

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI**

TITOLO DELLA TESI

Studio di un impasto acido funzionale ad elevata biodisponibilità di selenio

Tesi in:

Microbiologia delle Fermentazioni

(Appartenente al corso integrato di Microbiologia Avanzata e Predittiva)

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Maria Elisabetta Guerzoni

Presentata da:

Mattia Baldissarri

Correlatori:

Dott. Andrea Gianotti

Dott.ssa Danielle Laure Taneyo Saa

Sessione II

Anno Accademico 2012/2013

Indice Tesi

Capitolo 1: L'Impasto acido	1
1.1 Definizione dell'impasto acido	2
1.2 “Cultura” dell'impasto acido	3
1.3 Microflora nei cereali	4
1.4 Ecologia microbica dell'impasto acido	5
1.5 Classificazione dell'impasto acido	7
1.6 Lieviti nell'impasto acido	11
1.7 Batteri Lattici nell'impasto acido	13
1.8 Vie metaboliche dei batteri lattici	15
1.8.1 Metabolismo dei carboidrati	15
1.8.2 Utilizzo di accettori esterni di elettroni	21
1.8.3 Metabolismo degli acidi organici	24
1.8.4 Metabolismo delle sostanze azotate	25
1.8.5 Catabolismo degli amminoacidi	27
1.8.6 Metabolismo lipidico	29
1.8.7 Produzione di EPS	29
1.9 Indicatori qualitativi dell'impasto acido	30
1.10 Tecnologie produttive dell'impasto acido	33
1.10.1 Impasti acidi a più stadi	34
1.10.2 Impasti acidi a stati ridotti	35
1.10.3 Impasto acido surgelato	36
1.10.4 Impasto acido sistema francese	37
1.10.5 Impasto acido sistema americano	37
1.11 Ruolo degli ingredienti nella produzione dei prodotti da forno	39
1.12 Influenza dell'impasto acido nella formulazione dei prodotti da forno	47

Capitolo 2: Il Selenio	57
2.1 Cenni storici	57
2.2 Proprietà del selenio	58
2.3 Selenio nell'ambiente	60
2.4 Selenio negli alimenti	65
2.5 Incremento del selenio nel sistema alimentare	69
2.6 Fabbisogno, biodisponibilità e metabolismo del selenio	71
2.7 Malattie da carenza ed eccesso di selenio	78
Capitolo 3: Selenio e batteri lattici interazioni nell'impasto acido	81
3.1 Metabolismo del selenio nei batteri lattici	82
3.1.1 Detossificazione del selenio	85
3.2 Interazioni del selenio con i batteri lattici nell'impasto acido	86
Capitolo 4: Analisi economica del mercato dei prodotti funzionali	91
4.1 Abitudini alimentari in epoca moderna	91
4.2 Andamento del settore	94
4.3 Indagini di Mercato svolte dal progetto "Selenium Biotec 2"	101
4.3.1 Focus Group	101
4.3.2 Interviste alle aziende target	101
4.3.3 Indagine nelle abitudini alimentari del consumatore target	103
4.4 Conclusioni del progetto	104
Capitolo 5: Obiettivi della sperimentazione	105
Capitolo 6: Materiali e metodi	107
6.1 Ceppi utilizzati	107
6.2 Terreni, condizioni di crescita e preparazione dell'inoculo	108

6.3	Screening dei batteri lattici	109
6.4	Preparazione dell'impasto acido	110
6.5	Preparazione piadine	112
6.6	Digestione gastrica <i>in vitro</i>	114
6.7	Determinazione dell'attività antiossidante totale (TAA)	115
6.8	Quantificazione delle proteine totali con metodo Bradford	117
6.9	Elettroforesi SDS-PAGE	117
6.10	Spettrometria al Plasma su HPLC-ICP-MS	118
6.11	Analisi Elettroforetica 2-DE	121
6.11.1	Preparazione della biomassa (pellet) dei batteri lattici	121
6.11.2	Preparazione dei campioni nell'analisi 2-DE	122
6.11.3	Elettroforesi 2-DE	122
Capitolo 7: Analisi e discussione dei risultati		125
7.1	Screening dei batteri lattici per la selezione di ceppi ad elevata resistenza al selenio	125
7.1.1	1° Screening	127
7.1.2	2° Screening	128
7.1.3	Elettroforesi bidimensionale	129
7.2	Formulazione delle piadine	130
7.3	Studio dell'influenza del processo fermentativo su alcune caratteristiche funzionali delle piadine arricchite di selenio	130
7.3.1	Elettroforesi SDS-PAGE e analisi densitometrica su digeriti gastrici di piadina	133
7.3.2	Contenuto proteico con metodo Bradford	134
7.3.3	Capacità antiossidante totale sul digerito gastrico (TAA)	134
7.3.4	Studio dell'influenza del processo fermentativo del pattern di speciazione del selenio tramite spettrometria al plasma in HPLC-ICP-MS	135

Capitolo 8: Conclusioni 139

Bibliografia 141

Allegati: Grafici della parte sperimentale

Capitolo 1: L'impasto acido

Gli alimenti a base di cereali sono una delle più importanti risorse di nutrienti che soddisfano l'umanità da millenni. La fermentazione dei cereali, attraverso la biotecnologia dell'impasto acido, rappresenta una tra le più antiche e note scienze bromatologiche, scoperta dagli albori della storia alimentare.

Le produzioni cerealicole, in parte utilizzate nel settore dei distillati (Birra, Whisky, Bourbon e Sakè), sono protagoniste indiscusse nel settore dei prodotti da forno dove la fermentazione determina cambiamenti della qualità intrinseca del prodotto naturale. Hammes *et al.*, (2005) riporta le principali modificazioni osservabili nella fermentazione, come metamorfosi nella texture, flavour, sapore, aspetti nutrizionali ed estetici e nella sicurezza igienica del prodotto.

Nel diciannovesimo secolo l'avvento di nuovi processi per la lievitazione dei prodotti da forno, come il lievito di birra (*Saccharomyces cerevisiae*) e il lievito chimico (reazioni o decomposizioni di sali inorganici), resi necessari dalle crescenti richieste del mercato, ha provocato il disuso dell'impasto acido in quanto necessitava di complessi accorgimenti tecnici e lunghe tempistiche produttive, in favore di una migliore standardizzazione qualitativa e produttiva connessa con l'utilizzo delle lievitazioni chimiche. Tuttavia, queste tendenze, hanno determinato nei prodotti dinamiche di "appiattimento" del gusto e aroma, con shelf-life prolungate utilizzando conservanti per migliorarne la conservabilità e l'appeal organolettico. Attualmente, nel susseguirsi delle scoperte scientifiche nel campo delle scienze alimentari, la moderna biotecnologia dei prodotti da forno sta riscoprendo l'uso della madre acida come agente lievitante o come un semplice coadiuvante, grazie sia ai numerosi vantaggi tecnologici/sensoriali/nutrizionali offerti che alla sua immagine naturale di "additive-free", permettendo in formulazione di seguire l'attuale tendenza industriale della "Clean Label" (Salovaara, 1998). Già da tempo, Brummer e Lorenz,(1991), hanno intuito le dinamiche evolutive del mercato panificatorio verso un rinnovato successo dei

prodotti da forno tradizionali a lievitazione naturale con una sempre crescente domanda da parte dei consumatori per i cibi più naturali, gustosi e sani.

1.1 Definizione dell'impasto acido

Osservando le molteplici pubblicazioni accademiche e constatando la mancanza di una specifica legislazione Italiana, fatta eccezione per il concetto generico di “lievito”, Legge 4 luglio 1967, n. 580 e D.P.R del 30 novembre 1998 e del art. 14:

1. Il lievito impiegabile nella panificazione deve essere costituito da cellule in massima parte viventi con adeguato potere fermentativo, con umidità non superiore al 75 per cento e con ceneri non superiori all'8 per cento riferito alla sostanza secca.

2. La crema di lievito impiegabile nella panificazione deve essere costituita da cellule in massima parte viventi con adeguato potere fermentativo, con umidità non superiore all'80% e con ceneri non superiori all'8% riferito alla sostanza secca;

per *impasto acido* o *madre acida* o *lievito naturale* si intende: un agente lievitante biologico, o semplice coadiuvante, ottenuto da un impasto costituito da farine distinte o di un loro mix (*Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Secale cereale*, *Hordeum vulgare*), acqua ed eventualmente sale, fermentato spontaneamente con l'intervento di microrganismi autoctoni, oppure attraverso l'utilizzo di starter microbiologici, ottenendo nel tempo, con le differenti tecniche panificatorie che prevedono o meno la tecnica dei “rinfreschi”, un'ottimizzazione delle distinte capacità di acidificazione o lievitazione o entrambe, da utilizzare nei prodotti lievitati da forno.

1.2 “Cultura” dell’impasto acido

Nel contesto mondiale il termine anglosassone “Sourdough” viene tradotto in differenti modi considerando i contesti storici in cui si denota il suo utilizzo.

In Italia, l’espressione più comunemente utilizzata sia nel linguaggio scientifico che nella società, è quello di *lievito naturale*, insieme al sinonimo più “tecnico” di *impasto acido*. In Germania, Spagna e Francia, viene definito rispettivamente "*sauerteig, levain*" o "*levain naturelle*" e "*masa agria* o *masa madre*". Durante le differenti fasi del processo produttivo, il “rinfresco” è lo stadio dove il lievito naturale è aggiunto ad un ulteriore miscela di farina e acqua, e/o altri ingredienti, iniziando una serie di propagazioni che permetteranno di ottenere la quantità di impasto acido desiderata. Al termine dei rinfreschi o propagazioni il lievito viene definito in Italia *lievito naturale maturo* o *impasto acido maturo*, negli Stati Uniti "*full sour*", in Germania "*vollsauer*", in Francia "*levain tout point*" e in Spagna "*masa madre matura*" (Onno e Roussel , 1994; Ottogalli *et al.*,1996; Hammes e Gänzle, 1998).

