da microrganismi appartenenti a specie diverse produce una gamma molto vasta di metaboliti e composti con funzionalità differenti. I microrganismi che maggiormente prendono il sopravvento nelle fermentazioni sono i batteri lattici, ma anche alcuni lieviti possono partecipare attivamente alla modificazione della matrice di partenza. Questi microrganismi agiscono su macromolecole come carboidrati, lipidi e proteine, completando la digestione e l'idrolisi degli alimenti e, quindi, migliorandone la qualità e la digeribilità.

Inoltre, recentemente, l'interesse nei confronti dei trattamenti non termici, tra cui il trattamento HPH (*High Pressure Homogenization*), sta aumentando. Il trattamento HPH apporta alle miscele di farina di ceci delle sollecitazioni meccaniche quali turbolenza, cavitazione e taglio, che permettono di modificare le proprietà del fluido e dei suoi componenti, influenzando la struttura di amido e proteine. Provoca diversi cambiamenti, tra cui riduzione del diametro delle particelle, cambiamento di solubilità, modifiche di interazione, alterazione della viscosità e altri cambiamenti chimico-fisici. L'applicazione di un trattamento non termico come le alte pressioni di

omogeneizzazione combinate al processo fermentativo potrebbero favorire il rilascio di composti della matrice a favore del metabolismo microbico. Pertanto, a questo proposito, lo scopo della tesi è stato quello combinare il processo fermentativo con il trattamento ad alte pressioni di omogeneizzazione al fine di valutare l'effetto della fermentazione, del processo HPH e della combinazione fra i due, sul contenuto proteico, la capacità antiossidante, il colore e la composizione in molecole volatili di una matrice composta da farina di ceci ed acqua.

Nello specifico, in seguito a prove preliminari è stato possibile selezionare alcuni microorganismi in grado di conferire le migliori caratteristiche alla farina di ceci fermentata, da un punto di vista organolettico, nutrizionale e funzionale. In particolare, questa sperimentazione ha previsto l'utilizzo del lievito *Debaryomyces hansenii* Y15A e del batterio lattico (LAB) *Lactiplantibacillus plantarum* LP23. Una parte di farina di ceci idratata con acqua (rapporto 1:2 p/p farina-acqua) è stata sottoposta ad un trattamento HPH e successivamente è stata inoculata con ciascun microorganismo selezionato, mentre la restante parte è stata inoculata con il lievito o il batterio lattico immediatamente dopo la produzione, senza subire il trattamento.

La prova è stata condotta in doppio ed un'aliquota di ogni singolo campione è stata prelevata ogni 24 ore durante la fermentazione per valutare per il contenuto microbico e pH.

Infine, in seguito alla liofilizzazione dei campioni dopo differenti tempi di fermentazione, sono stati valutati il contenuto proteico, la capacità antiossidante e il contenuto in fenoli totali, il colore e il profilo in molecole volatili delle matrici.

## 4. MATERIALI E METODI

### 4.1 CONDIZIONI DI CRESCITA DEI CEPPI DI BATTERI LATTICI E LIEVITI

Durante la sperimentazione sono stati utilizzati i ceppi di lievito *Debaryomyces hansenii* Y15A, isolato da carne essiccata, e di LAB *Lactiplantibacillus plantarum* LP23, isolato dalla feccia, appartenenti alla collezione del Dipartimento di Scienze Agricole e Alimentari dell'Università di Bologna.

Prima dell'utilizzo, i ceppi sono stati ripresi e rinfrescati in terreno di coltura appropriato per due volte. Il LAB è stato coltivato su terreno MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) broth (Oxoid, Basigstone, UK) e incubato per 24 ore a 37°C, mentre il lievito è stato coltivato su YPD (Yeast Peptone Destrose) broth (Oxoid, Basigstone, UK) e incubato a temperatura ambiente per 48 ore, in agitazione.

Al momento dell'utilizzo sono stati sciacquati due volte con fisiologica sterile (0,9% NaCl) e centrifugati a 13000 rpm per separare il surnatante ed allontanarlo. Dopo di che, sono stati sospesi nuovamente in soluzione fisiologica sterile e conservati in frigorifero a 4°C fino al momento dell'utilizzo.

### 4.2 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE E TRATTAMENTO HPH

I campioni utilizzati nella sperimentazione sono stati ottenuti miscelando farina di ceci proveniente dal Molino Maraldi di Cesena (figura 5) con acqua di bottiglia in rapporto 1:2 (1,5 kg di farina e 3,0 kg di acqua).



Fig. 4. Confezione di farina di ceci proveniente da Molino Maraldi e composizione nutrizionale.

Metà della miscela ottenuta è stata trattata con alte pressioni di omogeneizzazione, mentre la restante parte è stata utilizzata come controllo non trattato. Il trattamento di omogeneizzazione è stato effettuato utilizzando un omogeneizzatore continuo ad alta pressione PANDA (Niro SoaviGEA, Parma, Italia).

Il trattamento ad alta pressione è stato eseguito una sola volta alla pressione di 90 MPa e la miscela trattata è stata raffreddata utilizzando uno scambiatore termico (GEA, Parma, Italia).

Le miscele trattate e non trattate sono state inoculate singolarmente a concentrazione di circa 8 Log UFC/g per il ceppo *L. plantarum* LP23 e circa 7 Log UFC/g per *D. hansenii* Y15A. I campioni sono stati preparati in doppio, per un totale di quattro campioni per ogni microrganismo inoculato (due non trattati e due trattati con HPH), e sono stati incubati, in relazione al microrganismo inoculato, in specifiche condizioni di temperatura e concentrazione di ossigeno. I campioni inoculati con il LAB sono stati posti in vasetti da 500 ml con tappo a vite e incubati a 30°C, con il tappo svitato parzialmente e mantenuti in staticità per ridurre il contenuto di ossigeno all'interno della miscela. Diversamente, i campioni inoculati con il lievito sono stati posti in beute da 1 L ed incubati a temperatura ambiente mantenuti in costante agitazione, per garantire il contatto della miscela con l'aria.

I campioni inoculati, trattati e non trattati all'HPH, sono stati messi a confronto con due campioni di controllo, uno non trattato e uno trattato con alte pressioni di omogeneizzazione, anch'essi prodotti in doppio, ottenuti nelle medesime condizioni descritte precedentemente ma privi di inoculo.

I campioni di controllo non inoculati sono stati direttamente stoccati a -20 °C in attesa delle prove successive, mentre i restanti campioni sono stati incubati per 48 e 72 ore se inoculati rispettivamente con *L. plantarum* LP23 e *D. hansenii* Y15A. Il colore, la curva di crescita e di acidificazione dei campioni incubati sono stati monitorati con cadenza di 24 ore, mentre dopo 24 e 48 ore per i campioni inoculati con il LAB e 48 e 72 ore per i campioni inoculati con il lievito, sono state prelevate aliquote per le prove successive. I campioni sono stati liofilizzati prima di procedere all'analisi del contenuto proteico e della capacità antiossidante.

### 4.3 ANALISI MICROBIOLOGICHE

Nell'arco delle 48-72 ore totali di incubazione, è stato effettuato un campionamento in piastre Petri ogni 24 ore, per monitorare le curve di crescita ed il profilo microbiologico dei campioni. Le diluizioni seriali necessarie sono state effettuate prelevando 100 µl di campione posti in 900 µl di fisiologica sterile, posta a sua volta all'interno di eppendorf

precedentemente preparate e conservate in freezer. Ogni diluizione è stata ottenuta prelevando i 100 µl dalla eppendorf precedente e ponendoli in un'altra eppendorf contenente solo fisiologica, e così via.

I campionamenti microbiologici sono stati effettuati su differenti terreni, tramite la tecnica dello spatolamento superficiale (ad esempio, sono stati prelevati 100 µl dalla eppendorf “-1” e spatolati in piastra, durante questo passaggio si effettua una diluizione, pertanto la piastra sarà nominata “-2” e così via).

I terreni di coltura utilizzati sono i seguenti:

- MRS+C (De Man, Rogosa e Sharpe addizionato di Cicloesimide): terreno selettivo che permette di testare la crescita dei batteri lattici (in particolare genere *Lactiplantibacillus*), infatti contiene al suo interno Cicloesimide, ovvero un antibiotico che inibisce la crescita dei lieviti. È costituito da digerito enzimatico di caseina, estratto di carne e di lievito e glucosio che garantiscono la disponibilità di nutrienti, inoltre da manganese fosfato, magnesio e poliossietilenesorbitano monooleato che servono a stimolare la crescita. È selettivo grazie alla presenza di sodio citrato e ammonio solfato che permettono la crescita dei batteri lattici ma non quella di altri microrganismi;
- YPD+C: terreno selettivo che permette di testare la crescita dei lieviti, infatti contiene Cloramfenicolo, ovvero un antibiotico che inibisce la crescita dei batteri lattici. I lieviti, essendo microrganismi cellulari eucarioti ed eterotrofi, necessitano di una fonte di carbonio per crescere. Questa fonte è rappresentata da destrosio, mentre i nutrienti sono rappresentati da aminoacidi forniti da estratto di lievito e peptone, presenti nella formulazione del terreno stesso;
- PCA (Plate Count Agar): diversamente dai precedenti, questo è un terreno non selettivo; infatti, viene utilizzato per valutare la conta dei mesofili totali aerobi e anaerobi facoltativi (se messo in giara) eterotrofi, quindi la carica batterica totale. È costituito da estratto di lievito, glucosio e triptone.

Le piastre contenenti terreno MRS+C sono state incubate a 30°C in condizioni di anaerobiosi, mentre quelle contenenti YPD+C e PCA sono state incubate a temperatura ambiente.

#### **4.4 DETERMINAZIONE DEL pH**

Ogni 24 ore di incubazione, in seguito al campionamento, è stata effettuata la misura del pH tramite pH-metro (Metter-Toledo, Switzerland). La procedura è stata eseguita inserendo la sonda dello strumento, dopo eventuale taratura necessaria dello stesso, all'interno di falcon da 15 ml contenenti i campioni. Ogni lettura è stata effettuata in doppio.

## 4.5 QUANTIFICAZIONE DI PEPTIDI E PROTEINE SOLUBILI

### 4.5.1. Estrazione proteine da farine di legumi

L'estrazione è effettuata con la soluzione tampone Tris-Base 50 mM, con pH 8,5 e temperatura ambiente in rapporto 1:10 w/v (peso/volume) tra campione liofilizzato e solvente. L'operazione è stata condotta in falcon da 15 ml, i quali sono stati posti in agitazione per un'ora per fare in modo che il prodotto solubilizzasse e avvenisse l'estrazione. Dopo di che, i falcon sono stati centrifugati per 10 minuti a 15000 rpm. Il surnatante, ovvero la parte d'interesse, è stato separato dal precipitato e filtrato tramite filtri Whatman da 0,4 µm. A questo punto, l'estratto proteico pronto per le analisi successive (in caso di necessità può essere diluito) è stato conservato a -20°C in congelatore all'interno di falcon.

Per preparare la soluzione tampone Tris-Base è necessario conoscere il suo peso molecolare (121,14 mg/mmol), mentre la molarità è definita dal protocollo (50 mM = 0,05 mol/l). In base al volume che si vuole preparare, è possibile calcolare il peso di Tris-Base da misurare. La formula applicata è la seguente:

$$g = V * \text{peso molecolare} * \text{molarità}$$

Nel caso della preparazione di un 1 L di soluzione si preparano prima 700 ml, poi man mano si aggiusta il pH con piccole aliquote di HCl, fino al raggiungimento di un valore di pH pari a 8,5. Infine, si porta a volume in un matraccio da 1 L.

### 4.5.2 Analisi OPA

L'analisi OPA permette di valutare la quantità di peptidi presenti nei campioni di farina di ceci fermentata non trattati e trattati con HPH. È un saggio spettrofotometrico semplice, rapido e sensibile, che utilizza l'o-ftalaldeide per determinare la proteolisi che avviene nel campione. L'applicazione del saggio OPA per la valutazione del grado di idrolisi delle proteine del campione rispecchia l'abilità nel misurare gli amino gruppi rilasciati nel corso della fermentazione. Un vantaggio di questo saggio è la capacità di determinare in maniera precisa il numero di legami peptidici rilasciati durante l'idrolisi del substrato contenente le proteine. Questi amino gruppi rilasciati tramite idrolisi reagiscono con l'o-ftalaldeide e con il β-mercaptoetanolo, formando un composto che assorbe a 340 nm (figura 5).

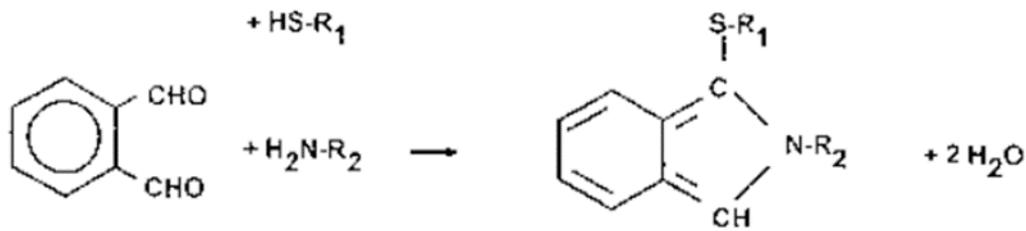


Fig. 5. OPA reagisce con l'amino gruppo per formare un composto che assorbe a 340 nm (Nielsen, Petersen & Dambmann, 2001).

L'assorbanza non è influenzata dall'ambiente circostante, ma è simile per tutti gli amino gruppi; pertanto, le proteine vengono denaturate dal sodio dodecilsolfato (SDS). Quindi, il background è costante per ogni singolo campione e gli amino gruppi rilasciati dalla proteolisi si possono quantificare accuratamente e in modo semplificato. L'inclusione dell' SDS nel saggio favorisce il termine della proteolisi e completa la reazione degli amino gruppi.

L'analisi è stata effettuata in doppio, al termine della fermentazione, sia sui campioni di farina di ceci non trattati e trattati con HPH, sia sui i controlli.

Come prima cosa, è stato necessario preparare il reagente OPA liquido: sono stati pesati 25 ml di sodio tetraborato 100 mM, 2,5 ml di SDS 20%, 100 µl di β-mercaptoetanololo e 1 ml di metanolo nel quale sono stati disciolti 40 ml di polvere OPA. Il tutto è stato portato a volume con acqua distillata fino a 50 ml.

La soluzione è stata conservata a 37°C fino al momento dell'utilizzo.

I campioni inoculati ed i controlli sono stati diluiti con acqua distillata in rapporto 1:50. In ogni cuvetta sono stati inseriti 950 µl di soluzione OPA e 50 µl di campione, dopo di che la cuvetta è stata mixata per favorire il mescolamento tra le due parti e posta al buio per due minuti a temperatura ambiente. Passato questo tempo, è stata letta l'assorbanza a 340 nm allo spettrofotometro (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Giappone). Il tempo di reazione dell'analisi è molto breve ed è necessario un solo reagente (soluzione OPA) per inibire le attività enzimatiche e sviluppare il colore di reazione che permette di registrare l'assorbanza a 340 nm.

Per l'analisi è stata, inoltre, costruita una retta di taratura utilizzando l'aminoacido serina a varie concentrazioni: 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,01 mg/ml. È stata scelta la serina in quanto generalmente mostra una risposta molto simile alla media di quelle degli aminoacidi (Nielsen, Petersen & Dambmann, 2001). L'equazione della curva di calibrazione con serina ha permesso di calcolare la concentrazione dei peptidi presenti nei campioni.

#### 4.5.3 Analisi Bradford

L'analisi Bradford è una procedura analitica strumentale volta a determinare il contenuto in proteine di una soluzione.

Il reagente Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate) è stato preparato seguendo le istruzioni sul contenitore posto in frigorifero. Il volume di reagente si sceglie in base al numero di campioni e alle concentrazioni dello standard che si hanno, tenendo conto che serviranno 2,5 ml di reagente in ogni cuvetta con campione o standard secondo quanto indicato nell'etichetta della soluzione.

I passaggi da effettuare sono i seguenti:

- Diluire 1 parte di reagente concentrato con 4 parti di acqua distillata, ponendo in una bottiglia coperta con alluminio. Filtrare con filtri Whatman da 0,25 µm per eliminazione di eventuali particelle. Questo reagente può essere utilizzato per circa due settimane se conservato a temperatura ambiente;
- Preparare varie diluizioni della proteina standard BSA che siano rappresentative della soluzione da testare: preparare una soluzione stock pesando 20 mg in 10 ml, per avere la soluzione a 2 mg/ml, poi procedere con le diluizioni 1, 0,8, 0,5, 0,3, 0,2, 0,1 mg/ml;
- Il campione estratto con Tris-base (vedi paragrafo 4.5.1 Estrazione proteine da farina di legumi) può essere diluito di un fattore 1:10 con acqua distillata;
- Porre 100 µl di ogni campione e concentrazione dello standard (BSA) in falcon e aggiungere 5 ml di reagente preparato, poi vortexare. In alternativa, porre 50 µl di campione o standard direttamente in cuvetta e aggiungere lì 2,5 ml di reagente preparato e mixare;
- Lasciare in incubazione per almeno 5 minuti a temperatura ambiente e in oscurità. L'assorbanza incrementa nel tempo, quindi i campioni non dovrebbero essere incubati per oltre un'ora di tempo;
- Misurare l'assorbanza a 595 nm.

Per l'analisi, i campioni inoculati con il batterio lattico sono stati diluiti con acqua distillata in rapporto 1:10, quelli inoculati con il lievito sono stati diluiti in rapporto 1:50, mentre i controlli in rapporto 1:100.

#### **4.6 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)**

L'SDS-PAGE è un'analisi analitica che permette di analizzare gli estratti proteici. Il principio su cui si basa è l'attività denaturante dell'SDS. Quest'ultimo ha la capacità di interagire con le proteine in un rapporto costante 1,4 g di SDS per ogni grammo di proteina. Quindi, la separazione avviene per differenza tra pesi molecolari dato che il rapporto massa/carica per ogni proteina denaturata rimane costante.

L'elettroforesi su gel dei campioni di ceci è stata determinata con il metodo Laemmli: 20 mg di campione di farina di ceci liofilizzata vengono disciolti in 500 µl di soluzione, composta da 250 µl di acqua distillata sterile e 250 µl di Laemmli 2x.

2x Laemmli sample Buffer: (65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8, 26,3%(w/v) glycerol, 2,1% SDS, 0,01% bromophenol blue) Aggiungere 50 µl di 2-mercaptoetanololo per 950 µl.

I campioni sono stati bolliti per 5 minuti a 13600 rpm per 10 minuti.

Se si vogliono vedere solo le proteine denaturate che non sono state tagliate da una idrolisi non usare mercaptoetanolo e non bollire i campioni dopo l'aggiunta di Laemmli.

Successivamente, i campioni sono stati caricati in una quantità di 10 µl e fatti correre in gel a una corrente costante di 50 mA per 30 minuti e aumentata a 90 mA fino a che le bande blu non sono arrivate in fondo al gel. Il Marker è stato caricato in quantità di 5 µl.

Running Buffer: glicina (28,8 g/L), Tris-HCl (2 g/L), pH 8,3 (filtrare con rampa).

Il gel è stato colorato con 0,1% Coomassie Brilliant Blue e decolorato con Destaining buffer.

Destaining Buffer: acido acetico 40%, metanolo 10%, acqua distillata 50%.

Il Marker utilizzato durante la corsa del gel è Precision Plus Protein All Blue Standards.

## **4.7 ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE E FENOLI TOTALI**

### **4.7.1 Processo di estrazione**

L'attività antiossidante e il contenuto di fenoli totali è stata valutata su estratti ottenuti miscelando 1 g di campione liofilizzato in 10 ml di metanolo 80%. Questa miscela è stata posta in agitazione per 30 minuti e, successivamente, centrifugata per 20 minuti a 6000 rpm. Gli estratti sono stati trasferiti in falcon da 15 ml e stoccati a 4°C prima di effettuare le analisi.

Sia l'attività antiossidante sia il contenuto di fenoli totali sono stati valutati in doppio sui campioni non inoculati (controlli al tempo 0) sia sui campioni inoculati ed incubati per 24, 48 e 72 ore con batteri lattici e lieviti.

### **4.7.2 Analisi DPPH**

L'analisi DPPH permette di determinare l'attività antiossidante facendo reagire il campione in esame con una soluzione di DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile), analizzando l'assorbanza allo spettrofotometro a 517 nm di lunghezza d'onda. Dal momento che i composti antiossidanti hanno la capacità di neutralizzare il radicale DPPH cedendogli un atomo di idrogeno, più la concentrazione dell'antiossidante è elevata più la soluzione contenente DPPH si decolora (l'atomo di idrogeno dell'antiossidante si lega al radicale, stabilizzandolo); infatti, il colore vira da viola a giallo.

In figura 6 seguente si possono osservare le due forme di DPPH, radicalica e non radicalica:

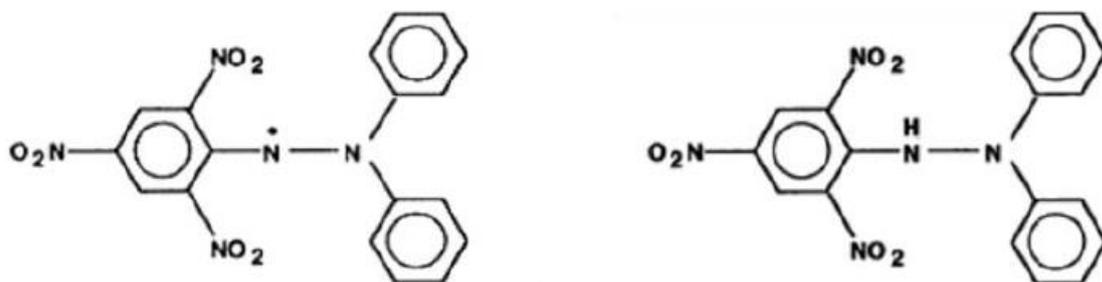


Fig. 6. DPPH in forma radicalica (a sinistra) e DPPH neutralizzato (a destra) (Scarpa, 2015).

Per l'analisi è stata preparata una soluzione di DPPH 0,6 mM, sciogliendo 0,012 g di DPPH in 50 ml di metanolo 99%, posti all'interno di un falcon ricoperto con carta stagnola. A seguire, sono stati aggiunti 0,5 ml di questa soluzione a 2,5 ml della miscela, ottenendo una soluzione con DPPH 0,1 mM, ossia 100  $\mu$ M.

La reazione viene attivata tramite il trasferimento in una cuvetta da 1.5 ml di:

- 0,333 ml di estratto;
- 1,333 ml di metanolo 80%;
- 0,333 ml di soluzione DPPH preparata al momento.

La concentrazione finale di DPPH nella miscela di reazione è di 100  $\mu$ moles.

La reazione viene monitorata attraverso la lettura dell'assorbanza a 517 nm di lunghezza d'onda, dopo 30 minuti di incubazione in oscurità.

Il bianco viene preparato con il reagente ed utilizzato per studiare la stabilità durante il test del DPPH (viene preparato con 1,666 ml di metanolo 80% e 0,333 ml di DPPH).

L'autozero viene fatto con metanolo 99%.

Prima di misurare l'assorbanza dei campioni è stata effettuata una retta di taratura con Trolox (standard esterno), utilizzando le seguenti concentrazioni: 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm, 5 ppm.

Per quest'analisi, i campioni sono stati diluiti in metanolo 80% in rapporto 1:5, fatta eccezione per i controlli che sono stati utilizzati tal quali.

I risultati sono espressi come mg di Trolox equivalenti/g di campione.

#### 4.7.3 Analisi ABTS

L'analisi ABTS permette di determinare l'attività antiossidante di diverse matrici biologiche attraverso la reazione che si verifica tra il campione in esame ed un radicale catione colorato e stabile, il quale si genera tramite l'ossidazione dell'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico) (ABTS) per mezzo di una soluzione di persolfato di potassio. Se i composti ossidanti sono in grado di trasferire uno o più atomi di idrogeno neutralizzando il radicale catione, la soluzione vira da un colore blu/verde ad un colore più chiaro.

Entrando nello specifico, il test ABTS si basa sulla generazione di un radicale blu/verde che può essere ridotto da molecole antiossidanti; il test DPPH (paragrafo 4.7.2) si basa sulla riduzione del DPPH radicale viola a 1,1-difenil-2-picryl idrazina (Floegel et al., 2011).

Similmente al DPPH, anche l'ABTS presenta un elettrone spaiato quando è in forma radicalica. Nel momento in cui una molecola antiossidante fornisce un atomo di idrogeno al radicale, questo viene neutralizzato e ciò che si verifica allo spettrofotometro è una riduzione dell'assorbanza.

Nella figura 7 che segue è possibile osservare l'ABTS nelle due forme possibili (radicalica e non radicalica):

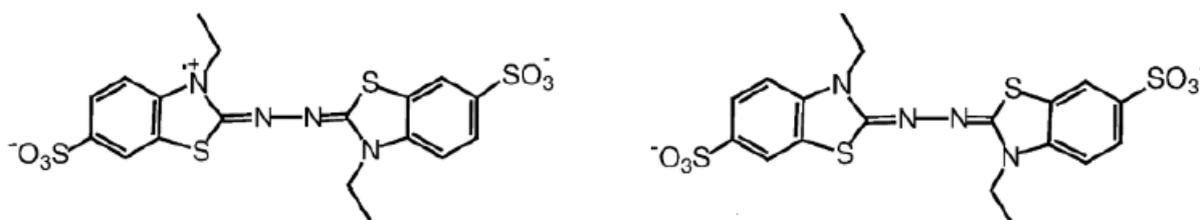


Fig. 7. ABTS in forma radicalica (a sinistra) e ABTS neutralizzato (a destra) (Scarpa, 2015).

Durante la prova il catione radicale (ABTS<sup>•+</sup>) è stato prodotto facendo reagire una soluzione madre ABTS 7mM preparata fresca con perossolato di potassio 70 mM durante tutta la notte in oscurità a 4°C, seguendo il protocollo descritto da Re et al. (1999).

La soluzione ABTS è stata preparata in un matraccio da 5 ml, pesando al suo interno 19,2 mg di ABTS e portandoli a volume con acqua distillata, sigillando infine il matraccio con alluminio.

Anche il perossolato di potassio 70 mM è stato preparato in un matraccio da 5 ml, pesandovi 94,6 mg di perossolato e portando a volume con acqua distillata.

A questo punto, 181 µl di perossolato possono essere trasferiti nel matraccio contenente l'ABTS, in modo che la concentrazione di perossolato sia 2,45 mM, ed il tutto viene posto a 4°C per una notte intera.

La soluzione contenente ABTS è stata poi diluita in etanolo in rapporto 1:100 (2 ml di ABTS in 200 ml di etanolo), all'interno di una bottiglia ricoperta anch'essa di alluminio. Questo passaggio ha permesso di ottenere un valore di assorbanza compreso tra 0,68 e 0,72, che rappresenta il range da rispettare durante la prova (se il valore scende sotto a 0,68 aggiungere ABTS, se sale sopra a 0,72 aggiungere etanolo, e così via).

Per misurare il valore di assorbanza sono state utilizzate cuvette di plastica da 4 ml, riempite con 0,3 ml di campione tal quale e 3 ml di ABTS etanolic. La lettura è stata

effettuata a 734 nm in uno spettrofotometro a doppio raggio dopo 6 minuti di incubazione in oscurità.

La correzione di assorbanza è stata effettuata con un bianco, utilizzando 30 µl di etanolo/acqua 1/1 v/v al posto dell'estratto, mentre l'autozero è stato eseguito con etanolo.

È importante osservare che, attraverso quest'analisi, non si valuta la capacità che l'antiossidante ha di proteggere il substrato, bensì viene valutata la quantità di radicale ABTS che reagisce con l'antiossidante. Quindi, a parità di concentrazione, più è il decremento del segnale a 734 nm più è la capacità antiossidante del campione (e minore è la concentrazione del radicale ABTS rimanente).

L'attività antiossidante viene definita come mg di Trolox equivalenti/kg di campione, tramite l'impiego di una curva di taratura effettuata con Trolox alle seguenti concentrazioni: 400 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm, 5 ppm.

#### **4.7.4 Determinazione fenoli totali**

Il contenuto di fenoli totali è basato sul metodo Folin-Ciocalteu, utilizzando acido gallico come standard. Il principio della metodica è basato sul fatto che il reagente Folin-Ciocalteu è formato da due complessi acidi fosfomolibdeno/fosfotungsteno. I composti fenolici, in ambiente basico, vengono ossidati dai due metalli molibdeno e tungsteno presenti nei due complessi, i quali a loro volta si riducono, e la colorazione blu è dovuta proprio alla riduzione dei metalli.

La miscela di reazione è stata preparata in questo ordine:

- 7,5 mL di Acqua Distillata;
- 100 µl di estratto;
- 500 µl di reagente Folin-Ciocalteu;

agitazione a mano per qualche secondo;

- 2 mL di carbonato di sodio 15% p/p (15 g di sale per 100 ml di H<sub>2</sub>O da fare in matraccio);

agitazione a mano per qualche secondo.

A questo punto, la soluzione è stata posta per due ore in oscurità.

L'assorbanza è stata letta a 750 nm utilizzando acqua distillata come riferimento.

I campioni sono stati utilizzati tal quali, così come i controlli.

Il contenuto totale di fenoli è calcolato come acido gallico equivalente, utilizzando l'assorbibilità molare media dell'acido gallico. Per la retta di taratura con acido gallico è stata preparata una soluzione madre acido gallico 2000 ppm, pesando 20 mg di acido gallico che vengono disciolti in 10 ml di metanolo 80%. Le diluizioni utilizzate per la curva sono le seguenti: 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm, 5 ppm.

## 4.8 ANALISI DEL COLORE

Le variazioni di colore delle miscele di farina di ceci e acqua sono state analizzate mediante uno spettrofotocolorimetro (Colorflex, HunterLab, Sunset Hills Road Reston, Virginia, USA). La valutazione è stata effettuata durante le 48-72 ore di incubazione, con cadenza di 24 ore.

Prima di svolgere l'effettiva misura, lo spettrofotocolorimetro è stato calibrato mediante una piastra bianca e nera standard. L'illuminante utilizzato era D65 e l'angolo di osservazione era di 10°.

Utilizzando la scala CIELAB sono stati ottenuti i tre parametri L\*, a\* e b\*, tramite i quali si è potuti risalire ai valori di Hue angle (h°) e Chroma (C) secondo le seguenti formule (McGuire, 1992).

$$\text{Croma} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

$$\text{Hue} = \frac{\tan^{-1}(b^*/a^*)}{2\pi} * 360$$

I risultati sono stati espressi come valore medio di 3 misurazioni per ogni campione.

## 4.9 ANALISI DEL PROFILO IN MOLECOLE VOLATILI

Per l'analisi dei composti volatili, sono stati prelevati esattamente 3 g di campione e posti in vials di vetro, in cui è stato aggiunto 1 ppm di 4-metil-2-pentanololo (standard interno). Tutti i campioni sono stati riscaldati a 45°C per 5 minuti e, successivamente, è stata introdotta nello spazio di testa una fibra (SPME Carboxen/PDMS, 85 µm, Stalleflex Supelco, Bellefonte, PA, USA) per altri 20 minuti. L'analisi è stata eseguita mediante GC-MS-SPME (gas cromatografia accoppiata a spettrometro di massa e microestrazione in fase solida). In seguito all'adsorbimento, le molecole sono state desorbite dopo 5 minuti nella colonna gascromatografica Chrompack CP-Wax 52 CB (Chrompack, Middelburg, Olanda). Tale colonna presenta 50 m di lunghezza e 0,32 mm di diametro. Il gascromatografo utilizzato è un Agilent Technology 7890 N, Network GC System combinato con spettrometro di massa HP 5975C con rivelatore selettivo di massa di rete (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). La scala di temperature utilizzata è la seguente: temperatura di iniezione 50°C per 1 minuto; incremento di 4,5°C/min fino al raggiungimento di 65°C; incremento di 10°C/min fino al raggiungimento di 230°C e permanenza a questa temperatura. Inoltre, 250°C, 250°C e 230°C corrispondono rispettivamente alle temperature dell'iniettore, dell'interfaccia e della sorgente ionica. Come gas di trasporto è stato utilizzato elio alla portata di 1 ml/min e la frammentazione ionica si è verificata con impatto elettronico a 70 eV.

I picchi sono stati identificati attraverso un confronto dei dati spettrali di massa con quelli dei composti presenti 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) Stati d'America) del 1995.