Questo applicativo è utilizzato principalmente come innesco microbico nelle preparazioni di prodotti da forno dolci e salati. In Italia, nell’enorme patrimonio gastronomico, si osservano numerose tipologie di prodotti da forno, tanto che Ottogalli *et al.*,(1996), sostiene che un 30% della produzione utilizzi *lieviti naturali*, esempi si riscontrano nei prodotti da ricorrenza: *Panettone* di Verona, *Pandoro* di Milano, *Colomba*, o nelle tipicità regionali: *Focaccia Dolce* del Veneto, *Biscotti* di Lagaccio (Liguria), *Pan Dolce* di Genova, *Bisciola* della Valtellina o nei prodotti da prima colazione: *Brioche*s. Invece, tra quelli salati, sempre in Italia, troviamo tipicità regionali di pane: *Toscano*, *Carasau*, *Ferrarese*, *Altamura* etc. e prodotti più industrializzati come grissini e crackers.

Nel mondo, l’uso del *lievito naturale*, si ritrova nel "*Pain au levain*" (Francia), "*Pan de masas agrias*" (Spagna), "*Yuvurlak ekmek*" (Turchia), "*Shamsi*" (Egitto), "*Sangak*" (Iran). Pani caratteristici dal particolare impasto acido a base di segale sono tipici delle zone del Nord Europa, mentre altre tipologie a base di farina di riso e fagioli neri sono: "*idli*" (India), il "*Puro*" (Filippine) ed infine il "*Kinhra*" (Sudan) a base di farina di Sorgo.

1.3 Microflora nei cereali

Come riportato da De Vuyst *et al.*, (2005): << I cereali grezzi sono costituiti al momento della raccolta e nelle successivi fasi di stoccaggio da un'eterogenea microflora, composta principalmente da batteri, lieviti e funghi, nell'ordine di 10^4 - 10^7 UFC/g, mentre la farina bianca derivata ne può contenere 2×10^4 – 6×10^6 CFU/g (Stolz, 1999).

I batteri, sono soprattutto mesofili, si possono trovare in modo spontaneo con la fermentazione tramite gli impasti acidi. Essi comprendono batteri Gram-negativi aerobi (es. *Pseudomonas*) e anaerobi facoltativi (Enterobacteriaceae), così come batteri lattici (LAB) Gram-positivi: omofermentanti (*Lb. casei*, *Lb. coryniformis*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* e *Lb. salivarius*), eterofermentanti (*Lb. brevis* e *Lb. fermentum*), omofermentanti cocchi (*E. faecalis*, *Lb. lactis*, *P. acidilactici*, *P. parvulus*, e *P. pentosaceus*), e eterofermentanti cocchi (*Leuconostoc*, *Weissella*). Inoltre, sono presenti gli indesiderabili *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, nonché possono essere presenti altri batteri..

Seguendo l'ordine, per quel che riguarda i lieviti sono rilevati, sia nel settore dei cereali (fino a 9×10^4 UFC/g) che nelle farine (fino a 2×10^3 CFU/g): *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulasporea*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* e *Sporobolomyces*.

Dovrebbe essere sottolineato che *S. cerevisiae* non viene trovato nel materiale grezzo, la sua presenza nel lievito naturale può essere spiegata mediante l'applicazione diretta di lievito di birra nella panificazione praticata quotidianamente (Corsetti *et al.*,2001;. Galli, Franzetti, e Fortina, 1987). Tra i funghi (circa 3×10^4 UFC / g) si riscontrano: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, e *Ulocladium* (dal campo), e *Aspergillus* e *Penicillium* (dal deposito) >>.

1.4 Ecologia microbica dell'impasto acido

L'origine della microflora dell'impasto acido risiede principalmente nella natura delle materie prime impiegate, con una maggior importanza per le farine, in quanto non sono soggette, per ovvie ragioni, a sterilizzazione preventiva.

Nelle attuali tipicità regionali discendenti da antiche tradizioni culturali popolari, il lievito naturale è avviato nel suo sviluppo attraverso l'uso di matrici naturalmente ricche in *LAB* e lieviti, come alcuni frutti maturi, (ricchi in sostanze zuccherine, arancia, limone, mela, albicocca, fico, uva), prodotti vegetali (fieno) o addirittura sterco di cavallo e alcuni prodotti di origine animale come lo yogurth.

Gli impasti acidi sono un'immensa fonte di biodiversità microbiologica, costituendo un complesso biologico in continua trasformazione nel quale i fattori tecnologici interagiscono con le variabili microbiologiche. Secondo Foschino e Galli (1997) i fattori che influenzano la tipologia e la concentrazione della microflora sono:

- Caratteristiche degli ingredienti, qualità delle materie prime e formulazione dell'impasto
- Modalità di produzione, uso o non uso dell'innesto naturale o tramite colture starter, condizioni di processo (tempo, temperatura, agitazione o stasi dell'impasto acido).

LAB e lieviti sono i microrganismi maggiormente riscontrati negli impasti acidi (Gobbetti *et al.*, 2005).

Fattori endogeni ed esogeni durante la produzione dell'impasto acido condizionano gli attributi biotecnologici, come si evince dalla figura 1 (Gobbetti *et al.*, 2010), andando ad influenzarne reologia, aspetti sensoriali, nutritivi e conservazione del prodotto in cui è utilizzato l'impasto acido.

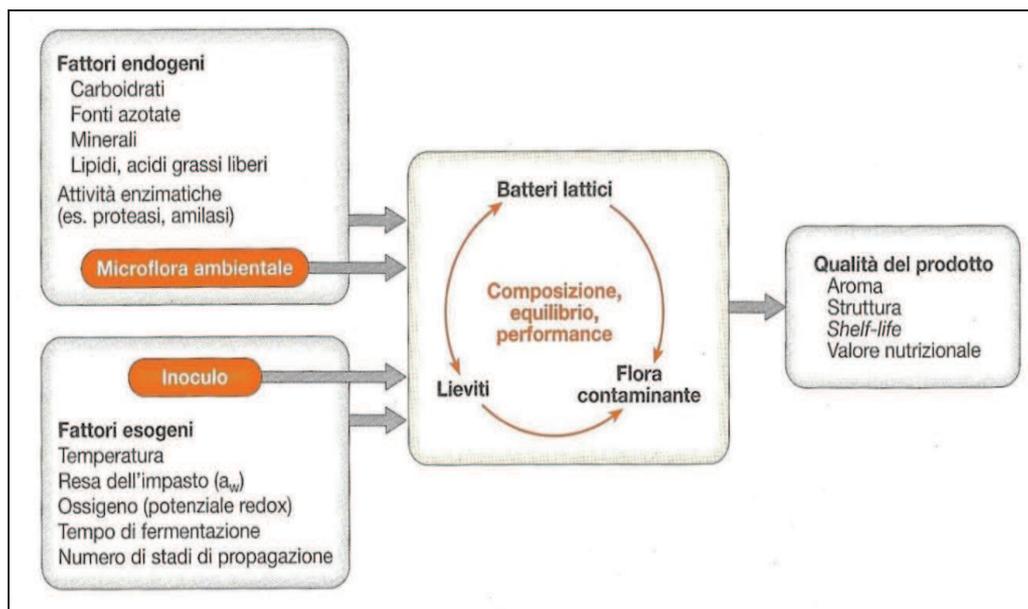


Figura 1: Dinamiche e variabili nella produzione dell'impasto acido (Gobbetti *et al.*, 2010).

In pratica, i forti effetti esercitati da questi parametri come la resa dell'impasto (Dough Yield, DY) aggiunta di sale, quantitativo e composizione dello starter microbiologico, gli step fermentativi e i tempi di fermentazione, possono, durante la continuazione dei “rinfreschi” etc. selezionare la microflora caratteristica (tra batteri lattici e lieviti) nelle differenti preparazioni panificatorie e permettono allo stesso tempo di previre lo sviluppo di altri microrganismi nocivi provenienti da nuove materie prime grezze o dall'ambiente di lavorazione (De Vuyst, LB. e Neysens, P., 2005).

Nel processo biotecnologico fermentativo i batteri lattici acidificano (acido lattico, acido acetico) la matrice mentre i lieviti determinano la capacità lievitante legata alla produzione di CO_2 e Etanolo (Hammes e Gänzle, 1998) nel prodotto finito.

Di seguito, in figura 2, si riporta l'evoluzione microbica durante la fermentazione delle due principali specie microbiche batterici presenti nella panificazione (lieviti e batteri lattici) con indicazione del pH e dell'acidità titolabile:

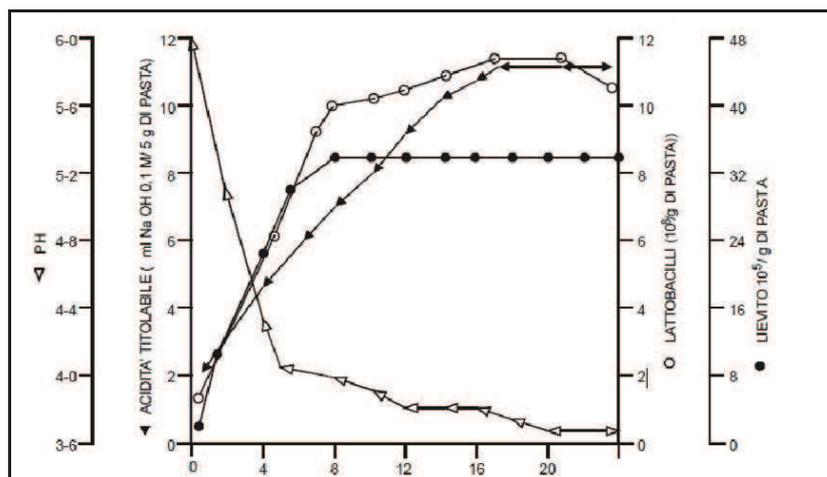


Figura 2: Evoluzione del pH e acidità sulla base della popolazione microbica di lieviti e batteri lattici in sviluppo.

In particolare negli impasti acidi sono stati isolati più di 50 specie di batteri lattici, appartenenti al genere *Lactobacillus* (Hammes *et al.*, 2005), e più di 20 specie di lieviti, appartenenti al genere *Saccharomyces* e *Candida* (De Vuyst, LB. e Neysens, P., 2005). Secondo Gobbetti *et al.*, (2001) e Ottagalli G *et al.*, (1996) nell'impasto acido maturo, utilizzato come agente lievitante, i batteri lattici e lieviti sono presenti, rispettivamente, in concentrazioni variabili di $10^7/10^9$ UFC/g e $10^5/10^7$ UFC/g con rapporto di 100:1, anche se tale rapporto varia in relazione alle caratteristiche dell'impasto acido (Vernocchi *et al.*, 2004).