#### **4.10 ANALISI STATISTICA**

I risultati sono espressi come la media di due diverse repliche indipendenti. I dati grezzi sono stati confrontati statisticamente utilizzando l'ANOVA unidirezionale con un livello di significatività di 0,05. Le differenze tra i valori medi sono state rilevate dal test HSD Tukey. Il software utilizzato per le analisi era IBM SPSS Statistics 23 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

L'analisi dei componenti principali (PCA) è stata eseguita utilizzando il software Statistica (versione 8.0; Statsoft., Tulsa, OK) su dati grezzi per evidenziare la varianza statistica tra i campioni per il profilo in molecole volatili.

## 5. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 5.1. ANALISI MICROBIOLOGICHE E pH

Durante le 48-72 ore di fermentazione, il carico microbico delle miscele di farina di ceci e acqua è stato monitorato ogni 24 ore, ed è stata osservata la crescita nel tempo dei ceppi LP23 e Y15A.

La figura 8 illustra l'evoluzione del carico microbico, espresso in Log UFC/g, dal tempo iniziale (0 h) fino a 48 ore per il ceppo di LAB e 72 ore per il ceppo di lievito.

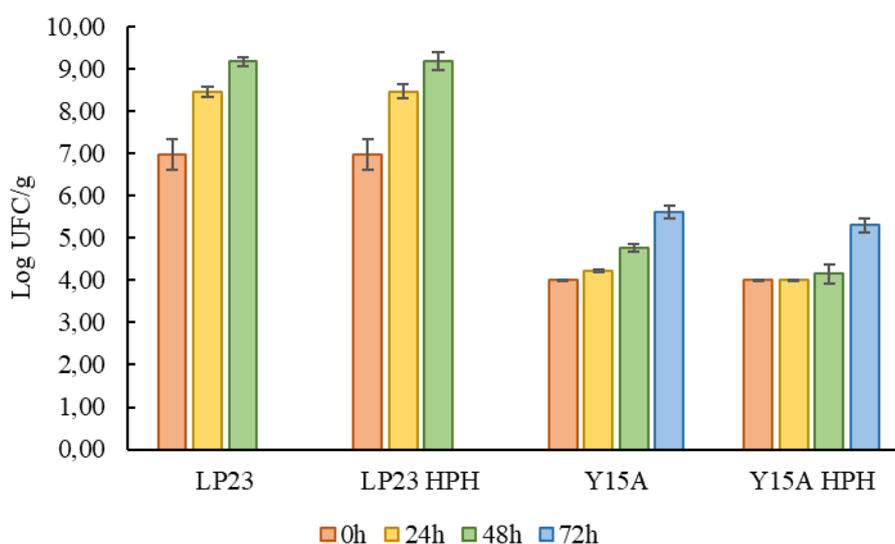


Fig. 8. Carico microbico, espresso in Log UFC/g, dei ceppi di LAB (LP23) e lievito (Y15A) inoculati nella miscela di farina di ceci e acqua trattata o meno con alte pressioni di omogeneizzazione (HPH), immediatamente dopo l'inoculo (0 h) e dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione.

Le miscele di farina di ceci ed acqua, erano state inoculate con una concentrazione di 7 Log UFC/g per il LAB *L. plantarum* LP23 e 4 Log UFC/g per il lievito *D. hansenii* Y15A. Dal grafico (figura 8) è possibile osservare che sia i campioni inoculati con il LAB sia quelli inoculati con il lievito sono stati in grado di adattarsi alla matrice di partenza e di crescere durante le ore di incubazione.

Il *L. plantarum* LP23 ha mostrato un metabolismo fermentativo molto rapido in quanto è stato in grado di sviluppare velocemente all'interno della matrice. Infatti, in 24 ore di fermentazione aveva raggiunto una concentrazione pari a oltre 8 Log UFC/g e dopo 48 ore aveva aumentato il suo carico di 2 cicli logaritmici rispetto alla concentrazione iniziale, raggiungendo valori pari a 9 Log UFC/g. Al contrario, il metabolismo respiratorio di *D. hansenii* Y15A era risultato più lento. Dopo 24 ore, il carico microbico non era variato significativamente e solamente al termine delle 72 ore di

incubazione a temperatura ambiente in agitazione aveva subito un incremento di 2 cicli logaritmici registrando una concentrazione pari a oltre 5 Log UFC/g.

Infine, il trattamento HPH ha influenzato la crescita microbica in base al ceppo inoculato. Infatti, la crescita di *L. plantarum* LP23 nel campione non trattato aveva seguito la stessa tendenza del campione trattato all'HPH. Al contrario, il trattamento aveva rallentato la crescita di *D. hansenii* Y15A, specialmente fino alle 48 ore di incubazione in cui non si era registrata una crescita rilevante, dopo di che il microrganismo aveva ripreso a crescere similmente al campione non trattato fino alle 72 ore di fine incubazione in cui il carico cellulare finale aveva raggiunto i 5 Log UFC/g.

Tutto ciò può essere dovuto al fatto che, solitamente, i batteri lattici sono i microrganismi che tendono a prendere il sopravvento durante i processi fermentativi rispetto ad altri microrganismi; infatti, i LAB hanno una velocità di crescita piuttosto elevata. D'altra parte, per quanto concerne il lievito, probabilmente quest'ultimo ha impiegato più tempo a adattarsi alla matrice di partenza, indipendentemente dal trattamento HPH.

Tab. 5. Valori di pH dei campioni immediatamente dopo l'inoculo (0 h) e dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione.

	0 h	24 h	48 h	72 h
<b>LP23</b>	6,34 ± 0,012	3,91 ± 0,038	3,78 ± 0,046	±
<b>LP23 HPH</b>	6,48 ± 0,006	3,93 ± 0,015	3,80 ± 0,036	±
<b>Y15A</b>	6,34 ± 0,012	5,50 ± 0,038	4,60 ± 0,082	4,67 ± 0,014
<b>Y15A HPH</b>	6,48 ± 0,006	5,70 ± 0,034	4,63 ± 0,010	4,61 ± 0,029

Simultaneamente al campionamento, il pH di tutti i campioni è stato misurato, in doppio, con cadenza di 24 ore. In tabella 5 sono riportati i valori medi delle due misure per ogni campione ± la deviazione standard. È possibile notare come il trattamento HPH abbia contribuito ad innalzare il pH di partenza dei campioni (0 h) rispetto agli stessi campioni non trattati. Inoltre, sia i campioni inoculati con il LAB che quelli inoculati con il lievito hanno contribuito ad acidificare la miscela di farina di ceci-acqua nel tempo. L'acidificazione maggiore è stata osservata per i campioni inoculati con il batterio lattico tra il tempo 0 e le 24 ore di incubazione; infatti, il pH è sceso da 6,34 a 3,91 per il campione non trattato e da 6,48 a 3,93 per il trattato. Dopo di che, tra le 24 e le 48 ore di incubazione si è verificata una ulteriore acidificazione, più blanda. Anche i campioni inoculati con il lievito hanno seguito la stessa tendenza, anche se in minor misura e più lentamente. Infatti, i più bassi valori di pH sono stati registrati fra le 48 e le 72 ore in cui i campioni inoculati con *D. hansenii* Y15A hanno raggiunto valori di 4,60 e 4,61 rispettivamente nel campione non trattato e trattato all'HPH.

## 5.2 QUANTIFICAZIONE DI PEPTIDI E PROTEINE SOLUBILI

Il contenuto peptidico dei campioni di farina di ceci fermentata, sia trattati con HPH sia non trattati, è stato ottenuto mediante il saggio OPA, un test spettrofotometrico quantitativo. L'analisi dati è stata ottenuta grazie ad una retta di taratura ottenuta con l'aminoacido serina (standard esterno) a concentrazioni differenti. I risultati sono riportati di seguito, in figura 9, espressi come mg di Serina equivalente/g di campione (mg SE/g).

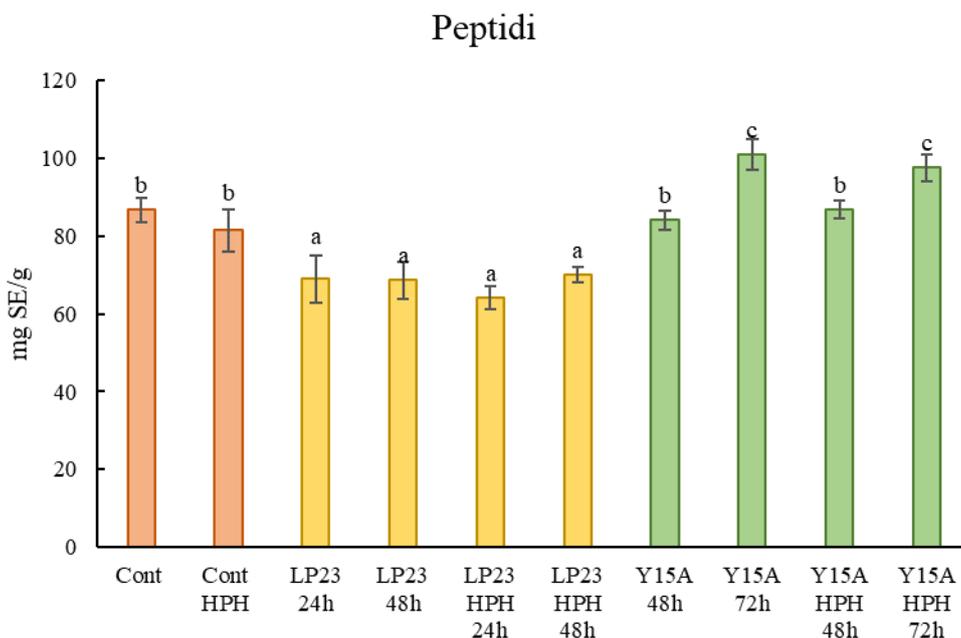


Fig. 9. Concentrazione di peptidi, espressa in mg di Serina equivalente (SE) per g di campione. L'analisi è stata svolta sul campione di controllo immediatamente dopo la formulazione (0 h) e sui campioni inoculati con *L. plantarum* LP23 e *D. hansenii* Y15A dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione a 30 °C e a temperatura ambiente, rispettivamente. Lettere diverse rappresentano valori significativamente diversi ( $p < 0.05$ ) fra tutti i campioni.

Dai dati ottenuti (figura 9), si può osservare, in primo luogo, che il controllo non trattato possedeva un contenuto di peptidi pari a circa 87 mg SE/g, mentre il trattamento HPH aveva provocato una riduzione non significativa del contenuto peptidico della matrice che presentava un valore pari a 81 mg SE/g.

Per quanto riguarda i campioni inoculati con LP23, è possibile evincere che, già a partire da 24 ore di incubazione, avevano subito una riduzione, seppur contenuta, del contenuto peptidico rispetto ai campioni di controllo. Infatti, tutti i campioni inoculati con il ceppo di LAB erano significativamente diversi rispetto ai controlli, presentando

un contenuto peptidico minore con valori compresi fra i 64 e 70 mg SE/g, ed erano significativamente uguali tra di loro.

Al contrario, i campioni inoculati con *D. hansenii* Y15A non presentavano differenze significative rispetto ai controlli al termine delle 48 ore di incubazione. Infatti, sia il campione non trattato che trattato all'HPH mostravano valori significativamente simili rispettivamente pari a 84 e 87 mg SE/g, dimostrando che il trattamento HPH non aveva avuto effetto sul contenuto peptidico.

D'altro canto, dopo 72 ore i campioni inoculati con il lievito hanno presentato un significativo incremento di peptidi rispetto al controllo registrando valori di 101 e 98 mg SE/g rispettivamente per il campione non trattato e trattato.

*D. hansenii* Y15A, infatti, è stato scelto sulla base della sua abilità nel degradare proteine grazie alla sua capacità di produrre enzimi proteolitici extracellulari (Nicaud, 2012; Breuer & Harms, 2006). Questa capacità lo rende di rilevante importanza tecnologica nell'industria alimentare in quanto è adatto a favorire la maturazione di alimenti stagionati come formaggi e insaccati (Fröhlich-Wyder et al., 2019).

Diversamente dal saggio OPA, l'analisi Bradford è stata condotta per determinare il contenuto di proteine solubili all'interno delle miscele farina di ceci-acqua. Questo test permette di misurare la presenza di residui aminoacidici basici, arginina, lisina e istidina, che contribuiscono alla formazione del complesso proteina-colorante.

I risultati ottenuti sono osservabili in figura 10, espressi come mg di BSA (albumina sierica bovina)/g di campione.

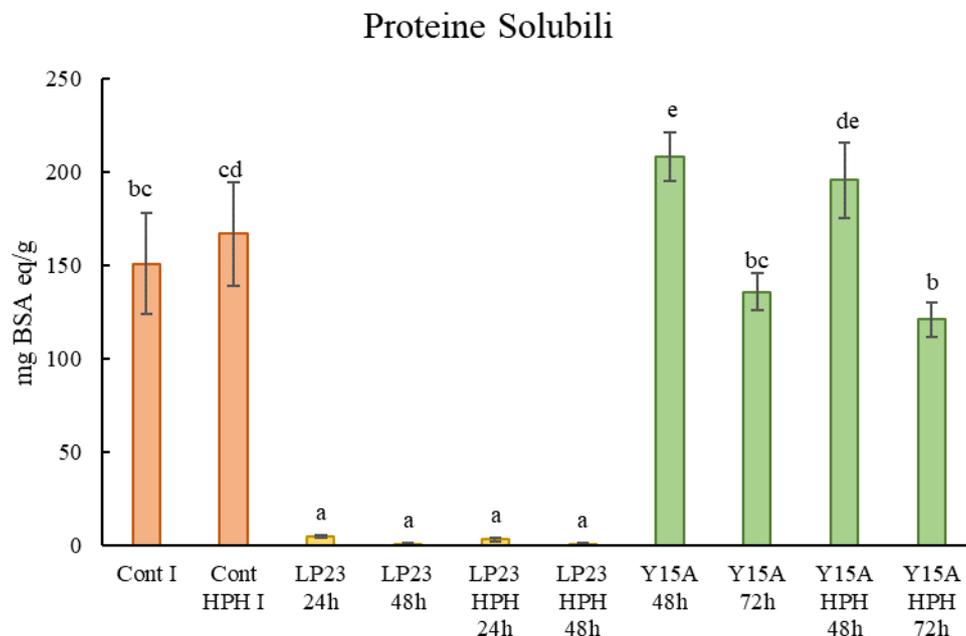


Fig. 10. Contenuto di proteine solubili, espresso in mg di albumina sierica bovina (BSA) equivalente per g di campione. L'analisi è stata svolta sul campione di controllo immediatamente dopo la formulazione (0 h) e sui campioni inoculati con *L. plantarum*

LP23 e *D. hansenii* Y15A dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione a 30 °C e a temperatura ambiente, rispettivamente. Lettere diverse rappresentano valori significativamente diversi ( $p < 0.05$ ) fra tutti i campioni.

In figura 10 è possibile osservare che, similmente al contenuto peptidico, il controllo non trattato e trattato all'HPH presentavano un livello piuttosto elevato anche di proteine solubili rispettivamente pari a 151 e 167 mg BSA/g. È importante evidenziare come il trattamento HPH abbia incrementato il contenuto di proteine solubili nonostante i due campioni non risultassero significativamente diversi.

Evidente è il fatto che i campioni inoculati con LP23 possedevano un contenuto di proteine solubili molto ridotto. Infatti, rispetto ai campioni di controllo al tempo iniziale, già dopo 24 ore di incubazione il contenuto di proteine solubili dei campioni inoculati con il batterio lattico era pari a 0,64 e 0,54 mg BSA/g rispettivamente per il campione non trattato e trattato. Questo sta a significare che il microrganismo è stato in grado di idrolizzare le proteine fin dall'inizio utilizzandone i peptidi come substrato di crescita o, comunque, per altre vie metaboliche che hanno fatto sì che queste proteine venissero trasformate in altri composti, questo va a giustificare anche il ridotto contenuto di peptidi rilevato dal saggio OPA.

Contrariamente, il contenuto di proteine solubili nei campioni inoculati con il lievito risulta piuttosto elevato. Il campione non trattato a 48 ore risulta significativamente diverso dai controlli, ed è anche quello che ha presentato il contenuto maggiore di proteine solubili pari a 208 mg BSA/g. I restanti campioni si presentano più simili ai controlli ed hanno un contenuto in proteine solubili più ridotto. Il trattamento HPH, sia dopo 48 ore sia dopo 72, ha generato un lieve calo di contenuto proteico rispettivamente pari a 196 e 121 mg BSA/g in confronto ai rispettivi campioni non trattati.