1.5 Classificazione dell'impasto acido

Secondo la classificazione proposta inizialmente da Böcker *et al.*, (1995) ed integrata con De Vuyst, LB. e Neysens, P. (2005) gli impasti acidi si distinguono in tre principali macro tipologie considerando: metodologia produttiva, microflora caratteristica (Tab. 1) e come sono utilizzati nei prodotti da forno.

Tipo I: Legati alla tradizione, ottenuti attraverso uno o più rinfreschi giornalieri i continui di una madre fermentata. La popolazione microbica è mantenuta attiva applicato in media 3 volte nel raggio di 24 ore il rinfresco (acqua con farina di grano e segale o miscele delle stesse), al fine di ottenere la massa desiderata

destinata alla produzione. Per questa tipologia, ogni fase richiede uno specifico DY, temperature differenziate comprese tra i 20 e i 30°C e un appropriato tempo di fermentazione con un pH della matrice su valori di 4.0. Al termine, il *lievito naturale* è utilizzato come inoculo che, secondo Hammes (1991), può essere coltura starter contenente più biotipi.

Negli *impasti acidi* o *lieviti naturali* di tipo I si ritrova una microflora specifica appartenente alle specie *Lb. sanfranciscensis*. Inoltre possono coesistere altre specie a metabolismo eterofermentante obbligato, quali *Lb. pontis*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum* e *Lb. fructivorans*, oltre a lieviti delle specie *Candida milleri*, *Candida holmii*, *S. cerevisiae* e *S. exiguus*, responsabili principalmente della capacità lievitante. Questa categoria può essere suddivisa a sua volta in 3 classi (De Vuyst, LB. e Neysens, P., 2005):

Ia: impasto acido contenente una coltura pura, differente in relazione all'origine ambientale. Questa classe deriva da una fermentazione naturale con microflora ben adattata (tipico delle tradizionale pasta madre) il che permette di resistere all'azione dei contaminanti e garantisce una buona capacità di acidificazione degli impasti.

Ib: impasto acido tradizionale di segale o grano o di un loro mix, ottenuto applicando multipli rinfreschi con tempi di fermentazioni dalle 3 alle 48h. La natura acida della matrice è suddivisa in tre fasi: acido fresco, acido base e acido completa. La pasta madre, pienamente sviluppata, è utilizzata come inoculo nella produzione.

Ic: tipico delle regioni tropicali (es: Africa). Il processo fermentativo avviene a temperature elevate > 35° C.

Tipo II: semi-liquidi, impiegati prevalentemente per l'acidificazione degli impasti, in seguito ad un'unica fase di fermentazione della durata di 15-20 ore, alle quali segue lo stoccaggio dell'impasto per differenti giorni (Gobbetti *et al.*, 2010). La temperatura per questa tipologia è di 30°C, superiore rispetto al tipo I e

necessaria per rispettare le tempistiche industriali. Infatti, Decock e Cappelle (2005) riportano un esempio produttivo di impasto acido tipo II, dove si è in presenza di un DY di ca. 200 all'interno di fermentatori o tank industriali e all'occorrenza della produzione avviene il prelievo diretto. L'inoculo ha la funzione essenziale di acidificare l'impasto apportando determinati flavour e taste al prodotto finale. L'utilizzo di tempistiche così ridotte non favorisce lo sviluppo di lieviti endogeni, pertanto la lievitazione dell'impasto è dovuta al supplemento di lievito di birra. L'insieme delle caratteristiche elencate (temperatura, DY e tempi ridotti) caratterizza *Impasti acidi* o *lieviti naturali* con popolazioni di batteri lattici particolarmente resistenti a bassi valori di pH. In questo ambiente ritroviamo le specie: *Lb. panis*, *Lb. reuteri*, *Lb. johnsonii*, *Lb. sanfranciscensis* e *Lb. pontis* (Wiese *et al.*, 1996; Böeker *et al.*, 1995).

Tipo III: essiccati partendo dal tipo II. L'impiego anche in questo caso a livello industriale serve per garantire la costanza qualitativa verso il prodotto finito rispetto alla tipologia I di maggiore complicatezza gestionale. Per questa tipologia, la microflora di batteri lattici è selezionata verso i più termoresistenti al trattamento di essiccazione, come: *P. pentosaceus*, *Lb. plantarum* e *Lb. brevis* (Böeker *et al.*, 1995). Le tecnologie di essiccazione, "Spray Drying" e "Drum Drying", permettono di diversificare in due categorie l'impasto acido (Decock e Cappelle., 2005), dove maggiore sarà il DY e maggiore sarà il valore di acidità di quello essiccato.

La formulazione essiccata incrementa i TTA (Acidità Totale Titolabile) per effetto dell'evaporazione dell'acqua (Gobbetti *et al.*, 2010). La tecnologia "Spray Drying", allontanando l'acqua tramite essiccazione in contro corrente di aria calda, permette di ottenere, con gli opportuni accorgimenti, un prodotto con meno del 10% di umidità. Invece nel sistema "Drum Drying", il processo di essiccazione sui cilindri rotativi riscaldati con vapore e corpi raschianti, permette di far evaporare in rapidità l'acqua dall'impasto acido. Le combinazioni di tempo e temperatura del processo determinano relative evoluzioni della reazione di Maillard con conseguenze sul grado di tostatura e caramellizzazione,

incrementando le potenzialità sensoriale del *lievito naturale* nelle diverse preparazioni (Decock e Cappelle., 2005).

Per le tipologie II e III, è presente un'ulteriore varietà ottenuta stabilizzando gli stessi tramite la metodica della pastorizzazione o raffreddamento. Questi espedienti sono necessari per mantenere l'integrità dei composti volatili caratteristi dell'impasto acido fresco (Decock e Cappelle., 2005).

Tipo 0: trattasi di pre-impasti inoculati con solo il lievito e lasciati fermentare, senza rinfreschi, per 3-24 ore a temperatura ambiente. Nel mezzo possono essere isolati, fatta eccezione per il *S. cerevisiae* inoculato, *Lb. plantarum*, *Leuc. mesenteroides*, *P. pentosaceus*, *Lb. sakei*, *Lb. brevis*, *Lb. bavaricus*, microrganismi che possono contribuire allo sviluppo dell'aroma e dell'acidificazione.

	Tipo Ia	Tipo Ib	Tipo Ic	Tipo II	Tipo III
Eterofermentanti Obbligati	<i>Lb. sanfranciscensis</i>	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. brevis</i>
		<i>Lb. buchneri</i>	<i>Lb. reuteri</i>	<i>Lb. fermentum</i>	
		<i>Lb. fermentum</i>		<i>Lb. frumenti</i>	
		<i>Lb. fructivorans</i>		<i>Lb. pontis</i>	
		<i>Lb. pontis</i>		<i>Lb. panis</i>	
		<i>Lb. reuteri</i>		<i>Lb. reuteri</i>	
		<i>Lb. sanfranciscensis</i>		<i>Lb. sanfranciscensis</i>	
		<i>W. cibaria</i>		<i>W. confusa</i>	
Eterofermentanti Facoltativi		<i>Lb. alimentarius</i>			<i>Lb. plantarum</i>
		<i>Lb. casei</i>			<i>P. pentosaceus</i>
		<i>Lb. paralimentarius</i>			
		<i>Lb. plantarum</i>			

Omofermentanti Obbligati		<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. amylovorus</i>	<i>Lb. acidophilus</i>	
		<i>Lb. delbrueckii</i>		<i>Lb. delbrueckii</i>	
		<i>Lb. farciminis</i>		<i>Lb. amylovorus</i>	
		<i>Lb. mindensis</i>		<i>Lb. farciminis</i>	
				<i>Lb. johnsonii</i>	
Lieviti	<i>C. humilis</i>	<i>C. humilis</i>	<i>I. orientalis</i>	Nessun lievito	Nessun lievito
	<i>S. exiguus</i>			<i>S. cerevisiae</i>	

Tabella 1: Classificazione degli impasti acidi e indicazione della microflora caratteristica (De Vuyst, P. Neysens, 2005).

1.6 Lieviti nell'impasto acido

La grande variabilità nel numero e nel tipo di specie dipende da numerosi fattori, tra cui il grado di idratazione dell'impasto, dal tipo di cereali utilizzati e dalle temperature di lievitazione e conservazione dell'impasto. *S. cerevisiae* è la specie maggiormente isolata (o aggiunta). *C. humilis* è la specie che meglio si adatta agli impasti di tipo I, anche se i ceppi di *S. exiguus*, *C. krusei*, *Pichia norvegensis* e *Hansenula anomala* possono essere isolati in associazione con i batteri lattici (Gullo *et al.*, 2002).

La maggior parte dei lieviti utilizza gli zuccheri come fonte di energia e di carbonio. Gli zuccheri sono permeabili alla parete cellulare e l'assunzione da parte della membrana cellulare è facilitata dall'attività delle permeasi (Walsh *et al.*, 1994). La via di Emden Meyerhof Parnas (EMP; glicolisi) è il percorso generalmente usato per la conversione del glucosio a piruvato, che viene ossidato dall'acido tricarbossilico in anidride carbonica e acqua. Le principali vie metaboliche hanno tre funzioni nella cellula: (a) produzione di ATP; (b)

generazione di potere riducente sotto forma di NADH; (c) formazione di intermedi per la biosintesi del materiale cellulare (Walker, 1998).

In condizioni aerobiche è stato osservato che solo il 70% del glucosio viene convertito in piruvato attraverso la via EMP, il resto è metabolizzato attraverso la via dei pentosi fosfati che svolge un ruolo importante nella produzione di potere riducente sotto forma di NADPH, necessario per la maggior parte delle reazioni biosintetiche.