Comparando i due test tra loro, i risultati ottenuti si dimostrano coerenti perché le proteine solubili completamente consumate durante il metabolismo fermentativo di *L. plantarum* LP23, e il ridotto contenuto proteico dei campioni inoculati con il lievito dopo 72 ore di incubazione sono state ridotte/frammentate nei peptidi risultanti dall'analisi OPA.

In ogni caso, per validare i risultati dei saggi OPA e Bradford ed approfondire il grado di proteolisi è stata effettuata l'analisi SDS-PAGE (elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato) (paragrafo 5.3).

### **5.3 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)**

L'analisi SDS-PAGE è stata condotta per validare i risultati dei saggi OPA e Bradford ed approfondire il grado di proteolisi.

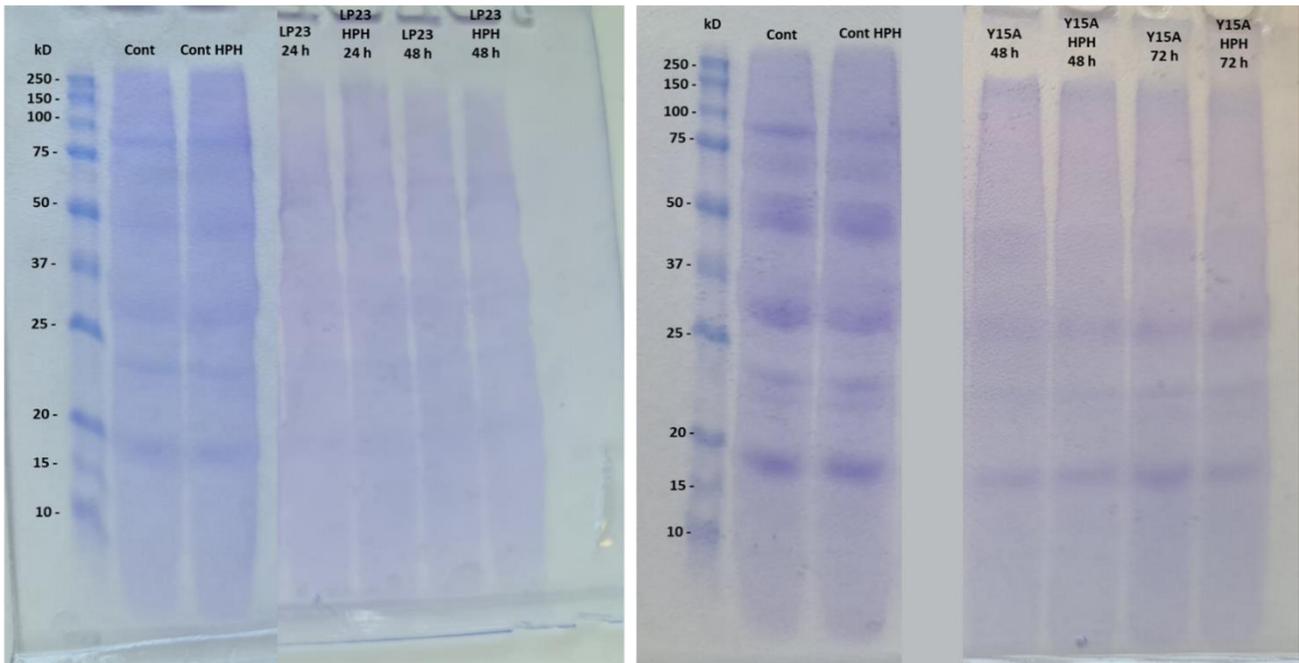


Fig. 11. L'elettroforesi su gel SDS-PAGE dei campioni ottenuti dalla fermentazione di miscele di farina di ceci e acqua attraverso l'uso di *L. plantarum* LP23 (sinistra) e *D. hansenii* Y15A (destra). L'analisi è stata svolta su campioni di controllo immediatamente dopo la formulazione (0 h) e sui campioni ottenuti dopo 24 e 48 ore di incubazione con il LAB e dopo 48 e 72 ore di incubazione con il lievito selezionato. Marcatori di peso molecolare nella prima corsia e loro valori in kDa sulla sinistra.

Dai gel di elettroforesi illustrati in figura 11 è possibile osservare che, rispetto ai controlli, sia i campioni inoculati con *L. plantarum* LP23 che quelli inoculati con *D. hansenii* Y15A presentano le bande più alte, che corrispondono ai peptidi con peso molecolare di 150, 100 e 75 kD, meno pronunciate, mentre erano ancora evidenti le bande corrispondenti ai peptidi a più ridotto peso molecolare. Ciò sta a significare che la fermentazione operata dal batterio lattico ed il metabolismo ossidativo del lievito hanno favorito la riduzione dei peptidi a più alto peso molecolare rispetto a quelli a peso molecolare inferiore. Dal momento in cui la proteolisi avvenuta è di tipo microbico e non enzimatico, la sparizione completa di un peptide ad alto peso molecolare sta a significare che il microorganismo ha idrolizzato totalmente, mentre l'assenza dei peptidi a basso peso molecolare, che si evidenzia nei campioni fermentati dal LAB, sta ad indicare che il microorganismo ha utilizzato dei peptidi per il compimento del suo metabolismo.

Il trattamento HPH non ha generato particolari differenze rispetto ai campioni non trattati, né per quelli inoculati con il batterio lattico né per quelli inoculati con il lievito. Tutti i campioni hanno presentato meno bande rispetto ai controlli.

Le bande assenti nei campioni inoculati con LP23 dimostrano un risultato coerente con quanto affermato dall'analisi OPA, che ha evidenziato un ridotto contenuto di peptidi nei campioni fermentati dal LAB.

In ogni caso, *L. plantarum* LP23 ha consumato molto substrato, proteolizzando in maniera molto spinta. In particolare, il trattamento HPH ha apportato modifiche di struttura alle proteine, facendo in modo che il microrganismo potesse rompere i peptidi e crearne di nuovi.

Tre le 24 e le 48 ore di incubazione la differenza è minima, nonostante a 24 ore il quantitativo risulta leggermente superiore (bande più scure), i peptidi presenti possiedono tutti gli stessi pesi molecolari.

Per quanto concerne i campioni inoculati con *D. hansenii* Y15A, l'andamento risulta simile a quello appena descritto. Nella parte alta del gel le bande sono molto più blande rispetto a quelle risultanti dall'analisi dei controlli. Anche in questo caso, il contenuto peptidico risulta ridotto, seppur in maniera meno spiccata rispetto ai campioni inoculati con il LAB, confermando nuovamente quanto descritto dal saggio OPA.

#### **5.4 CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE E CONTENUTO DI FENOLI TOTALI**

La capacità antiossidante può essere definita come la capacità delle molecole redox di eliminare i radicali liberi da alimenti e sistemi biologici. Questo concetto considera gli effetti additivi e sinergici di tutti gli antiossidanti piuttosto che l'effetto dei singoli composti e, pertanto, può essere utile nello studio di potenziali benefici degli antiossidanti sulla salute e sulle malattie ossidative mediate dallo stress (Brighenti et al., 2005, Puchau et al., 2009).

Le due analisi svolte per valutare la capacità ossidante sono il saggio ABTS ed il saggio DPPH. Mentre l'ABTS si basa sulla capacità di trasferimento di un atomo di idrogeno, il DPPH è basato sul trasferimento di elettroni. Pertanto, nonostante il metodo di approccio teorico e lo sviluppo dei due test siano molto simili, il saggio ABTS risulta più efficace nella valutazione di sistemi sia idrofili sia lipofili, mentre il DPPH è affine soltanto agli antiossidanti lipofili. Generalmente, i risultati del test ABTS presentano una linea di base più elevata in estratti acquosi (idrofili) di alimenti vegetali (Klongklaew et al., 2022).

In figura 12 sono riportati i risultati relativi alla capacità antiossidante dei campioni ottenuta mediante saggio DPPH, espressi in mg di Trolox equivalenti/g di campione (mg TE/g).

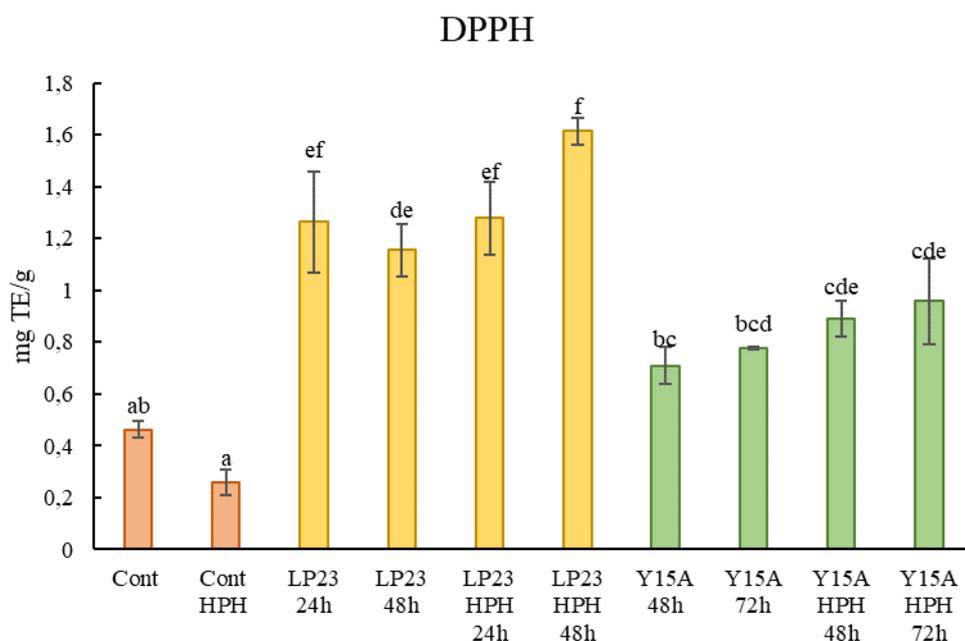


Fig. 12. Capacità antiossidante, determinata attraverso il saggio DPPH, espressa in mg di Trolox equivalenti (TE) per g di campione. L'analisi è stata svolta sul campione di controllo immediatamente dopo la formulazione (0 h) e sui campioni inoculati con *L. plantarum* LP23 e *D. hansenii* Y15A dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione a 30 °C e a temperatura ambiente, rispettivamente. Lettere diverse rappresentano valori significativamente diversi ( $p < 0.05$ ) fra tutti i campioni.

Partendo dall'analisi dei campioni di controllo, è possibile osservare che il trattamento HPH ha ridotto, anche se in maniera non significativa, l'attività antiossidante del Controllo HPH, che risulta essere di 0,26 rispetto al controllo non trattato che possedeva una capacità antiossidante pari a 0,46 mg TE/g.

Per quanto concerne i campioni inoculati con LP23, sicuramente l'aggiunta del LAB ha incrementato il potere antiossidante dei campioni che, infatti, risultano significativamente diversi rispetto ai controlli raggiungendo valori compresi fra 1,15 e 1,61 mg TE/g. Analizzandoli singolarmente, si può osservare come il trattamento HPH non abbia generato differenze a 24 ore di incubazione rispetto al non trattato; infatti, i due campioni non presentano differenze significative con valori rispettivamente pari a 1,28 e 1,26 mg TE/g. Al contrario, a 48 ore di incubazione è evidente che il trattamento HPH abbia generato differenze significative tra campione non trattato (1,15 mg TE/g) e trattato, incrementando ulteriormente il potere antiossidante di quest'ultimo (1,61 mg TE/g).

Nel caso dei campioni inoculati con *D. hansenii* Y15A, si può affermare l'incremento generale del potere antiossidante rispetto ai controlli, ma in maniera inferiore rispetto ai campioni descritti appena sopra. Inoltre, i campioni non trattati sono risultati significativamente simili al controllo non trattato con valori pari a 0,71 e 0,77 mg TE/g

dopo 48 e 72 ore di incubazione. Anche in questo caso, il trattamento HPH ha incrementato il potere antiossidante rispetto al controllo, sia dopo 48 ore di incubazione (0,89 mg TE/g) sia dopo 72 ore con valori pari a 0,95 mg TE/g.

In ogni caso, tra i due ceppi analizzati, il LAB presenta una capacità antiossidante nettamente superiore rispetto al lievito. Probabilmente, questa capacità antiossidante più elevata è dovuta al metabolismo fermentativo e alla capacità proteolitica di *L. plantarum* LP23 inoculato rispetto al metabolismo ossidativo del lievito inoculato. Infatti, Skrzypczak et al. (2019), dimostrarono l'efficacia di *L. plantarum* nell'aumentare le proprietà antiossidanti di bevande di ceci fermentate; pertanto, ciò che è appena stato descritto risulta coerente con i risultati riportati in letteratura.

In figura 13 è riportata la capacità antiossidante determinata mediante saggio ABTS, espressa in mg di Trolox equivalenti/g di campione.

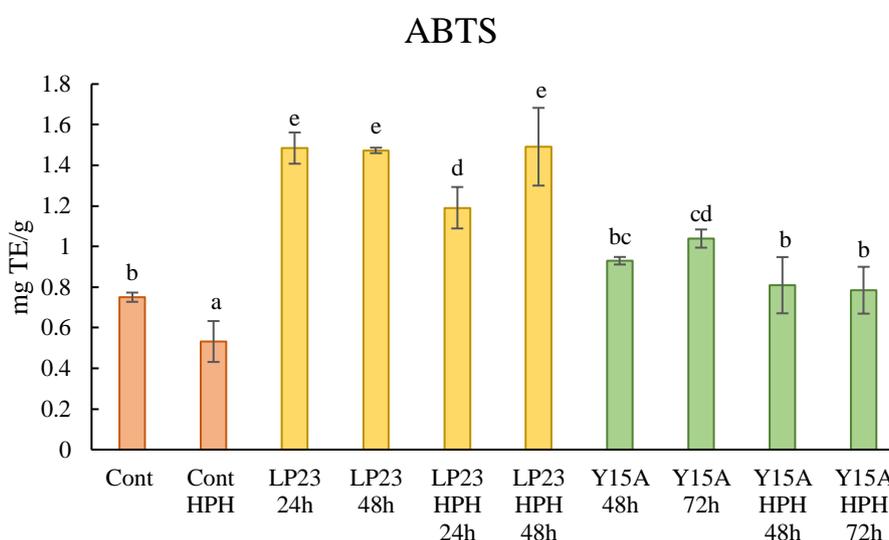


Fig. 13. Capacità antiossidante, determinata attraverso il saggio ABTS, espressa in mg di Trolox equivalenti (TE) per g di campione. L'analisi è stata svolta sul campione di controllo immediatamente dopo la formulazione (0 h) e sui campioni inoculati con *L. plantarum* LP23 e *D. hansenii* Y15A dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione a 30 °C e a temperatura ambiente, rispettivamente. Lettere diverse rappresentano valori significativamente diversi ( $p < 0.05$ ) fra tutti i campioni.

Similmente a ciò che è stato osservato per il saggio DPPH, anche il test ABTS ha dimostrato che il potere antiossidante più elevato appartiene ai campioni inoculati con il LAB. Il controllo non trattato risulta nuovamente con capacità antiossidante bassa (0,75 mg TE/g) ma comunque statisticamente superiore al controllo trattato (0,53 mg TE/g).

Analizzando i campioni inoculati con LP23 è possibile osservare che, contrariamente al saggio DPPH, questa volta il campione sottoposto al trattamento HPH dopo 24 ore

di incubazione possedeva una capacità antiossidante significativamente ridotta (1,19 mg TE/g) rispetto al campione non trattato (1,48 mg TE/g). Al contrario, dopo 48 ore di incubazione, il campione di controllo possedeva una capacità antiossidante simile ai campioni non trattati raggiungendo valori di 1,49 mg TE/g. determinando differenze significative tra i campioni; mentre a 48 ore l'effetto è stato pressoché nullo.

Ad ogni modo, tutti e quattro i campioni risultano significativamente diversi rispetto ai controlli.

Per quanto concerne i campioni inoculati con *D. hansenii* Y15A, contrariamente al caso precedente, fatta eccezione per il campione non trattato a 72 ore, la loro capacità antiossidante risultava statisticamente simile a quella dei controlli ed inferiore a quella dei campioni inoculati con il LAB. Solamente il campione non trattato dopo 72 ore dall'inoculo del lievito mostrava un incremento dell'attività antiossidante raggiungendo valori pari a 1,03 mg TE/g.

Dai risultati di entrambi i saggi (DPPH e ABTS) consegue che la capacità antiossidante è fortemente dipendente dal ceppo, ma è altrettanto vero che diversi campioni inoculati con lo stesso ceppo, se analizzati in modi differenti e a diversi tempi di incubazione, possono comunque presentare differenze significative tra di loro.

Infine, in figura 14 è possibile osservare i risultati ottenuti dall'analisi del contenuto di fenoli totali, espressi in mg di acido gallico equivalenti/g di campione (mg AG/g).

Studi epidemiologici hanno dimostrato che il consumo di alimenti e bevande ricchi in fenoli può ridurre il rischio di malattie cardiache rallentando la progressione dell'aterosclerosi, agendo come antiossidanti nei confronti delle lipoproteine a bassa densità (LDL) (Kinsella et al., 1993; Frankel et al., 1995; Landbo & Meyer, 2001). Pertanto, l'attenzione attuale è rivolta per lo più verso il potere antiossidante dei fenoli. Questa attività è principalmente dovuta alle loro proprietà redox che permettono di agire come agenti riducenti, donatori di idrogeno, *quencher* dell'ossigeno singoletto e chelanti metallici (Rice-Evans et al., 1997). Dal momento in cui gli antiossidanti sintetici sono mal visti dal consumatore, si stanno sempre più eliminando dalle applicazioni alimentari; di conseguenza, c'è uno slancio molto spinto verso l'esplorazione di fonti antiossidanti naturali.

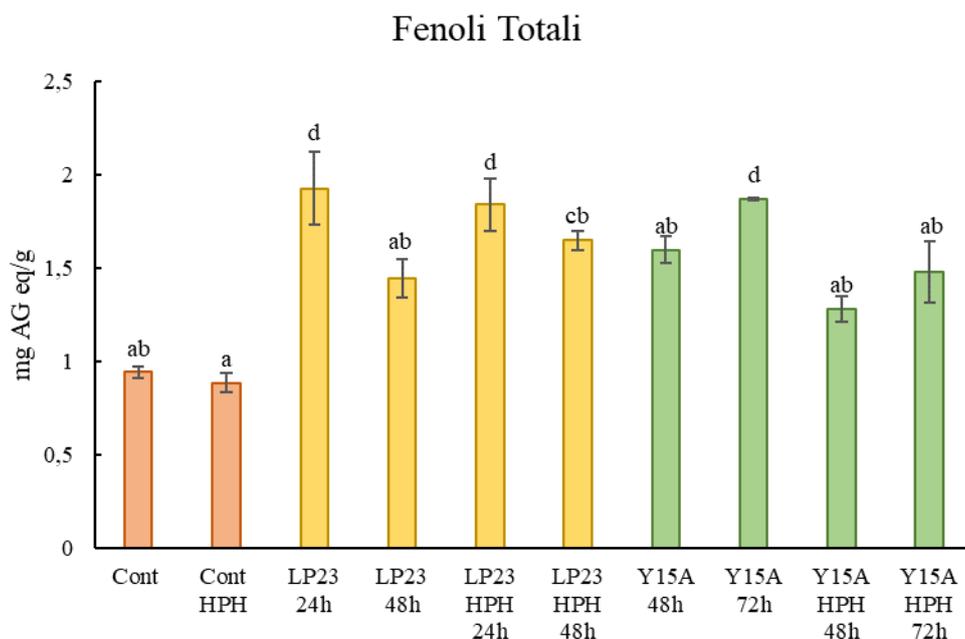


Fig. 14. Contenuto di fenoli totali, espresso in mg di acido gallico equivalenti (AG eq) per g di campione. L'analisi è stata svolta sul campione di controllo immediatamente dopo la formulazione (0 h) e sui campioni inoculati con *L. plantarum* LP23 e *D. hansenii* Y15A dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione a 30 °C e a temperatura ambiente, rispettivamente. Lettere diverse rappresentano valori significativamente diversi ( $p < 0.05$ ) fra tutti i campioni.

Nonostante il trattamento HPH abbia ridotto leggermente il contenuto in fenoli totali, i due campioni di controllo non presentano tra loro differenze significative registrando valori di 0,88 e 0,94 mg SE/g.

Nei campioni inoculati con *L. plantarum* LP23 si nota subito una forte differenza significativa tra le 24 e le 48 ore di incubazione; infatti, a 24 ore sia il campione non trattato sia il trattato sono differenti significativamente dai controlli ma non differenti tra loro con valori rispettivamente pari a 1,93 e 1,84 mg SE/g. Al contrario, a 48 ore di incubazione il campione non trattato si rivela statisticamente simile al controllo non trattato con una concentrazione di fenoli pari a 1,45 mg SE/g, mentre il campione trattato possedeva valori significativamente simili al trattato dopo 24 ore (1,65 mg SE/g). In generale, rispetto ai controlli, inoculare i campioni con LP23 ha generato un aumento del contenuto di fenoli totali.

Al contrario, il contenuto di fenoli totali nei campioni inoculati con *D. hansenii* Y15A risultano significativamente uguali al controllo non trattato, nonostante abbiano un contenuto maggiore in fenoli totali. Il non trattato a 72 ore, invece, presenta differenze significative con una concentrazione di fenoli totali pari a 1,87 mg SE/g. Questa tendenza è simile all'analisi del contenuto di antiossidanti ottenuta attraverso il metodo

ABTS. D'altra parte, come precedentemente accennato, l'analisi ABTS permette di valutare il contenuto di antiossidanti idrofili, tra i quali sono compresi i fenoli.

Il trattamento HPH ha generato una diminuzione del contenuto in fenoli totali per i campioni inoculati con Y15A sia a 48 ore sia a 72 ore; mentre per i campioni inoculati con LP23 ha generato una leggera diminuzione del contenuto a 24 ore ed un leggero aumento a 48 ore.

Sicuramente gli inoculi utilizzati per la prova, essendo stati selezionati come ceppi promettenti per l'ottenimento di prodotti innovativi ad alto valore aggiunto, risultano coerenti con le aspettative e, come volevasi dimostrare, presentano un contenuto in fenoli totali molto più elevato dei controlli non inoculati.

## 5.5 ANALISI DEL COLORE

Attraverso uno spettro-fotocolorimetro sono stati valutati i parametri che definiscono il colore dei campioni. Sono stati analizzati sia i controlli al tempo iniziale (0 h), sia i campioni inoculati con *L. plantarum* LP23 e *D. hansenii* Y15A dopo 24-48 ore di fermentazione per i primi e 48-72 ore di incubazione per i secondi. Successivamente, utilizzando la scala CIELAB, sono stati ricavati i parametri  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , tramite i quali si sono ottenuti i valori di Hue angle ( $h^\circ$ ) e Chroma (C). Come illustrato in figura 15, il parametro  $h^\circ$  rappresenta l'angolo di tonalità, ed è un valore che può andare da  $0^\circ$  a  $360^\circ$ , mentre la C rappresenta la saturazione e può andare da 0 (grigio) a 100 (colore acceso).

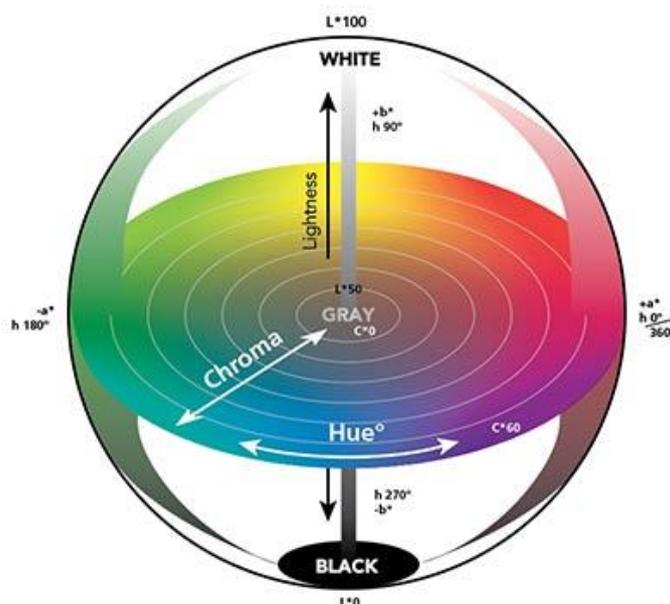


Fig. 15. Rappresentazione di Hue angle e Chroma su scala di colore CIELAB.

In figura 16 sono riportati i valori ottenuti di Hue angle e Chroma dei campioni analizzati, a partire dal tempo iniziale (0 h) fino a 48 ore per i campioni inoculati con il LAB e 72 ore per quelli inoculati con il lievito. I controlli sono indicati in nero, i campioni inoculati con LP23 in verde e quelli inoculati con Y15A in blu. Inoltre, il simbolo rotondo indica i campioni non trattati mentre il quadrato quelli trattati all'HPH.

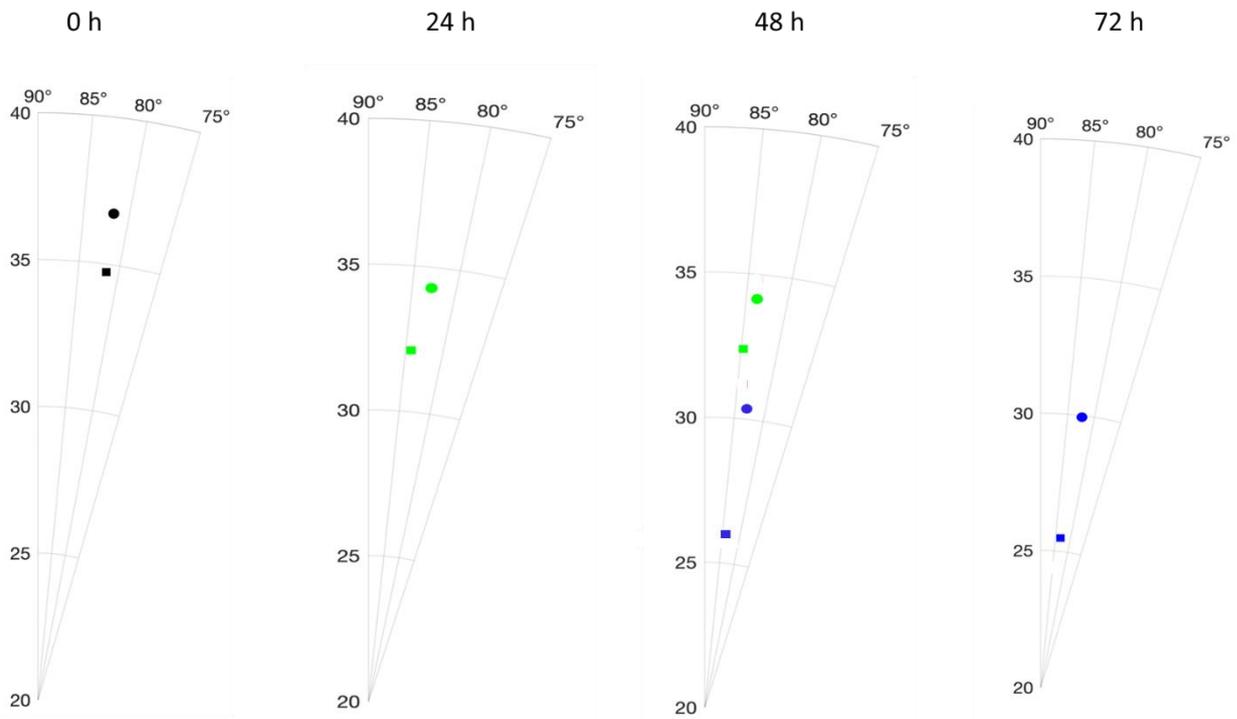


Fig. 16. Analisi del colore dei campioni di farina di ceci e acqua (Hue angle e Chroma).

Al tempo iniziale è stato possibile osservare che i campioni di controllo presentavano uno Hue angle compreso tra 80° e 85° e una saturazione di 36,74 nel caso del controllo non trattato e 34,73 nel controllo trattato. Infatti, i valori di Hue angle sono coerenti con ciò che è stato osservato ad occhio nudo perché sono valori che rientrano nella tonalità del giallo tipica della farina di ceci.

A tal proposito, osservando i grafici ottenuti a 24, 48 e 72 ore è possibile notare che le variazioni di Hue angle sono state minime, sono rimaste pressoché tra 80-85° per tutto il tempo di incubazione.

D'altro canto, la saturazione (C) ha assunto valori diversi: i campioni inoculati con *L. plantarum* LP23 hanno mantenuto un livello di saturazione più simile ai controlli per tutto il tempo della fermentazione, mentre i lieviti hanno registrato una riduzione di saturazione nel tempo provocando una colorazione più grigia della matrice. Questo fenomeno può essere attribuito al contenuto di antiossidanti della miscela durante l'incubazione con i diversi microrganismi. Infatti, i campioni inoculati con il batterio lattico, erano caratterizzati da un contenuto di antiossidanti più alto e questo potrebbe

aver permesso alla matrice di mantenere una saturazione del colore più simile a quella di partenza per tutta la durata della fermentazione. Al contrario, i campioni inoculati con il lievito contenevano un minor contenuto di antiossidanti e questo si è tradotto in una riduzione della saturazione, raggiungendo valori di Chroma compresi tra circa 24 e 30.

Infine, è importante sottolineare come il trattamento HPH abbia ridotto sin dall'inizio la saturazione per tutti i campioni analizzati. Infatti, indipendentemente dal tempo di incubazione e dal microorganismo inoculato, i campioni trattati HPH mostravano un ridotto parametro di saturazione. Al contrario, il trattamento HPH non aveva avuto effetto sui valori di Hue angle non andando ad influenzare la tonalità della matrice.

## 5.6 ANALISI DEL PROFILO IN MOLECOLE VOLATILI

L'ottenimento del profilo in molecole volatili risulta molto importante sia per capire quali molecole apportano odori gradevoli e richiesti in determinati prodotti ma anche per riconoscere quelli indesiderati che generano *off-flavours*. A generare odori sgradevoli, solitamente, sono composti provenienti da acidi grassi liberi che vengono ossidati in molecole più piccole, tra cui aldeidi, alcani, alcheni, alcoli, chetoni, acidi, esteri, terpeni, etc...

Nonostante ogni molecola abbia un odore caratteristico, solitamente la percezione dell'aroma è dovuta a miscele di note diverse appartenenti a più molecole.

I composti volatili sono originati durante lo sviluppo dei semi di ceci e lo sviluppo prosegue durante raccolta, stoccaggio e trasformazione. Quindi, iniziano a svilupparsi durante i processi fisiologici ma si intensificano in condizioni di stress meccanici, infezioni da parte di agenti patogeni o stress causato da acqua e/o temperature troppo alte o troppo basse (Karolkowski et al., 2021). Inoltre, è risaputo che il processo fermentativo contribuisce allo sviluppo di un profilo aromatico e molecole volatili molto ampio e direttamente correlato al microorganismo coinvolto nella fermentazione.

Il profilo in molecole volatili delle miscele di farina di ceci è stato valutato dopo 24 e 48 ore di fermentazione nei campioni inoculati con *L. plantarum* LP23 e dopo 48 e 72 ore di incubazione nei campioni inoculati con *D. hansenii* Y15A, mentre i campioni di controllo sono stati analizzati al tempo iniziale (0 h).

L'analisi è stata svolta mediante SPME-GC-MS (microestrazione in fase solida accoppiata a gas cromatografia e spettrometria di massa) ed ha permesso di individuare all'incirca una quarantina di molecole volatili appartenenti alle classi di aldeidi, alcoli, chetoni, acidi, esteri e alcani.

Le classi di molecole che andavano a caratterizzare i campioni sono riportate in % relativa in figura 17.