Per quanto riguarda la richiesta di azoto, i lieviti sono in grado di utilizzare una vasta gamma di fonti organiche e inorganiche di azoto per la loro crescita. I substrati di crescita sono spesso integrati con miscele complesse di aminoacidi e i lieviti sembrano preferire asparagina, glutammina, acido glutammico, serina, alanina, invece che glicina, prolina e ornitina. Tuttavia, questi microrganismi possono crescere in presenza di sali di ammonio, come NH_4NO_3 , H_4Cl , e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ come unica fonte di azoto, in quanto possiedono una serie di geni che codificano gli enzimi per la biosintesi di tutti gli aminoacidi. In tabella 1 è possibile osservare i principali lieviti isolati e adattati agli impasti acidi (Hammes *et al.*, 2005):

<i>Candida boidinii</i>	<i>Pichia subpelliculosa</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Pichia minuta var. minuta</i>
<i>Candida humilis</i>	<i>Saccharomyces bayanus</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Candida stellata</i>	<i>Saccharomyces exiguus</i>
<i>Debaromyces hansenii</i>	<i>Saccharomyces kluyveri</i>
<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Saccharomyces servazzi</i>
<i>Galactomyces geotrichum</i>	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>
<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>Saturnispora saitoi</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
<i>Pichia anomala</i>	<i>Saccharomyces inconspicuous</i>
<i>Pichia fermentans</i>	<i>Torulaspota pretoriensis</i>
<i>Pichia omeri</i>	

Tabella 2: Lieviti isolati e adattati agli impasti acidi (Hammes *et al.*, 2005).

Per aver svolto le sperimentazioni della suddetta tesi utilizzando prettamente batteri lattici per la formulazione dell' impasto acido funzionale al selenio (Se), la trattazione del microflora lievito non verrà approfondita ulteriormente.

1.7 Batteri lattici nell'impasto acido

In natura, questi microrganismi sono ampiamente diffusi nelle più diverse condizioni ambientali, fattore da imputarsi alla loro grande versatilità adattiva.

Con il termine batteri lattici (LAB) sono generalmente intesi tutti quei batteri che producono acido lattico dalla fermentazione degli zuccheri esosi. Questa definizione incompleta è rifinita se si considerano le caratteristiche distintive di questi batteri come la loro divisione in cocci o bacilli (disposti generalmente in catene di due o più elementi), Gram Positivi, non-sporigeni, anaerobi e microaerofili. Essi sono privi di catalasi, di nitrato riduttasi e di citocromo ossidasi, infatti, non possiedono una catena respiratoria e pertanto il loro metabolismo è prettamente fermentativo.

Tassonomicamente, questi generi appartengono alle famiglie di livello superiore: *Carnobacteriaceae*, *Leuconostocaceae*, *Enterococcaceae*, *Streptococcaceae* e *Lactobacillaceae*; ordine *Lactobacilles*, classe *Bacilli*, phylum *Firmicutes*, del dominio *Bacteria* (J.M.Jay *et al.*, 2005 e Gobbetti *et al.*,2010).

Grazie allo studio della biodiversità genetica, la classificazione dei batteri lattici ha subito negli ultimi anni numerose ridefinizioni. Il primo raggruppamento scientifico è stato introdotto da Orla-Jensen nel 1919, basandosi sulle caratteristiche fenotipiche dei microrganismi. Questa metodica di classificazione è stata utilizzata per i successivi quarant'anni, fino all'avvento di nuovi metodi d'indagine tassonomica, che hanno comportato profondi cambiamenti. Attualmente sono conosciuti ben tredici generi di batteri lattici, Gram-positivi (J.M.Jay *et al.*, 2005):

Cabacteriumm

Leuconostoc

Tetragenococcus

Enterococcus

Oenococcus

Vagococcus

<i>Lactococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Weissella</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Paralactobacillus</i>	
<i>Lactosphaera</i>	<i>Streptococcus</i>	

Anche Wright e Axelsoon (2012), classificano fenotipicamente i più comuni generi sulla base delle caratteristiche principali (Tabella 3):

Family	Genera	Characteristics								Type of Lactic Acid
		Shape	CO ₂ from Glucose	Growth at 10°C	Growth at 45°C	Growth in 6.5% NaCl	Growth in 18% NaCl	Growth at pH 4.4	Growth at pH 9.6	
Aerococcaceae	<i>Aerococcus</i>	Cocci (tetrads)	-	+	-	+	-	-	+	L
Carnobacteriaceae	<i>Carnobacterium</i>	Rods	-	+	-	ND	-	ND	-	L
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	Cocci	-	+	+	+	-	+	+	L
	<i>Tetragonococcus</i>	Cocci (tetrads)		+	-	+	+	-Variable	+	
	<i>Vagococcus</i>	Cocci		+	-	-	-		-	
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	Rods	Variable	Variable	Variable	Variable	-	Variable	-	D, L, DL
	<i>Pediococcus</i>	Cocci (tetrads)	-	Variable	Variable	Variable	-	+	-	L, DL
Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i>	Cocci ^a	+	+	-	Variable	-	Variable	-	D
	<i>Oenococcus</i>		+	+	-	Variable	-	Variable	-	D
	<i>Weissella</i>		+	+	-	Variable	-	Variable	-	D, DL
Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i> ^b	Cocci	-	+	-	-	-	Variable	-	L
	<i>Streptococcus</i>		-	-	Variable	-	-	-	-	L

Tabella 3: Classificazione fenotipica dei più comuni batteri lattici (adattata da Stiles, M *et al.*, 1997).

Filogeneticamente, i batteri lattici possono essere ulteriormente raggruppati sulla base dei criteri biologici molecolari, quali il sequenziamento dell'rRNA; un esempio di un albero filogenetico di batteri lattici differenziati da altri gruppi batterici nel phylum *Firmicutes* è mostrato in Figura 3 (Wright e Axelsoon., 2012):

Il genere *Lactobacillus*, conta circa 140 specie diffuse in differenti habitat e di cui la maggior parte è di importanza industriale (Singh *et al.*,2008). I LAB sono isolati in qualsiasi ambiente ricco di carboidrati, come alimenti (prodotti lattiero caseari, carni fermentate, vegetali, prodotti lievitati da forno e bevande), tratto

gastro-intestinale e genitale di uomo e animali, acque reflue etc. La specie tipo è attribuita al genere *Lb. delbrueki* (Gobbetti *et al.*, 2010).

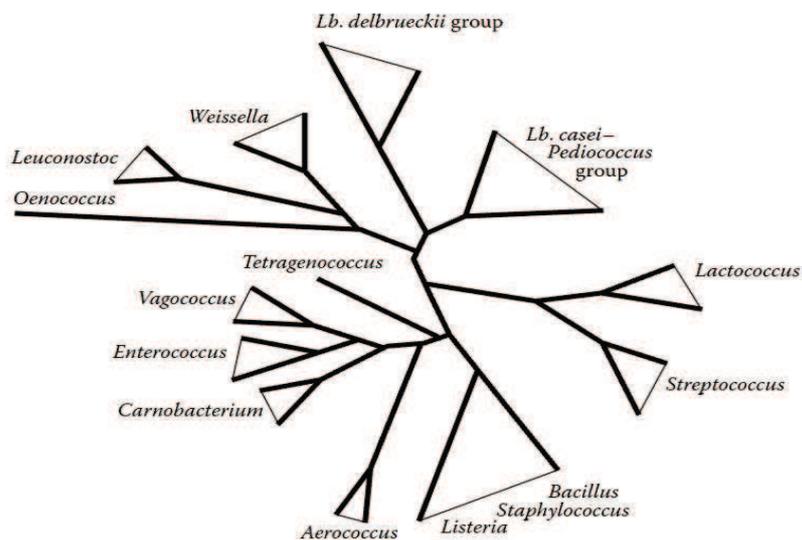


Figura 3: Albero filogenetico batteri lattici (Wright e Axelsson, 2012).

1.8 Vie metaboliche dei batteri lattici

1.8.1 Metabolismo dei carboidrati

Le reazioni biochimiche dei batteri lattici utilizzano diverse fonti energetiche e la scelta avviene secondo modalità gerarchiche determinate da meccanismi di controllo globale, principalmente regolati a livello della trascrizione (Titgemeyer e Hillen, 2002). L'utilizzo delle fonti di carboidrati solubili da parte dei batteri lattici e il loro tasso di crescita con produzione di acido acetico e lattico, sono ampiamente influenzate dalle associazioni con i lieviti autoctoni presenti, mutuandone l'utilizzo tra le due frazioni. La presenza di molteplici fonti energetiche comporta una selezione preferenziale del substrato al fine di garantire il massimo rendimento cellulare, anche se la complessità dell'ecosistema può comportare una non riproducibilità nel tempo dei risultati di fermentazione (Gobbetti *et al.*, 2010).

Nel lievito naturale ottenuto con farina di grano, il maltosio è il carboidrato

fermentescibile presente in maggior misura, seguito da saccarosio, glucosio e fruttosio e alcuni disaccaridi come maltotriosio e raffiniosio, ed è stato dimostrato da Hammes *et al.*,(1996) e Hammes & Vogel (1997) che il metabolismo dei batteri lattici essere predominante, in particolare per alcune specie autoctone come il *Lb. sanfranciscensis* e *Lb. pontis*. In riferimento a uno studio di Gobbetti *et al.*,(2000), alcuni batteri lattici tra cui il *Lb. plantarum*, hanno dimostrato una maggiore velocità di crescita, rendimento cellulare e acidificazione se coltivati in un substrato con presenza di xilosio, arabinosio o ribosio, rispetto al maltosio normalmente presente nei prodotti da forno. Altri batteri lattici nel lievito naturale dimostrano una maggiore crescita e sintesi di acido acetico quando coltivati in un terreno colturale contenente una miscela di carboidrati pentosi (Gobbetti *et al.*,1999).