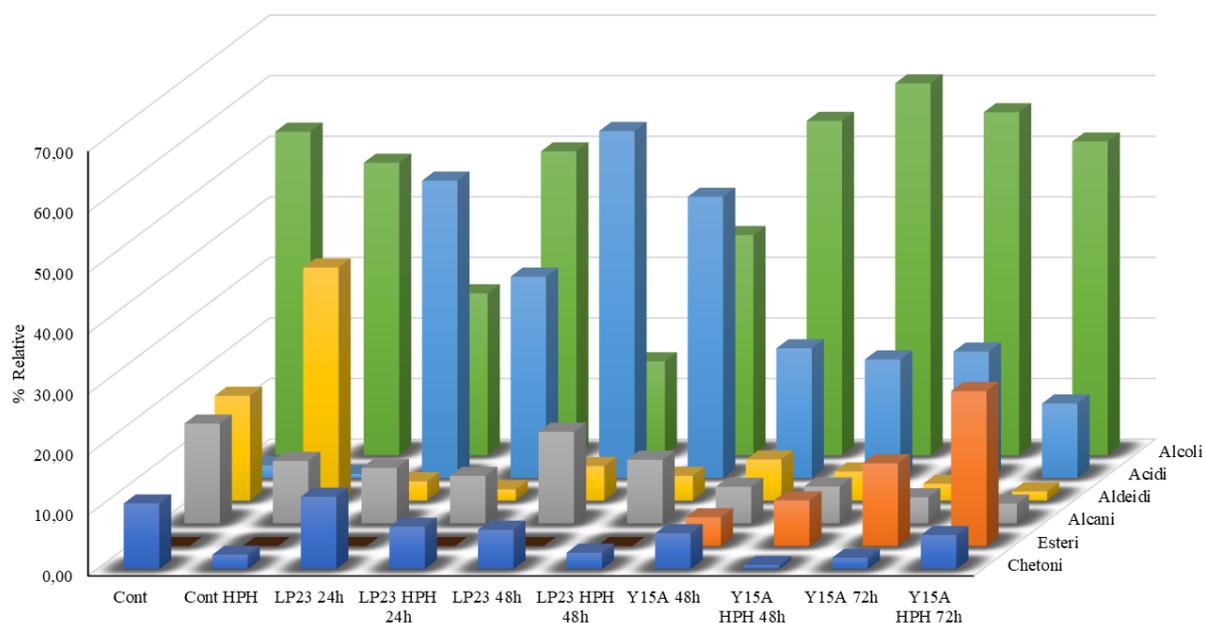


Fig. 17. Classi di composti volatili, espressi in % relativa, rilevati nei campioni di farina di ceci trattati e non trattati all'HPH e fermentati per 24 e 48 h con *L. plantarum* LP23 e 48 e 72 h con *D. hansenii* Y15A. I campioni di controllo sono stati analizzati al tempo iniziale di preparazione.

Dal grafico in figura 17 è stato possibile osservare che il profilo in molecole volatili dipendeva fortemente dal ceppo microbico inoculato nella miscela, dal tempo di fermentazione ma anche dal trattamento HPH applicato. In particolare, tra le varie classi di composti volatili, quelli maggiormente presenti erano gli alcoli e gli acidi.

### Alcoli

Gli alcoli erano presenti in percentuali relative piuttosto alte già a partire dal campione di controllo iniziale. Infatti, il controllo non trattato era caratterizzato da un contenuto di alcoli del 53,37 % e il maggiore esponente era rappresentato da 1-esanolo. Il trattamento HPH aveva provocato una leggera riduzione del contenuto iniziale di alcoli che rappresentavano la miscela con una concentrazione pari a 48,25%.

Durante il processo fermentativo una riduzione in alcoli si verificò nei campioni inoculati con *L. plantarum* LP23, mentre i campioni ottenuti dal metabolismo di *D. hansenii* Y15A possedevano un contenuto di alcoli simile o superiore a quello del controllo. Nello specifico, i campioni inoculati con *D. hansenii* Y15A mostravano un contenuto superiore di alcoli, fatta eccezione per il campione trattato all'HPH dopo 72 ore di incubazione. Il metabolismo del lievito inoculato nel campione non trattato aveva favorito un lieve incremento di alcoli durante le 72 ore di incubazione facendone variare la concentrazione da 55,15% a 56,58%. Per contro, il trattamento HPH aveva favorito la produzione di alcoli da parte di *D. hansenii* durante le prime 48 ore di

incubazione raggiungendo valori superiori a quelli del non trattato (61,36%), ma ne aveva ridotto il contenuto dopo 72 ore raggiungendo valori pari a 51,75 %. I campioni inoculati con il LAB, al contrario, hanno mostrato un contenuto di alcoli piuttosto basso, soprattutto i campioni non trattati; tuttavia, il trattamento HPH ha contribuito in maniera spinta nell'aumentare il contenuto di alcoli, specialmente dopo 24 ore di fermentazione. L'alcol maggiormente presente nei campioni era rappresentato dall'1-esanolo, seguito dall'etanolo. Il primo attribuisce agli alimenti un aroma erbaceo/etero, mentre l'etanolo apporta un aroma più alcolico (Siroli et al., 2022).

### **Acidi**

In confronto al contenuto in alcoli, per gli acidi si è osservata la situazione opposta. L'impiego di *L. plantarum* LP23 per la fermentazione della farina di ceci idratata ha favorito una produzione di acidi nettamente superiore rispetto ai controlli, i quali ne erano quasi sprovvisti. Inoltre, il contenuto di acidi si è mostrato nettamente superiore anche rispetto ai campioni inoculati con il lievito. Nello specifico, la maggiore concentrazione di acidi si è registrata nel campione non trattato all'HPH al termine delle 48 ore di fermentazione che aveva raggiunto una concentrazione del 57,25%.

Ciò è giustificato dal fatto che i LAB hanno una capacità molto superiore, rispetto ai lieviti, di acidificare l'habitat in cui si trovano. Un'ulteriore conferma è data dall'analisi che è stata effettuata sul pH (tabella 5), che è risultata in accordo con quanto appena descritto. Infatti, i campioni inoculati con il *L. plantarum* LP 23 sono gli stessi che hanno abbassato il pH in maniera molto più spinta rispetto ai campioni inoculati con il lievito.

Nonostante questo, il trattamento HPH ha influito abbassando il contenuto di acidi nei campioni trattati rispetto ai corrispondenti non trattati. Infatti, al termine delle 48 ore di fermentazione il campione trattato all'HPH possedeva una concentrazione di acidi del 46,39%.

Tra tutti gli acidi che sono stati rilevati, l'acido acetico è risultato quello maggiormente presente nei campioni ed è il composto che apporta agli alimenti un tipico sentore di acido molto pungente.

### **Aldeidi**

Le aldeidi rientrano tra i principali costituenti chimici identificati nei legumi ad eccezione dei fagioli comuni (Karolkowski et al., 2021). Solitamente, l'esonale (che apporta un odore di grasso, erboso, verde) è l'aldeide predominante e la sua percentuale rappresenta la metà della percentuale totale di aldeidi. L'analisi ha dimostrato quanto affermato in letteratura. La maggiore concentrazione di aldeidi era contenuta nei campioni di controllo non fermentati al tempo iniziale. Nello specifico, è stato possibile osservare che il trattamento HPH ha influenzato fortemente il contenuto di aldeidi

incrementandone la concentrazione fino al 38,47%, mentre il controllo non trattato ne conteneva il 17,30%.

Il metabolismo di entrambi i microorganismi inoculati nella miscela ha ridotto il contenuto iniziale di aldeidi. Inoltre, il trattamento HPH ha contribuito ad abbassarne ulteriormente il contenuto.

Ad ogni modo, l'aldeide maggiormente presente è stata l'esanale. Dal momento in cui l'esanale rientra tra le molecole negative che generano *off-flavours* (apporta un aroma fruttato/"green"), il fatto che sia maggiormente presente nei campioni di controllo e quasi inesistente nei campioni inoculati è un vantaggio. Infatti, la fermentazione contribuisce a ridurre i sapori indesiderati nei prodotti a base di legumi (O'Neill, 1996; Yoo & Chang, 2016). Identificare i composti aromatici nel corso della germinazione è indispensabile per capire appieno come la germinazione stessa potrebbe potenzialmente influire sui sapori delle farine derivanti dai legumi. Tuttavia, è altrettanto importante analizzare i componenti volatili in fase di fermentazione, per capire come variano nel tempo. Inoltre, le aldeidi sono comunemente correlate al sapore sgradevole dei legumi e vengono prodotte dall'ossidazione degli acidi grassi (Xu et al., 2019). Pertanto, essendo l'esanale sempre presente (o quasi) nei legumi, la sua presenza in determinate quantità più o meno elevate si può utilizzare per distinguere tra loro alimenti di qualità migliore o peggiore.

## **Alcani**

Gli alcani sono composti saturi contenenti esclusivamente legami singoli. Vengono utilizzati come precursori nella sintesi di composti d'aroma nonostante non presentino specifici gruppi funzionali.

In riferimento ai controlli, il contenuto di alcani dei campioni inoculati è risultato inferiore fatta eccezione per i campioni inoculati con *L. plantarum* LP23 a 48 ore trattato e non trattato, che hanno presentato valori simili a quelli dei controlli stessi.

Il controllo non trattato ha presentato un contenuto di alcani pari a 16,48%, mentre il trattamento HPH ha diminuito il contenuto fino ad un valore del 10,32%.

Il campione non trattato inoculato con il batterio lattico ha dimostrato un contenuto ridotto di alcani dopo 24 ore di fermentazione (9,15%), ed il trattamento HPH ha ridotto ulteriormente il contenuto (7,85%). Tuttavia, nelle successive 24 ore il contenuto è aumentato fino ad un valore di 15,11% per il non trattato e 10,51% per il trattato.

I campioni inoculati con il lievito hanno mostrato tutti un contenuto ridotto di alcani, in un range variabile da 3,26% a 6,10%.

Ad ogni modo, gli alcani maggiormente presenti sono risultati il tetradecano, seguito da dodecano ed esadecano.

## **Esteri**

Gli esteri sono dei composti organici che vengono originati da una reazione definita “reazione di esterificazione”, che si verifica tra un acido e un alcol e porta alla formazione del gruppo funzionale esterico (-COO-).

Diversamente dalle altre categorie di composti, gli esteri erano presenti solamente nei campioni inoculati con *D. hansenii* Y15A. Anche i campioni di controllo erano sprovvisti di tali molecole. Ciò è probabilmente dovuto al metabolismo ossidativo di questo lievito che porta alla formazione di questi composti volatili, cosa che invece non fa il metabolismo fermentativo di *L. plantarum* LP23.

Infatti, riferimenti bibliografici a microrganismi (in particolare lieviti) sono inevitabili per quanto riguarda la biosintesi degli esteri (Liu et al., 2004). Si è riscontrato che i lieviti sono in grado di produrre una vasta gamma di composti volatili, tra cui esteri, se coltivati da soli o in associazione con batteri. Gli esteri risultano essere i composti maggiormente responsabili di aromi fruttati associati a colture di lieviti. Anche alcuni batteri lattici sono in grado di sintetizzare esteri in ambiente acquoso a partire da alcoli e gliceridi, tramite reazione di transferasi (Liu et al., 2004). Tuttavia, nonostante anche i batteri siano in grado di sintetizzare gli esteri, questa capacità non eguaglia quella dei lieviti, che sono risultati i maggiori produttori. Inoltre, non tutti i batteri lattici sono in grado di effettuare tale sintesi. Da ciò si può dedurre che *L. plantarum* LP23, utilizzato nella sperimentazione, non possedeva la capacità di sintetizzare esteri e che, al contrario, *D. hansenii* Y15A riusciva a sintetizzarli in maniera ottimale.

La concentrazione di esteri è aumentata all'aumentare delle ore di incubazione, passando da una concentrazione di 4,76% dopo 48 ore a 13,66 dopo 72 ore nel caso del campione non trattato. Il trattamento HPH ha contribuito ad innalzare il quantitativo, che è cresciuto di 7,55% a 48 ore fino a 25,59% dopo 72 ore.

L'etil-acetato è risultato essere l'estere maggiormente presente a livello quantitativo nei campioni, ed è un composto che apporta un aroma etereo, dolce e fruttato (Siroli et al., 2022).

## **Chetoni**

Per finire, anche i chetoni sono stati rilevati in quantità piuttosto basse seppur presenti in tutti i campioni, compresi i controlli.

I chetoni sono composti organici caratterizzati dalla presenza di un gruppo carbonile C=O dove il carbonio è legato a due gruppi idrocarburici R, che possono essere alifatici oppure aromatici. Provengono principalmente dall'ossidazione di acidi grassi liberi, ma anche dalla degradazione di aminoacidi e dall'ossidazione di carotenoidi (Karolkowski et al., 2021).

È stato possibile osservare come il trattamento HPH abbia contribuito nella diminuzione del quantitativo di chetoni per tutti i campioni rispetto ai corrispettivi non trattati, fatta eccezione per il campione inoculato con Y15A a 72 ore, dove il contenuto

chetonico è risultato superiore. Nei campioni di controllo è stato ben evidente l'effetto dell'HPH, che ha permesso di ridurre il contenuto da un valore del 10,82% fino a 2,34%. Nei campioni inoculati l'effetto del trattamento è stato più blando: a 24 ore di fermentazione ad opera del LAB il contenuto risultava dell'11,91% e, dopo il trattamento, è sceso fino a 6,96%. Dopo 48 ore, il contenuto nel non trattato è diminuito fino a 6,47% e, dopo il trattamento, ha raggiunto un valore di 2,68%.

Analogamente, il contenuto di chetoni presente nel campione inoculato con il lievito dopo 48 ore risultava essere del 5,89% e, in seguito al trattamento, è sceso fino a 0,63. Dopo 48 ore, il contenuto nel campione non trattato è sceso fino a 1,85%, ma questa volta il trattamento HPH ha innalzato il contenuto chetonico fino ad un valore di 5,60%. Il chetone maggiormente presente nei campioni è risultato 1-metilossi-2-propanone, seguito da 2-esanone, 2,3-butanedione e, infine, 2-eptanone. Tra questi, il 2,3-butanedione presenta un odore burroso/cremoso pungente.

### **5.6.1 Analisi delle Componenti Principali (PCA)**

Per meglio identificare le differenze tra i campioni è stata effettuata l'Analisi delle Componenti Principali (PCA). Dapprima, sono stati messi a confronto tutti i campioni con i controlli (figura 18) e poi, per identificare ancora meglio, sono state effettuate altre due analisi PCA: la prima ha messo a confronto i controlli con i campioni inoculati con *D. hansenii* Y15A (figura 19) e la seconda ha confrontato i controlli con i campioni inoculati con *L. plantarum* LP23 (figura 20).

Nelle figure che seguono, dalle immagini di sinistra è possibile osservare la distanza tra i campioni. Più sono vicini e più risultano simili; viceversa, più sono lontani più sono diversi. Invece, a destra sono indicate le variabili caratterizzanti i campioni.

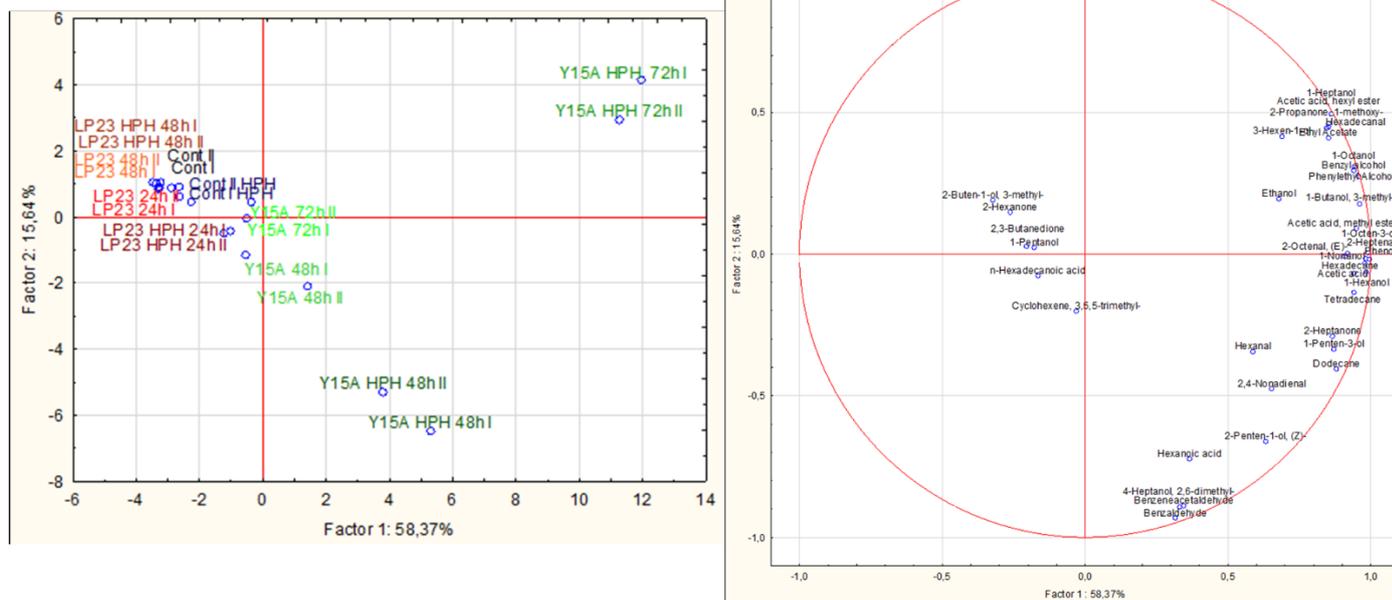


Fig. 18. Proiezioni dei casi (a sinistra) e variabili (a destra) ottenuti tramite PCA relativa ai composti volatili contenuti nei campioni, trattati o non trattati all'HPH, inoculati con *L. plantarum* LP23 e *D. hansenii* Y15A dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione e nei campioni di controllo immediatamente dopo la produzione (Cont) e il trattamento (Cont HPH). I campioni sono stati analizzati in doppio ed entrambe le repliche sono riportate (I, II).

In figura 18, l'analisi PCA possedeva il fattore 1 che discriminava una varianza del 58,37% e il fattore 2 del 15,64%. Dalla figura a sinistra si può osservare come la maggior parte dei composti siano risultati simili ai controlli, fatta eccezione per i campioni inoculati con il lievito e trattati all'HPH a 48 e 72 ore. Ciò significa che i campioni non sono risultati molto diversi tra loro, anche se in realtà non è così. Questo può essere dovuto sia al fatto che la varianza del 15,64% è piuttosto ridotta e rende le differenze poco significative, sia perché i campioni inoculati con Y15A e trattati con HPH sono risultati diversi. La loro diversità è evidente sia rispetto agli altri campioni sul piano fattoriale 1 sia tra di loro sul piano fattoriale 2. Infatti, i campioni trattati all'HPH e inoculati con il lievito si raggruppavano nel quadrante in basso a destra dopo 48 ore di incubazione e nel quadrante in alto a destra dopo le 72 ore. Quindi, questa forte diversità di pochi campioni rispetto al totale ha appiattito i risultati dei campioni restanti, rendendoli molto simili anche se in realtà presentano differenze. Per questo motivo, al fine di discriminare al meglio i campioni di controllo con quelli inoculati con *D. hansenii* Y15A è stata effettuata l'analisi PCA mostrata in figura 19.

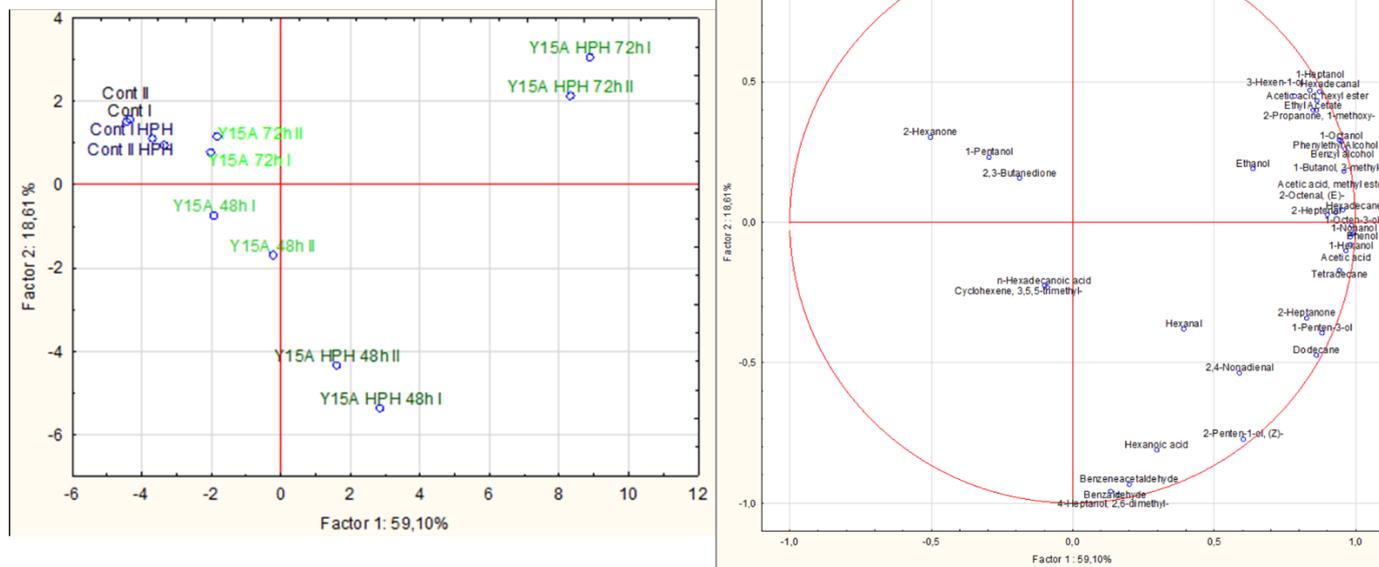


Fig. 19. Proiezioni dei casi (a sinistra) e variabili (a destra) ottenuti tramite PCA relativa ai composti volatili contenuti nei campioni, trattati o non trattati all'HPH, inoculati con *D. hansenii* Y15A dopo 48 e 72 ore di incubazione e nei campioni di controllo immediatamente dopo la produzione (Cont) e il trattamento (Cont HPH). I campioni sono stati analizzati in doppio ed entrambe le repliche sono riportate (I, II).

L'analisi PCA illustrata in figura 19 mostra una discriminazione del 59,10% sul fattore 1 e del 18,61% sul fattore 2.

È possibile osservare che, analogamente a prima, tutti i campioni trattati all'HPH risultano molto diversi dai controlli e tra di loro. Inoltre, anche i campioni inoculati non trattati risultano più distanti dai controlli rispetto a ciò che era stato osservato in figura 18. In particolare, risultano più diversi quelli a 48 ore di incubazione rispetto a quelli a 72 ore. È importante osservare che, in questo caso, il fattore 2 presenta una varianza più alta rispetto a quella precedente.

Nel grafico di destra è possibile individuare i composti volatili che differenziano i campioni tra loro. Ad esempio, l'acido esanoico è risultato tipico dei campioni trattati all'HPH a 48 ore mentre alcoli come etanolo ed eptanolo sono stati ritrovati in quelli trattati a 72 ore.

Infine, per distinguere i campioni inoculati con *L. plantarum* LP23 dai controlli è stata svolta l'analisi PCA mostrata in figura 20.

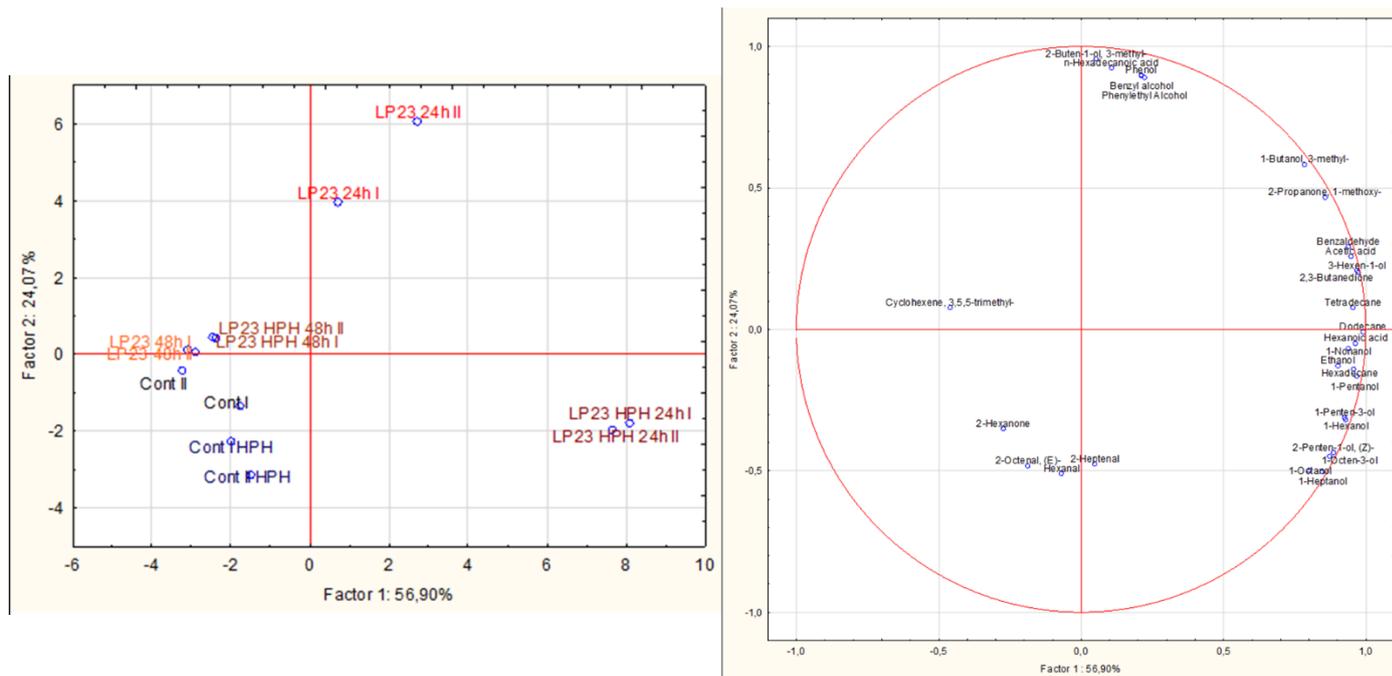


Fig. 20. Proiezioni dei casi (a sinistra) e variabili (a destra) ottenuti tramite PCA relativa ai composti volatili contenuti nei campioni, trattati o non trattati all'HPH, inoculati con *L. plantarum* LP23 dopo 24 e 48 ore di incubazione e nei campioni di controllo immediatamente dopo la produzione (Cont) e il trattamento (Cont HPH). I campioni sono stati analizzati in doppio ed entrambe le repliche sono riportate (I, II).

L'analisi PCA presenta una varianza fra i campioni pari al 56,90% sul fattore 1 e al 24,07% sul fattore 2. In questo caso, è dimostrato in maniera totalmente evidente che tra i campioni inoculati con il LAB e i campioni di controllo ci sono differenze a livello di composizione in molecole volatili e che, quindi, il grafico in figura 18 non è risultato discriminante. Inoltre, in figura 20 il fattore 2 è molto più alto rispetto a quello della PCA effettuata sul totale dei campioni (figura 18).

In questo caso, mentre i campioni di controllo si trovano raggruppati nel quadrante in basso a sinistra, indipendentemente dall'applicazione del trattamento HPH, i campioni inoculati con LP23 sono distribuiti nei restanti tre quadranti. I campioni fermentati dopo 48 ore sono risultati più simili ai campioni di controllo indipendentemente dal trattamento HPH mentre, dopo 24 ore di fermentazione i composti volatili presenti sono risultati molto differenti rispetto al controllo e ai campioni fermentati 48 ore. Nello specifico, i campioni non trattati e fermentati da *L. plantarum* LP23 si differenziavano dai campioni di controllo lungo il piano fattoriale 2 posizionandosi nel quadrante in alto a destra ed erano prevalentemente caratterizzati da composti come 2-buten-1-ol, 3-methyl-; phenol ed Hexadecanoic acid. Al contrario, i campioni trattati all'HPH e fermentati per 24 ore si differenziavano dai campioni di controllo lungo il piano fattoriale 1 discriminandosi in particolare per la presenza alcoli quali 1-penten-3-ol; 1-hexanol, 1-octen-3-ol; 2-penten-1-ol; 1-octanol e 1-heptanol.

Ad ogni modo, i campioni dopo 24 ore hanno presentato più componenti volatili rispetto ai campioni dopo 48 ore di fermentazione e ai controlli, tra cui diversi alcoli, alcani, chetoni, etc... Ciò risulta coerente perché, trattandosi di composti volatili, è giustificabile il fatto che questi si sviluppino durante le prime ore di fermentazione (24 h) poi vengano utilizzati dal microorganismo oppure volatilizzati nell'ambiente, non ritrovandosi più negli stessi campioni durante il proseguirsi della fermentazione (48 h).

## 6. CONCLUSIONI

Richieste di mercato sempre più esigenti e consumatori sempre più rivolti verso uno stile di vita sano ed equilibrato stanno orientando la ricerca verso l'ottenimento di ingredienti innovativi ad alto valore, che possano sostituire o integrare alimenti già esistenti.

La composizione chimica del cece, lo rende un alimento bilanciato e, pertanto, la farina di ceci rappresenta un ingrediente promettente per la formulazione di alimenti funzionali ad alto valore aggiunto.

L'applicazione di strategie biotecnologiche come la fermentazione possono rafforzare le proprietà nutrizionali e nutraceutiche dei legumi e 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. Inoltre, l'applicazione di trattamenti non termici come le alte pressioni di omogeneizzazione (HPH) potrebbero influire positivamente su questi ingredienti innovativi, influenzandone gli aspetti tecnologici, nutrizionali e funzionali. Infine, la combinazione fra il processo fermentativo e l'applicazione delle alte pressioni di omogeneizzazione può stimolare il rilascio di composti della matrice a favore del metabolismo microbico.

A questo proposito, lo scopo del lavoro è stato quello di abbinare i due processi al fine di valutare l'effetto della fermentazione, delle alte pressioni di omogeneizzazione e della combinazione fra i due, sul contenuto proteico, la capacità antiossidante, il colore e la composizione in molecole volatili di una matrice composta da farina di ceci ed acqua (in rapporto 1:2 p/p). Le fermentazioni delle miscele trattate e non trattate all'HPH sono state portate avanti singolarmente da un batterio lattico, *L. plantarum* LP23, fino a 48 ore e da un lievito, *D. hansenii* Y15A, che ha proseguito fino a 72 ore in condizioni aerobiche.

L'impiego dei microorganismi selezionati ha apportato notevoli cambiamenti alla materia prima iniziale.

In primo luogo, al termine della fermentazione è stato possibile osservare che sia *L. plantarum* LP23 sia *D. hansenii* Y15A sono stati in grado di adattarsi alla matrice e proliferare in essa. Il trattamento HPH ha influito negativamente solo sulla crescita del lievito, rallentandone lo sviluppo fino a 48 ore, dopo di che la crescita è ripresa analogamente al campione non trattato. *L. plantarum* LP23 si è rivelato un microorganismo con ottime capacità di crescita incrementando la sua concentrazione di due cicli logaritmici in 48 ore. Al contrario, *D. hansenii* Y15A ha impiegato 72 ore per incrementare il suo carico cellulare di poco più di un ciclo logaritmico.

Durante le ore di incubazione, entrambi i microorganismi hanno acidificato la matrice ma *L. plantarum* LP23 ha mostrato una capacità d'azione più spinta, coerentemente ai risultati ottenuti analizzando il profilo in molecole volatili. A tal proposito, è emerso

che i campioni inoculati con il LAB sono risultati più ricchi in acidi (e ciò spiega il maggiore potere acidificante); mentre i campioni inoculati con il lievito hanno mostrato un profilo più ricco in alcoli ed esteri, di cui questi ultimi completamente assenti nei restanti campioni. Infine, la fermentazione ha favorito la riduzione del contenuto di aldeidi, contenute in concentrazioni elevate solamente nei campioni di controllo. Ciò è da definirsi un aspetto positivo da un punto di vista di percezione organolettica. Infatti, le aldeidi, come l'esanale, sono composti che derivano dall'ossidazione degli acidi grassi e, se contenuti in concentrazione elevata nell'alimento, possono generare *off-flavours* e aromi sgradevoli.

Sulla base del contenuto in molecole volatili è stato possibile evincere che le differenze tra i campioni inoculati con *L. plantarum* LP23 erano principalmente dovute al tempo di fermentazione, in particolare, le maggiori differenze fra i campioni fermentati e quelli di controllo si evidenziavano dopo 24 ore di fermentazione. Al contrario, i campioni inoculati con *D. hansenii* Y15A si differenziavano, in termini di contenuto in molecole volatili, in base al trattamento HPH. Infatti, i campioni non trattati sono risultati più simili ai campioni di controllo; mentre quelli trattati all'HPH hanno mostrato un profilo in molecole volatili differente.

Entrambi i microrganismi hanno dimostrato capacità proteolitica piuttosto elevata. In particolar modo, *L. plantarum* LP23 ha evidenziato capacità di degradare la quasi totalità delle proteine solubili presenti nella matrice, utilizzandole per il proprio metabolismo e/o idrolizzandole a peptidi potenzialmente bioattivi. Inoltre, dall'elettroforesi su gel di poliacrilammide è risultato che entrambi i microrganismi hanno favorito la riduzione di peptidi a peso molecolare più alto rispetto a quelli a peso molecolare inferiore. Il trattamento HPH non si è rivelato fortemente impattante sui campioni rispetto ai corrispettivi campioni non trattati.