L'egemonia di fermentazione dei batteri lattici nell'impasto acido è determinata da diversi fattori durante la preparazione di un impasto acido, in primis l'elevata capacità di adattamento alle principali forme di trofismo nell'impasto, come maltosio e fruttosio. La maltosio fosforilasi permette di metabolizzare il maltosio dei carboidrati pentosi, attraverso la seconda parte della via 6-PG/PK (6-fosfogluconato/fosfochetolasi) e del fruttosio utilizzato come accettore esterno di elettroni. In secondo luogo i meccanismi di crescita dei LAB sono agevolati durante le particolari condizioni di fermentazione dell'impasto acido. Inoltre possiedono diversi meccanismi di risposta agli stress per prevalere agli acidi organici, alle alte/basse temperature, alta molarità e resistenza a bassi livelli di nutrimento (De Angelis, Bini, Pallini, Cocconcelli e Gobbetti, 2001). Questi tre fattori aumentano la competitività e l'adattabilità di questi ceppi in questo coadiuvante. Infine, la produzione di composti antimicrobici (acidi organici: lattato, acetato ed altri) e composti proteici (batteriocine) esaltano la loro competitività e possono contribuire alla stabile persistenza della microflora durante i rinfreschi dell'impasto acido nel tempo (De Vuyst, LB. e Neysens, P., 2005).

Le principali vie di fermentazione dei batteri lattici, sebbene non possiedano una funzionale catena respiratoria ed ottengono energie dalla fosforilazione a livello del substrato, sono:

- **Fermentazione omolattica**: La via biochimica utilizzata è quella dell'EMP, Embden-Meyerhof-Parnas (Fig.4). Il glucosio, per opera di una glucochinasi ATP-dipendente, è trasformato in fruttosio-1,6-difosfato che a sua volta è idrolizzato in due triosi, la 3-fosfogliceraleide e il diidrossiacetonefosfato dall'enzima fruttosio-1,6-difosfoaldolasi. La successiva sequenza metabolica porta alla formazione di piruvato e di ATP mediante fosforilazione a livello del substrato. La riduzione del piruvato ad acido lattico avviene mediante l'intervento della lattato deidrogenasi-NAD dipendente, che consente di ristabilire il bilancio redox attraverso la riossidazione del NADH formato durante l'ossidazione della 3-fosfogliceraleide a 1,3-difosfoglicerato. Da una molecola di esoso sono prodotte due molecole di acido lattico.
- **Fermentazione eterolattica**: L'ingresso del maltosio all'interno della cellula è veicolato da un sistema di trasporto secondario (simporto maltosio- H^+) ed è diretto da una forza proton motrice (Neubauer *et al.*, 1994). In generale, il *Lb. sanfranciscensis* idrolizza maltosio e accumula glucosio nell'ambiente, secondo un rapporto molare 1:1 (Gobbetti *et al.*, 1994a; Stolz *et al.*, 1993). Nei LAB eterofermentanti facoltativi, come il *Lb. plantarum*, la presenza di carboidrati pentosi attiva la via biochimica della 6-fosfogluconato/fosfochetolasi o 6-PG/PK (Fig.5).

Il glucosio dopo fosforilazione è ossidato a 6-fosfogluconato che a sua volta è decarbossilato a ribulosio 5-fosfato. Quest'ultimo, dopo epimerasi, è trasformato in xilulosio 5-fosfato e successivamente scisso dalla fosfochetolasi in gliceraleide 3-fosfato e acetil fosfato. La gliceraleide 3-fosfato è metabolizzata ad acido lattico secondo la normale via glicolitica precedentemente descritta, mentre l'acetil fosfato è ridotto ad acetato o etanolo. Teoricamente, la fermentazione omolattica produce 2 moli di ATP per mole di glucosio consumato. Nella fermentazione eterolattica questo rapporto è di 1 sola mole di ATP se

l'acetil fosfato del carbonio è ridotto ad etanolo. In uno studio, proposto da Stolz *et al.*, (1993), è stato osservato che il rendimento cellulare di *Lb. sanfranciscensis* aumenta di 1.5-1.7 volte quando nelle reazioni sono utilizzati contenuti di maltosio al posto del glucosio. L'attività della maltosio fosforilasi non richiede un dispendio energetico e il *Lb. sanfranciscensis* procede attraverso questa reazione rilasciando nell'ambiente glucosio fino ad eventuale esaurimento (Salovaara, 1998).

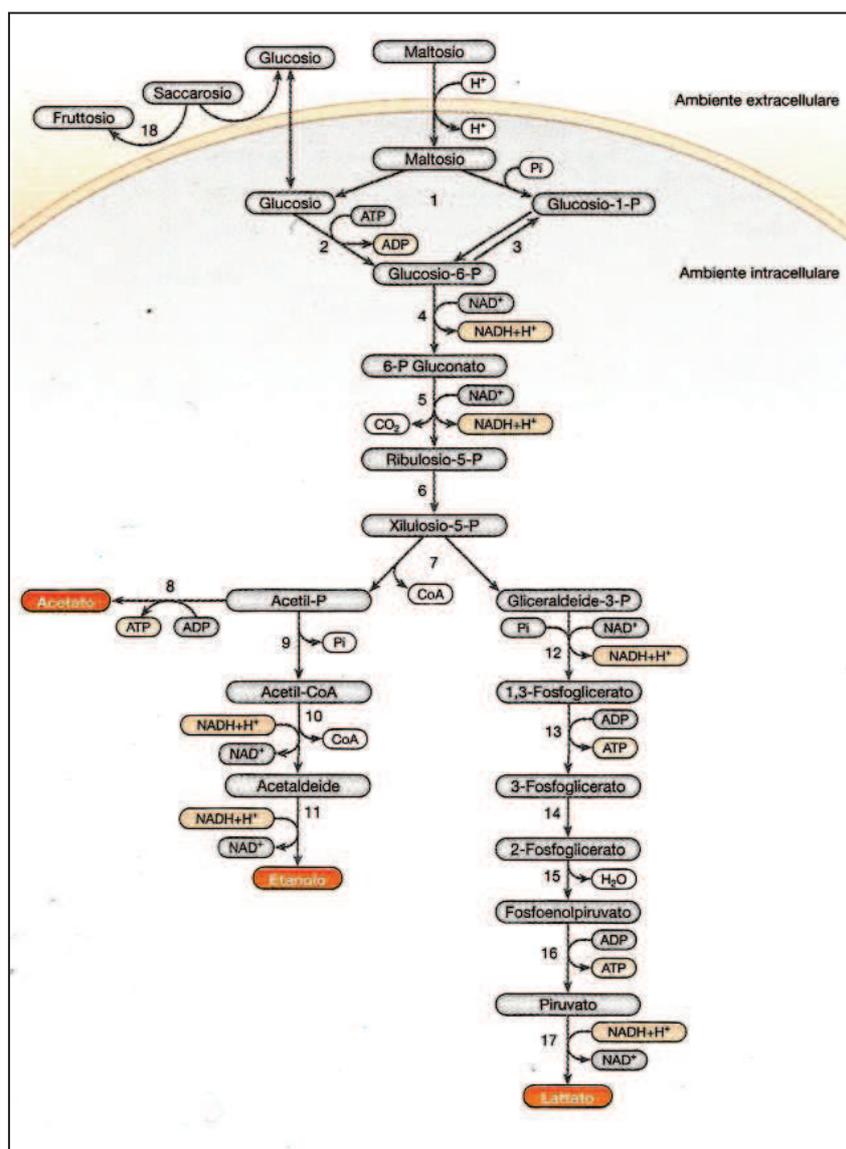


Figura 4: Schema EMP, (Gobetti e Corsetti, 2010). Biotecnologie dei prodotti lievitati da forno. In figura, (2) indica la formazione di 2 moli di ciascun composto. In figura: 1, glucochinasi, 2, glucosio-fosfato isomerasi, 3, fosfo-frutto chinasi, 4, fruttosio-1,6-difosfato aldolasi, 5, trioso-fosfato isomerasi, 6, gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, 7, 3-fosfoglicerato chinasi, 8, fosfoglicerato mutasi, 9, enolasi, 10, piruvato chinasi, 11, lattato deidrogenasi.

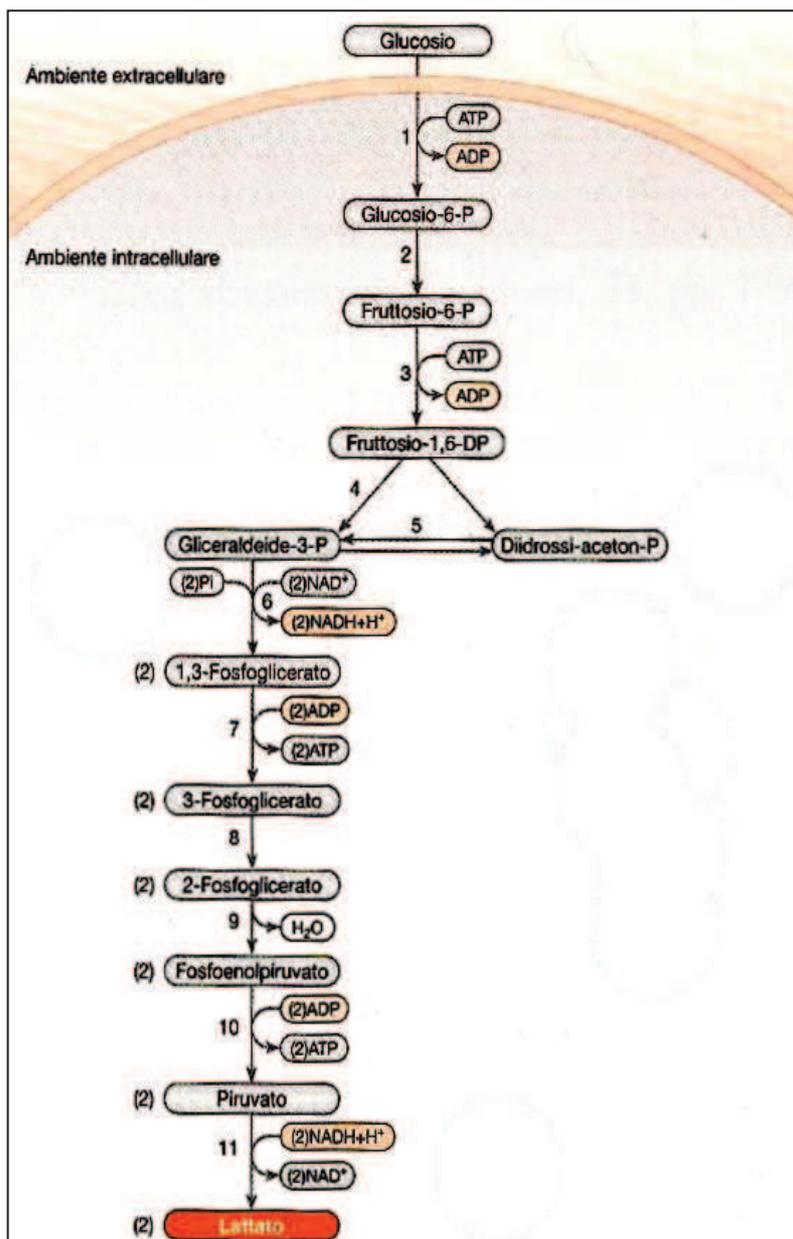


Figura 5: Schema 6-PG/PK in *Lb. Sanfarniscensis*, (Gobetti e Corsetti, 2010) Biotecnologie dei prodotti lievitati da forno. In figura: 1, maltosio fosforilasi, 2, esochinasi, 3, fosfo-glucomutasi, 4, glucosio-6-fosfato deidrogenasi; 5, 6-fosfogluconato decarbossilasi, 6, epimerasi, 7, fosfochetolasi, 8, acetato chinasi, 9, fosfotransacetilasi, 10, acetaldeide deidrogenasi, 11, alcool deidrogenasi, 12, gliceraleide-3-fosfato deidrogenasi, 13, 3-fosfoglicerato chinasi, 14, fosfoglicerato mutasi, 15, enolasi, 16, piruvato chinasi, 17, lattato deidrogenasi, 18, fruttosil-transferasi.