I peptidi contenuti nei campioni potrebbero essere potenzialmente bioattivi e avere una potenziale capacità antiossidante. A tal proposito, anche quest'ultima ha mostrato risultati piuttosto soddisfacenti. In particolare, è emerso che la capacità antiossidante maggiore era posseduta dai campioni inoculati con *L. plantarum* LP23 ed anche in questo caso, il trattamento HPH non aveva influenzato significativamente il suo incremento nella matrice. Il contenuto di fenoli totali confermava quanto riportato sopra. Infatti, nella matrice, i fenoli agiscono come antiossidanti incrementandone la capacità. Come previsto, i campioni inoculati con *L. plantarum* LP23 possedevano un contenuto maggiore di fenoli totali rispetto a quelli inoculati con il lievito. Avendo un contenuto più elevato, sicuramente da questo punto di vista *L. plantarum* LP23 risulta più promettente di *D. hansenii* Y15A. A dare ulteriore conferma è stata l'analisi del colore; infatti, i campioni inoculati con il LAB, aventi un'attività antiossidante maggiore, hanno evidenziato una tonalità e saturazione di colore più simile a quelle dei campioni di controllo rispetto ai campioni inoculati con il lievito, che invece mostravano un livello di saturazione più bassa e una colorazione più tendente al grigio.

In riferimento a quanto appena descritto, è possibile affermare che entrambi i microrganismi utilizzati durante la sperimentazione potrebbero essere utilizzati come starter selezionati, al fine di ottenere prodotti innovativi ad alto valore aggiunto. Tuttavia, non si può affermare lo stesso per quanto concerne il trattamento HPH in quanto, in linea generale, non ha generato differenze significative rispetto ai campioni fermentati non trattati e rispetto ai campioni non fermentati (campioni di controllo). Sicuramente la fermentazione ha dimostrato effetti positivi sui campioni rispetto ai campioni di controllo, tra cui innalzamento della capacità antiossidante, capacità di acidificare la matrice e innalzamento del contenuto peptidico.

Al fine di confermare la funzionalità dell'ingrediente innovativo ottenuto sarebbe interessante approfondire la conoscenza dei peptidi contenuti all'interno della matrice e la presenza di aminoacidi essenziali ottenuti come risultato della proteolisi microbica. A tal proposito, l'identificazione dei peptidi e degli aminoacidi contenuti permetterebbe di investigare la loro funzionalità ed individuare i peptidi bioattivi e gli aminoacidi essenziali maggiormente presenti. Inoltre, nei legumi, alcuni degli zuccheri, come il rafinosio e il fruttosio, non possono essere completamente digeriti e assorbiti, portando alla produzione indesiderata di gas e favorendo la flatulenza. La fermentazione potrebbe ridurre il contenuto di questi zuccheri attenuandone gli effetti collaterali. Un ulteriore aspetto da considerare riguarda il contenuto di composti anti-nutrizionali naturalmente contenuti nei ceci come, ad esempio, i tannini e i fitati. Anche in questo caso sarebbe interessante investigare l'effetto della fermentazione da parte dei microrganismi selezionati sul contenuto di tali composti.

Concludendo, è possibile affermare che i microrganismi utilizzati sono stati in grado di conferire caratteristiche peculiari al prodotto finale, specialmente per quanto concerne *L. plantarum* LP23, e che, contrariamente a quanto atteso, il trattamento ad alte pressioni di omogeneizzazione non ha apportato differenze significative alla matrice per quanto riguarda gli aspetti che sono stati studiati.

Ad ogni modo, per ottenere un quadro generale più completo andrebbero valutati altri parametri tecnologici quali WHC (*Water Holding Capacity*), WBC (*Water Binding Capacity*), aw, capacità di gelificazione e molte altre.

## 7. BIBLIOGRAFIA

Adebo, O.A., Njobeh, P.B., Adebisi, J.A., Gbashi, F., Phoku J.Z. & Kayitesi, E. (2017). Fermented Pulse-Based Food Products in Developing Nations as Functional Foods and Ingredients. In: Chavarri Hueda, M. (ed). Functional Food – Improve Health through adequate food. doi:10.5772/intechopen.69170.

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

Aluko, R. E. (2018). Food protein-derived peptides: Production, isolation, and purification. In R. Y. Yada (Ed.), *Proteins in food processing* (pp. 389-412). Cambridge, UK: Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00016-4>

Alvarez-Sabatel, S., Marañón, I.M.D., Arbolea, J.C., 2015. Impact of high pressure homogenization (HPH) on inulin gelling properties, stability and development during storage. *Food Hydrocolloids* 44, 333–344.

Angulo-Bejarano, P. I., Verdugo-Montoya, N. M., Cuevas-Rodríguez, E. O., Milán-Carrillo, J., Mora-Escobedo, R., Lopez-Valenzuela, J. A., ... & Reyes-Moreno, C. (2008). Tempeh flour from chickpea (*Cicer arietinum* L.) nutritional and physicochemical properties. *Food Chemistry*, 106(1), 106-112.

Augchararat Klongklaew, Kolawole Banwo, Pornpimon Soodsawaeng, Ashish Christopher, Chartchai Khanongnuch, Dipayan Sarkar, Kalidas Shetty (2022). Lactic acid bacteria based fermentation strategy to improve phenolic bioactive-linked functional qualities of select chickpea (*Cicer arietinum* L.) varieties. *NFS Journal* 27 (2022) 36–46.

Borresen, E.C., Henderson, A.J., Kumar, A., Weir, T.L. & Ryan, E.P. (2012). Fermented foods: patented approaches and formulations for nutritional supplementation and health promotion. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 4(2): 134-140. doi: 10.2174/2212798411204020134.

Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010a). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43, 414–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003>

Breuer, U., & Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii*—an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23(6), 415-437.

Brighenti, F., Valtuena, S., Pellegrini, N., Ardigo, D., Del Rio, D., Salvatore, S., ... & Zavaroni, I. (2005). Total antioxidant capacity of the diet is inversely and independently related to plasma concentration of high-sensitivity C-reactive protein in adult Italian subjects. *British Journal of Nutrition*, 93(5), 619-625.

Bulti Merga & Jema Haji | (2019) Economic importance of chickpea: Production, value, and world trade, *Cogent Food & Agriculture*, 5:1, 1615718, DOI: 10.1080/23311932.2019.1615718

Burns, P., Patrignani, F., Serrazanetti, D., Vinderola, G., Reinheimer, J., Lanciotti, R., et al. (2008). Probiotic Crescenza cheese containing *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus acidophilus* manufactured with high pressure-homogenized milk. *Journal of Dairy Science*, 91, 500–512.

Butinar L, Santos S, Spencer-Martins I, Oren A, Gunde- Cimerman N. (2005). Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol Lett* 244: 229–234.

Campbell-Platt, G. (1994). Fermented foods — a world perspective. *Food Research International*, 27(3): 253-257. doi: 10.1016/0963-9969(94)90093-0.

Charanjit Kaur & Harish C. Kapoor (2002). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology* 2002, 37, 153–161.

Choct, M., Hughes, R.J. and Annison, G. (1999) Apparent metabolisable energy and chemical composition of Australian wheat in relation to environmental factors. *Australian Journal of Agricultural Research* 50, 447–451.

Christensen, B. (1996) Folate deficiency, cancer and congenital abnormalities: is there a connection? *Tidsskrift for den Norske Laegeforening* 116, 250–254.

Danuta Rachwa-Rosiak, Ewa Nebesny & Grażyna Budryn (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, DOI: 10.1080/10408398.2012.687418

Fernando, W., Hill, J., Zello, G., Tyler, R., Dahl, W., & Van Kessel, A. (2010). Diets

supplemented with chickpea or its main oligosaccharide component raffinose modify faecal microbial composition in healthy adults. *Beneficial microbes*, 1(2), 197-207.

Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis*, 24(7), 1043-1048.

Food and Agriculture Organization (FAO). (2019). FAOSTAT Statistical Database of the United Nation Food and Agriculture Organization (FAO) statistical division. Rome.

Fröhlich-Wyder, M. T., Arias-Roth, E., & Jakob, E. (2019). Cheese yeasts. *Yeast*, 36(3), 129-141.

Garrido-Galand, S.; Asensio-Grau, A.; Calvo-Lerma, J.; Heredia Gutiérrez, AB.; Andrés Grau, AM. (2021). The potential of fermentation on nutritional and technological improvement of cereal and legume flours: a review. *Food Research International*. 145:1-15. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110398>

G. Tabanelli, F. Patrignani, G. Vinderola, J.A. Reinheimer, F. Gardini, R. Lanciotti (2013). Effect of sub-lethal high pressure homogenization treatments on the *in vitro* functional and biological properties of lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology* 53 580–586

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.

Hafiz Arbab Sakandar, Yongfu Chen, Chuantao Peng, Xia Chen, Muhammad Imran & Heping Zhang (2021): Impact of Fermentation on Antinutritional Factors and Protein Degradation of Legume Seeds: A Review, *Food Reviews International*, DOI: 10.1080/87559129.2021.1931300

Huang, Z.; Zhang, J.; Zhang, G.; Gao, F.; Bi, C. The Impact of High-Pressure Homogenization and Thermal Processing on the Functional Properties of De-Fatted Chickpea Flour Dispersion. *Foods* 2023, 12, 1513. <https://doi.org/10.3390/foods12071513>

Karolkowski, A.; Guichard, E.; Briand, L.; Salles, C. Volatile Compounds in Pulses: A Review. *Foods* 2021, 10, 3140. <https://doi.org/10.3390/foods10123140>

Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B. & Kanner, J. (1993). Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*, 47, 85–89.

Knights, E. J., & Hobson, K. B. (2016). Chickpea: Overview. In C. Wrigley, H. Corke, Krishna Murti, C.R. (1975) Biochemical studies on bengal gram. *Journal of Scientific and Industrial Research* 34, 266–281.

Knorr, D. (1999). Novel approaches in food-processing technology: new technologies for preserving foods and modifying function. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 485–491.

K. Seetharaman, & J. Faubion (Eds.), *Encyclopedia of food grains: Second Edition* (pp. 316–323). Cambridge, MA: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394437-5.00035-8>

Manuel Gómez, Bonastre Oliete, Cristina M. Rosell, Valentín Pando, Encarnación Fernández (2008). Studies on cake quality made of wheat–chickpea flour blends. *LWT – Food Science and Technology*, Volume 41, Issue 9, Pages 1701-1709.

Mathur, K.S., Khan, M.A. and Sharma, R.D. (1968) Hypocholesterolemic effect of Bengal gram: a long-term study in man. *British Medical Journal* 1, 30–31.

McGuire, R. G. (1992). Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 27(12), 1254-1255.

Minwei Xu, Zhao Jin, Yang Lan, Jiajia Rao, Bingcan Chen (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. *Department of Plant Sciences, North Dakota State University, Fargo, ND 58108, USA*

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.

Nutrient Data Laboratory, USDA Agricultural Research Service (2005) USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Beltsville, Maryland. Available at: [www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/)

Nwokolo, E. and Smartt, J. (1996). Food and feed from legumes and oilseeds, pp. 4–5. Chapman and Hall E-publishing.

O’neill, T. E. (1996). Flavor binding by food proteins: An overview. *Flavor-Food Interactions*, 633, 59–74.

Patrignani, F., Burns, P., Serrazanetti, D., Vinderola, G., Reinheimer, J. A., Lanciotti, R., et al. (2009). Suitability of high pressure-homogenized milk for the production of probiotic fermented milk containing *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Research*, 76, 74–82.

Piergiorgio Comuzzo and Sonia Calligaris, 2019. Potential Applications of High Pressure Homogenization in Winemaking: A Review. Department of Agricultural, Food, Environmental and Animal Sciences, University of Udine, via Sondrio 2/A, 33100 Udine, Italy. *Beverages* 2019, 5, 56; doi:10.3390/beverages5030056

Puchau, B., Zulet, M. A., de Echávarri, A. G., Hermsdorff, H. H. M., & Martínez, J. A. (2010). Dietary total antioxidant capacity is negatively associated with some metabolic syndrome features in healthy young adults. *Nutrition*, 26(5), 534-541.

Pundir, R.P.S., Reddy, K.N. and Mengesha, M.H., 1992. Pod volume and pod filling as useful traits of chickpea. *International Chickpea Newsletter*, 17: 18-20

Ram J.Singh and prem P.Jauhar (2006), GENETIC RESOURCES, CHROMOSOME ENGINEERING, AND CROP IMPROVEMENT, Chapter 7 Chickpea (*Cicer arietinum* L.).

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 4, 304–309.

Sanchez-Mata, M.C., Penuela-Teruel, M.J., Camara-Hurtado, M., Diez-Marques, C. and Torija-Isasa, M.E. (1998) Determination of mono-, di-, and oligosaccharides in legumes by high-performance liquid chromatography using an amino-bonded silica column. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 3648–3652.

Scarpa, S. (2015). Biocompatibilità, citotossicità e attività antiossidante di

nanoparticelle di acido polilipoico.

Sheldrake, A.R. and Saxena, N.P., 1979. The growth and development of chickpea under progressive moisture stress. In: eds. H. Mussel and R.C. Staples, *Stress Physiology in Crop Plants*. John Wiley, Chichester, pp. 465-485

Siroli, L.; Giordani, B.; Rossi, S.; Gottardi, D.; McMahon, H.; Augustyniak, A.; Menon, A.; Vannini, L.; Vitali, B.; Patrignani, F.; et al. Antioxidant and Functional Features of Pre-Fermented Ingredients Obtained by the Fermentation of Milling By-Products. *Fermentation* 2022, 8, 722. <https://doi.org/10.3390/fermentation8120722>

Size, E. O. M. (2019). Share & trends analysis report by application (cleaning & home, medical, food & beverages, spa & relaxation), by product, by sales channel, and segment forecasts, 2019-2025. *Report ID*, 978-1.

Skrzypczak, K., Jabłońska-Ryś, E., Gustaw, K., Sławińska, A., Waśko, A., Radzki, W., ... & Gustaw, W. (2019). Reinforcement of the antioxidative properties of chickpea beverages through fermentation carried out by probiotic strain *Lactobacillus plantarum* 299v. *J. Pure Appl. Microbiol*, 13, 1-12.

Song, Y. S., Frías, J., Martinez-Villaluenga, C., Vidal-Valdeverde, C., & de Mejia, E. G. (2008). Immunoreactivity reduction of soybean meal by fermentation, effect on amino acid composition and antigenicity of commercial soy products. *Food chemistry*, 108(2), 571-581.

S.-Q. Liu, R. Holland, V.L. Crow (2004). Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *International Dairy Journal* 14 (2004) 923–945.

USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24 (<http://ndb.nal.usda.gov/>).

Van der Maessen, L.J.G (1972). *Cicer L.*, a monograph of the genus, with particular reference to the chickpea (*Cicer arietinum* L.), its ecology and cultivation. Wageningen University and Research.

van der Maesen, L.J.G., Origin, history and taxonomy of chickpea. In *The Chickpea*, Saxena, M.C. and Singh, K.B., Eds., CAB International, Cambridge, U.K., 11, 1987.

Xiang, H., Sun-Waterhouse, D., Waterhouse, G.I.N., Cui, C. & Ruan, Z. (2019). Fermentation-enabled wellness foods: A fresh perspective. *Food Science*

*and Human Wellness*, 8(3): 203-243. doi: 10.1016/j.fshw.2019.08.003.

Xu, L.N., Guo, S. & Zhang, S.W. (2019). Effects of solid-state fermentation on the nutritional components and antioxidant properties from quinoa. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 31(1): 39-45. doi: 10.9755/ejfa.2019.v31.i1.1898.

Yoo, S. H., & Chang, Y. H. (2016). Volatile compound, physicochemical, and antioxidant properties of beany flavor-removed soy protein isolate hydrolyzates obtained from combined high temperature pre-treatment and enzymatic hydrolysis. *Preventive Nutrition and Food Science*, 21(4), 338–347.

Zhi-gang Huang, Xue-ying Wang, Jia-yi Zhang, Yi Liu, Tong Zhou, Shang-yi Chi, Chong-hao Bi, (2022). High-pressure homogenization modified chickpea protein: Rheological properties, thermal properties and microstructure. *Journal of Food Engineering* 335 (2022) 111196

## **SITOGRAFIA**

FAOSTAT <https://www.fao.org/faostat/en>