Teoricamente, la fermentazione omolattica produce 2 moli di ATP per mole di glucosio consumato. Nella fermentazione eterolattica questo rapporto è di 1 sola mole di ATP se l'acetil fosfato del carbonio è ridotto ad etanolo. In uno studio,

proposto da Stolz *et al.*, (1993), è stato osservato che il rendimento cellulare di *Lb. sanfranciscensis* aumenta di 1.5-1.7 volte quando nelle reazioni sono utilizzati contenuti di maltosio al posto del glucosio. L'attività della maltosio fosforilasi non richiede un dispendio energetico e il *Lb. sanfranciscensis* procede attraverso questa reazione rilasciando nell'ambiente glucosio fino ad eventuale esaurimento (Salovaara, 1998).

Sulla base del metabolismo fermentativo, per i batteri lattici in generale, ma in particolare modo per i LAB, si definiscono tre tipologie di metabolismo glucidico (Tabella 4):

- Gruppo I: Omofermentante obbligato. Fermentano i carboidrati esosi producendo esclusivamente acido lattico attraverso la via glicolitica EMP (Embden-Meyerhof-Parnas). Non sono in grado di fermentare i pentosi e non producono gas.
- Gruppo II: Eterofermentante facoltativo. Fermentano gli esosi mediante la via metabolica EMP producendo acido lattico. Sono in grado di catabolizzare i pentosi e spesso anche il gluconato attraverso la via del 6-PG/PK (6-fosfogluconato/fosfochetolasi).
- Gruppo III: Eterofermentante obbligato. Fermentano gli esosi e i pentosi mediante la via del 6-PG/PK con produzione di acido lattico, anidride carbonica, acido acetico e/o alcol etilico, in quantità equimolari per ogni mole di carboidrato fermentato.

Batteri lattici con metabolismo eterofermentante facoltativo (ad esempio, *LB. plantarum* e *LB. alimentarius*) o obbligato (per esempio, *Lb. sanfranciscensis* e *LB. Pontis*) utilizzano, rispettivamente, la Embden-Meyerhof-Parnas e le vie della fosfogluconato chetolasi per la fermentazione degli esosi comunemente presenti nelle paste madri.

Oltre a questi principali percorsi energetici, le risposte fenotipiche a basse e variabili condizioni trofiche condizionano il comportamento nell'uso degli accettori esterni di elettroni verso un uso gerarchico e/o simultaneo di varie fonti

di energia, spesso accoppiate con sistemi inducibili di assorbimento, e/o a delle interazioni con gli enzimi endogeni ed esogeni (Vogel *et al.*,1999). Durante il percorso della fosfogluconato chetolasi, le energie supplementari possono essere generate dalle attività dell'acetato chinasi che, in presenza di accettori di elettroni, permette il riciclo di NAD⁺ senza la necessaria formazione di etanolo. Le co-fermentazioni sono metabolismi alternativi che consentono ai batteri lattici della pasta madre di usare i substrati non fermentabili, aumentando così la loro capacità di adattamento. Un co-metabolismo del citrato e del maltosio o glucosio è stato osservato in *Lb. sanfranciscensis* (Gobbetti e Corsetti, 1996). La formazione di piruvato e lattato può anche derivare dall'uso obbligato di una serie di non convenzionale di substrati, quali gli aminoacidi.

Eterofermentante Obbligato	Eterofermentante Facoltativo	Omofermentante Obbligato
<i>Lb. acidifarinae</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. amylovorus</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. pentosus</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
<i>Lb. buchneri</i>	<i>Lb. alimentarius</i>	<i>Lb. delbrueckii subsp. Delbrueckii</i>
<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. paralimentarius</i>	<i>Lb. farciminis</i>
<i>Lb. fructivorans</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. mindensis</i>
<i>Lb. frumenti</i>		<i>Lb. crispatus</i>
<i>Lb. hilgardii</i>		<i>Lb. johnsonii</i>
<i>Lb. panis</i>		<i>Lb. amylolyticus</i>
<i>Lb. pontis</i>		
<i>Lb. reuteri</i>		
<i>Lb. rossiae</i>		
<i>Lb. sanfranciscensis</i>		
<i>Lb. siliginis</i>		
<i>Lb. spicheri</i>		
<i>Lb. zymae</i>		

Tabella 4: LAB generalmente associati alla fermentazione con lievito naturale (Corsetti, 2007).

1.8.2 Utilizzo di accettori esterni di elettroni

La fermentazione attraverso la 6-PG/PK, consente la sintesi energetica aggiuntiva mediante l'attivazione dell'acetato chinasi. Il riciclo nel NAD⁺ è consentito grazie alla presenza di accettori esterni di elettroni (fruttosio, aldeidi, glutazione ossidato e ossigeno), senza l'obbligo di procedere alla sintesi di etanolo.

La maggior parte dei biotipi di *Lb. sanfranciscensis* non sono in grado di fermentare il fruttosio, ma possono impiegarlo come accettore esterno di elettroni mediante riduzione a mannitolo (Korakli e Vogel, 2003). Una volta sintetizzato, il mannitolo può essere successivamente utilizzato come fonte energetica da alcuni biotipi di *Lb. plantarum*: questo è possibile in condizioni di anaerobiosi e in presenza di chetoacidi, come il piruvato, utilizzati come accettori finali di elettroni (Liu S.Q, 2003). L'uso prediletto del fruttosio come accettore esterno di elettroni è osservato in molti batteri lattici eterofermentativi (Stolz *et al.*, 1995b; von Weymarn *et al.*, 2002). Quando nel lievito naturale sono associati batteri lattici maltosio-negativi e maltosio-positivi, il fruttosio può svolgere una differente funzione (Gobbetti, 1998).

Il glucosio accumulato nell'ambiente dalla maltosio fosforilasi diviene così disponibile per i batteri lattici maltosio-negativi. Tuttavia, l'accumulo di glucosio nell'ambiente ha luogo solo se non è indotta l'attività dell'enzima esochinasi (Neubauer *et al.*, 1994). De Vuyst *et al.*, (2002) ha osservato che alcuni biotipi di *Lb. sanfranciscensis* non producono glucosio se coltivati in presenza di maltosio e fruttosio, ipotizzando che il glucosio una volta liberato sia immediatamente convertito dall'attività dell'enzima esochinasi, a sua volta indotta dalla presenza di fruttosio.

La rilevanza pratica dell'uso di accettori esterni di elettroni è rappresentata da una modificazione del quoziente di fermentazione (rapporto acido lattico e acetico) che influenza positivamente le caratteristiche sensoriali e conservative dei prodotti da forno (Gobbetti *et al.*, 1998). L'utilizzazione degli accettori di elettroni permette la produzione di acetato dalla acetilfosfato alla sintesi di un addizionale ATP (Gänzle *et al.*, 2007). L'ossigeno può essere utilizzato dal *Lb. sanfranciscensis* come un accettore esterno di elettroni nelle reazioni di ossidazione (Stolz *et al.*, 1995a) ma *Lb. reuteri*, *Lb. pontis* e *Lb. fermentum* non utilizzano l'ossigeno e sono inibiti da condizioni aerobiche di sviluppo (Stolz *et al.*, 1995b) (Fig. 6).

Recentemente sono state caratterizzate su livelli biochimici delle mannitolo deidrogenasi e NADH ossidasi da *Lb. sanfranciscensis*, mentre altre aldoso-reduttasi microbiche sono state riconosciute per l'ampio spettro verso zuccheri

esosi e pentosi. Nuovi substrati per la rigenerazione di cofattori ad opera del *Lb. sanfranciscensis* sono stati osservati da Gänzle *et al.*, (2007) (Fig.6).

Un'alcol deidrogenasi R-specifica (SC-ADH) utilizza un ampio spettro di aldeidi a corta catena, aspetto caratterizzato in *Lb. brevis* (Niefind *et al.*, 2003).

La riduzione del glutazione ossidato (GSSG) a glutazione ridotto (GSH) ad opera della glutazione deidrogenasi potrebbe essere collegata all'incremento della produzione di acetato da parte di batteri lattici, nello specifico da *Lb. sanfranciscensis* (Vermeulen *et al.*, 2006a). GSSG, GSH e proteine legate ai glutationi sono presenti a livelli molecolari negli impasti di grano e svolgono un importante ruolo nell'ossidazione dei legami incrociati tra le proteine del glutine (Grosch and Wieser, 1999).

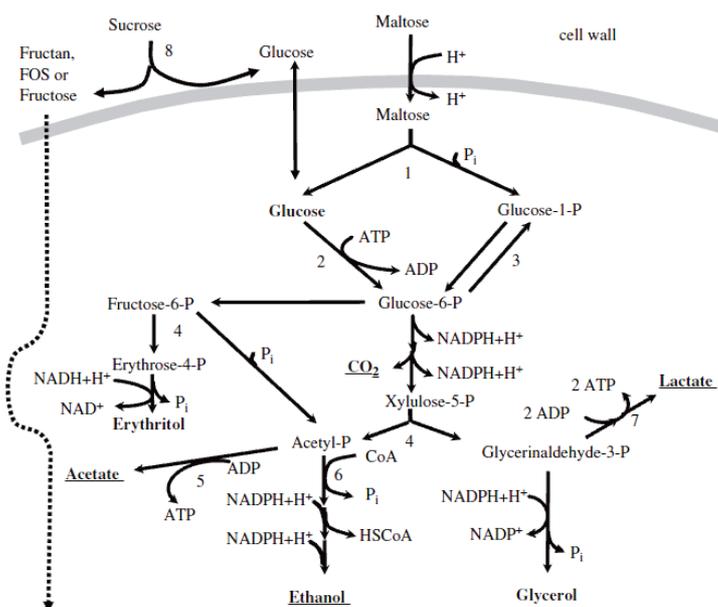


Figura 6: Metabolismo dei carboidrati di *Lb. sanfranciscensis* (Ganzle M.G. *et al.*, 2007).

Di conseguenza, la riduzione del glutazione ha un profondo impatto sui legami del glutine. L'azione del *Lb. sanfranciscensis* incrementa la concentrazione dei composti tiolici a basso peso molecolare negli impasti oltre ai gruppi tiolici delle proteine del glutine (Vermeulen *et al.*, 2006a).

Le farine di cereali detengono un'intrinseca attività della glutazione deidrogenasi, tuttavia, la disponibilità dei cofattori negli impasti del grano favorisce l'ossidazione del glutazione piuttosto che la riduzione (Grosch and Wieser, 1999). Al contrario, metabolismi batterici attraverso la via dei pentoso-fosfati forniscono un'ampia offerta di cofattori ridotti che sposta l'equilibrio verso la formazione del glutazione ridotto (Vermeulen *et al.*, 2006a) (Fig.7).

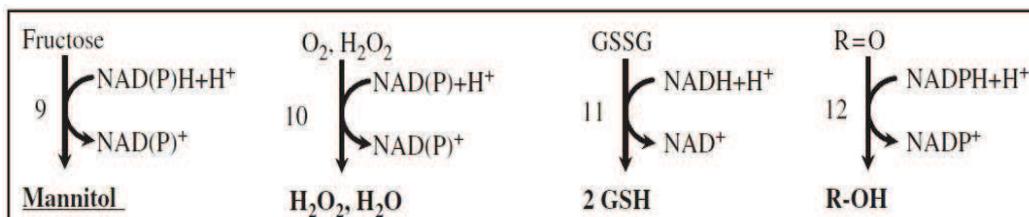


Figura 7: Rigenerazione dei cofattori ridotti (Ganzle M.G. *et al.*, 2007).

1.8.3 Metabolismo degli acidi organici

La reazione iniziale dell'acido citrico nei batteri lattici è rappresentata dal trasporto del citrato mediante permeasi e dalla reazione della citratoliasi (Gobbetti, 2010) (Fig.8). Sono possibili due destinazioni alternative per la conversione dell'ossalacetato prodotto; una conduce alla sintesi di acido succinico e l'altra alla decarbossilazione a piruvato (Ferain *et al.*, 1996). Sebbene la conversione dell'acido citrico in succinato appaia la via più comune nei LAB, la sintesi di diacetile è stata osservata in impasti fermentati con *Lb. plantarum*, *Lb. farciminis* e *Lb. acidophilus* (Damiani *et al.*, 1996).

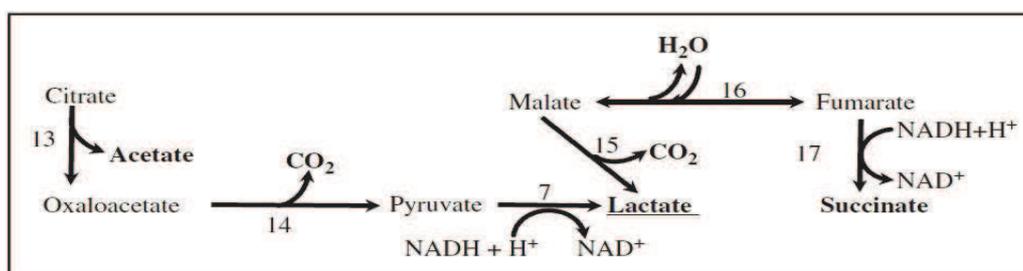


Figura 8: Metabolismo degli acidi organici (Ganzle M.G. *et al.*, 2007).

Il *Lb. sanfranciscensis* usa la branca del piruvato per convertire l'acido citrico in acido lattico ed acetico (Stolz *et al.*, 1995; Gobbetti e Corsetti, 1996). Inoltre sia l'acido malico che l'acido fumarico sono convertiti in acido lattico dal *Lb. sanfranciscensis* (Gobbetti, 2010). La sintesi dell'acido lattico da acido citrico non causa un decremento del pH e, pertanto, la crescita di *Lb. sanfranciscensis* durante la fermentazione dell'impasto non è limitata dal decremento del pH (Hammes, W.P. e Gänzle, M.G., 1998). L'uso di acido citrico durante la fermentazione dell'impasto può comportare un incremento delle concentrazioni di acido lattico ed acetico (Gobbetti *et al.*, 2010).

1.8.4 Metabolismo delle sostanze azotate

I batteri lattici sono caratterizzati da auxotrofia multipla per quanto concerne gli amminoacidi (Calderon *et al.*, 2003) e contano un attivo sistema proteolitico per soddisfare le loro esigenze nutrizionali (Kunji, Mierau, Hagting, Poolman, & Konings, 1996). Per soddisfare le proprie esigenze azotate, i batteri lattici dipendono dall'attività del sistema proteolitico (Kunji *et al.*, 1996). I componenti di questo sistema sono una serina-proteinasi associata alla parete cellulare (Cell-Envelope-associated Proteinase, CEP-PrpP), dei sistemi di trasporto specifici per di/tri-peptidi e oligopeptidi (> 3 residui amminoacidici) e un ampio numero di peptidasi intracellulari (Guèdon *et al.*, 2001) (Fig.9).

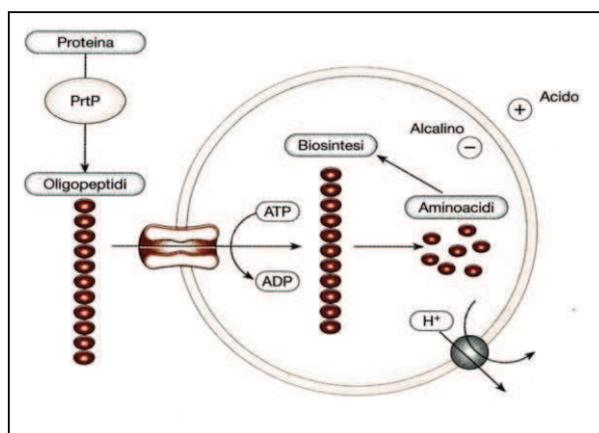


Figura 9. Il sistema proteolitico dei batteri lattici (adatta da Kunji *et al.*, 1996). PrtP: Cell-envelope-associated proteinasi (CEP).

Durante la fermentazione dell'impasto acido, si osserva un lineare incremento nel livello di amminoacidi liberi (Collar, Mascaros, & Benedito de Barber, 1992; Gobbetti *et al.*, 1994; Spicher&Nierle, 1988). La degradazione delle proteine dei cereali è di fondamentale importanza per le caratteristiche reologiche e sensoriali dei prodotti da forno, ed è generalmente osservato che una limitata estensione delle proteolisi durante la fermentazione dell'impasto acido migliora in modo positivo le qualità sensoriali senza effetti avversi su texture e volume del prodotto finito (Thiele *et al.*, 2002).

Il processo di acidificazione operato dai batteri lattici del lievito naturale favorisce l'attivazione dell'aspartato-proteinasi dei cereali, la quale ha una attività ottimale nell'intervallo di pH compreso tra 3,0 e 4,5 (Gänzle *et al.*, 2008). Una volta liberati, gli oligopeptidi di dimensioni intermedie (4-40 amminoacidi), sono trasportati all'interno della cellula batterica e degradati mediante il sistema di differenti peptidasi intracellulari (Gänzle *et al.*, 2008). La capacità di idrolizzare polipeptidi con elevato contenuto di prolina sembra essere una caratteristica dei LAB del lievito naturale (Gobbetti, 2010). L'idrolisi dei peptidi da parte dei batteri lattici è strettamente legata al ceppo e le principali manifestazioni proteolitiche che avvengono durante la fermentazione in impasto acido sono raffigurate nelle figure 10 e 11.

Negli ecosistemi complessi, la sintesi di acido piruvico e acido lattico può derivare dal catabolismo di substrati non convenzionali, come gli amminoacidi (Gobbetti, 2010). Glutenine e gliadine sono idrolizzate in oligopeptidi che rimangono prevalentemente alcoli solubili (Wieser *et al.*, 2007). La parziale idrolisi delle glutenine durante la fermentazione mediante lievito naturale determina una depolimerizzazione e solubilizzazione del macropolimero di glutenine (GMP), con conseguente effetto sulle proprietà viscoelastiche dell'impasto.

I peptidi e gli amminoacidi rappresentano i substrati per le conversioni microbiche, o sono prevalentemente trasformati in composti volatili responsabili dell'aroma sia durante la fermentazione che nella cottura (Tab.5).

Leucina	3-metilbutanolo
Isoleucina	2-metilbutanolo
Valina	2-metilpropionale
Alanina	Acetaldeide
Metionina	Metionale
Fenilalanina	Fenilacetaldeide
Treonina	2-idrossipropionale

Tabella 5: Amminoacidi precursori e composti carbonilici derivati durante il processo di fermentazione e/o cottura dei lieviti da forno (Gobbetti, 2010).

La fermentazione di un impasto mediante biotipi selezionati di LAB è caratterizzata da una concentrazione di amminoacidi liberi notevolmente superiore rispetto a quella di un impasto acidificato chimicamente (Di Cagno *et al.*, 2002). L'uso del lievito naturale nella produzione di prodotti da forno richiede un limitato livello di proteolisi per prevenire l'eccessiva degradazione del glutine ma sufficiente a liberare una considerevole quantità di amminoacidi come precursori dei composti volatili.

1.8.5 Catabolismo degli amminoacidi

Gli amminoacidi liberati dalla proteolisi sono coinvolti in buona parte nelle reazioni chimiche del processo di cottura, la restante parte è adoperata nel processo di catabolismo degli amminoacidi ad opera dei batteri lattici del lievito naturale. Le implicazioni riguardano le caratteristiche sensoriali dei prodotti da forno e la capacità di incrementare il rendimento energetico cellulare in condizioni limitate di nutrienti (Christensen *et al.*, 1999).

Le reazioni cataboliche di deaminazione, decarbossilazione, transaminazione e modifiche della catena laterale degli amminoacidi conducono alla sintesi di chetoacidi, aldeidi, acidi e alcoli essenziali per l'aroma dei prodotti da forno (Kieronczyk *et al.*, 2001) (tab.5). In particolare, il diacetile e altri composti carbonilici sono prevalentemente sintetizzati da batteri lattici omofermentanti,

mentre etil-acetato e alcoli sono sintetizzati dagli eterofermentanti (Damiani *et al.*,1996).

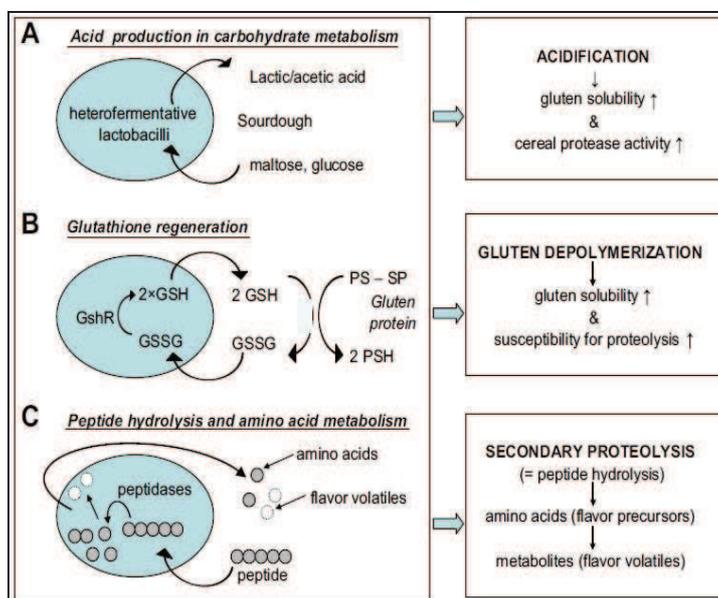


Figura 10: Contributo dei LAB alla proteolisi nell'impasto acido. A: Acidificazione ad opera di LAB eterofermentanti, B: Accumulo dei tioli attraverso la glutazione reduttasi e rilascio degli enzimi tiolo attivi, C: Accumuli di amminoacidi da peptidi (Ganzle M.G. *et al.*,2008).

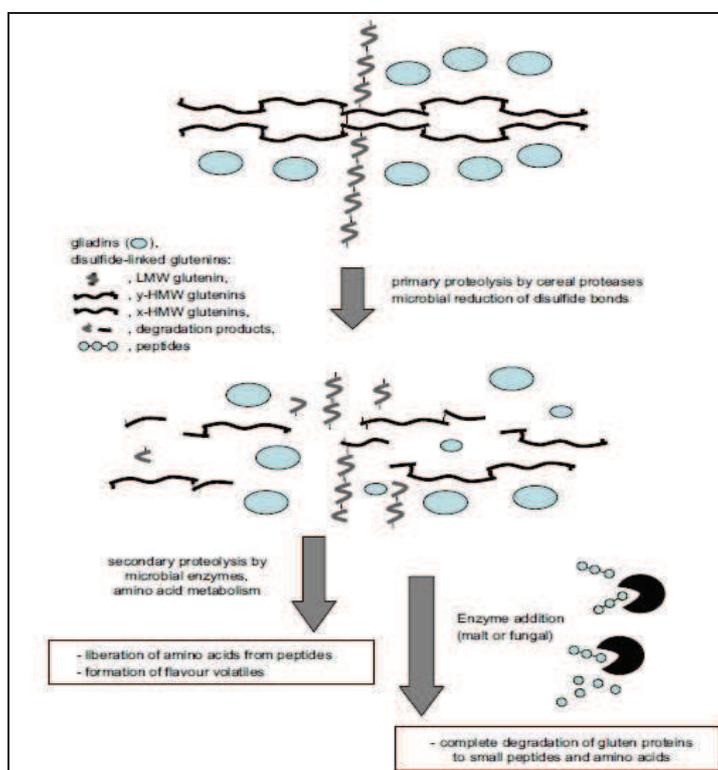


Figura 11: Eventi proteolitici durante la fermentazione (Ganzle M.G. *et al.*, 2008).

1.8.6 Metabolismo lipidico

I lipidi svolgono un ruolo importante nella definizione della qualità nei prodotti da forno, anche se sono la componente minoritaria presente nei cereali. Durante la fase di stoccaggio gli acidi grassi insaturi sono soggetti ad autossidazione, mentre durante la fase di impastamento essi sono ulteriormente ossidati dalle lipossigenasi (Laignelet, 1984). L'ossidazione dei lipidi comporta la formazione di composti chiave per l'aroma dei prodotti da forno, come (E)-2-nonanale e altre aldeidi (Hansen, 2005) che determinano sentori aromatici di "grasso", "metallico" e "erbaceo" nei pani prodotti. La concentrazione di questi composti è significativamente ridotta nella fermentazione con lievito naturale (Czerny, 2002). L'attività alcol-deidrogenasica (SC-ADH) dei LAB contribuisce a questa diminuzione (Gänzle *et al.*, 2007). I batteri lattici omofermentanti non sono in grado di metabolizzare le aldeidi insature (Vermeulen *et al.*, 2007b).

1.8.7 Produzione di EPS

Le EPS (esopolisaccaridi) sono dei polisaccaridi secreti dai microrganismi, e l'ammontare di questi composti e la loro struttura dipende dai microrganismi coinvolti e dai substrati carbonilici disponibili (Korakli *et al.*, 2001). I *Lattobacilli* associati alle fermentazioni dei cereali producono una larga varietà strutturale delle EPS e oligosaccaridi attraverso l'attività della glucosiltransferasi (Rupesh S. e Shraddha R, 2011). Prodotti durante la fermentazione dell'impasto acido, questi naturali componenti possono essere utilizzati per rimpiazzo degli idrocolloidi. Due classi di EPS ottenuti dai batteri lattici possono essere distinte, quelli sintetizzati dagli omopolisaccarisi e dagli eteropolisaccaridi (HePS) con irregolari unità ripetute. Ai LAB dell'impasto acido sono state attribuite le capacità di produrre glucani (reuterano, dextrano e mutano) oltre ai fruttani (levano e inulina), aspetti molecolari ed applicativi descritti da van Hijum *et al.*, (2006). Gli EPS prodotti dai batteri lattici nell'impasto acido trovano un'applicazione nella formulazione di prodotti da forno in quanto esaltano la reologia degli impasti ottenendo maggiori qualità nella texture del pane. Tutt'al più l'uso dei fruttani per

l'ottenimento degli EPS derivati consente la produzione di frutto oligosaccaridi prebiotici stimolando lo sviluppo del microbiota intestinale (Dal Bello *et al.*, 2001). Le applicazioni di quest'ultime possono attualmente limitarsi alle culture starter per i prodotti lattiero caseari per migliorare la texture di yogurt e altri prodotti del settore (Law e Marshal, 2001).

1.9 Indicatori qualitativi dell'impasto acido

Le proprietà tecnologiche attraverso le quali è possibile descrivere e caratterizzare qualitativamente l'impasto acido sono di natura microbiologica e chimico-fisica. Stimando analiticamente valori indiretti, si valuta principalmente l'attività della microflora presente nell'impasto acido, dominio di singoli batteri lattici o di consorzi tra batteri lattici (omo ed eterofermentanti) e lieviti. Le proprietà tecnico-qualitative di maggior importanza sono:

- **Consistenza:**
 - Rendimento dell'impasto (Doudg Yield, DY);
- **Temperatura di fermentazione**
- **Coltura/e Starter/s**
- **Ossigenazione**
- **Substrato:**
 - Contenuto in ceneri
 - Acidità titolabile totale (Total Titrable Acidity, TTA)
 - Indice di caduta di Hagberg (Falling Number)
 - pH
 - Rapporto molare Acido Lattico/Acido Acetico (Quoziente di fermentazione, QF)

Questi indicatori variano in relazione alla tipologia di impasto acido, nazione di produzione e addirittura dal contesto regionale (De Vuyst, LB. e Neysens, P., 2005).

Consistenza:

Rendimento dell'impasto: è un rapporto tra le quantità di acqua e farina (grano o semola) nella miscela, considerando le capacità della farina o della miscela di assorbire l'acqua. Costituisce un indicatore della consistenza dell'impasto acido. La proporzione è la seguente in formula, (Decock e Cappelle, 2005):

$$DY = \frac{(\text{Peso della farina} + \text{Peso dell'acqua}) \times 100}{\text{Peso della Farina}}$$

Per garantire una maggiore veridicità al valore di DY è necessario considerare al numeratore eventuali ingredienti aggiunti all'impasto acido, in tale evenienza la formula dell'impasto diventa semplicemente (Gobbetti *et al.*,2010):

$$DY = \frac{(\text{Peso dell'impasto}) \times 100}{\text{Peso della Farina}}$$

Impasto acido con valori di DY nell'ordine di 150 sono considerati compatti, mentre se si sale su valori di 200 otteniamo un impasto liquido (Decock e Cappelle, 2005). Le interazioni endogene ed esogene durante la fermentazione sono enfatizzate o meno dalla natura compatta o liquida dell'impasto acido, con conseguenze sul profilo aromatico, soprattutto fra acido acetico e acido lattico (Decock e Cappelle, 2005). Come riporta Gobbetti *et al.*,(2010), " bassi valori di DY e di temperatura (es. 25-30 °C) determinano una maggiore produzione di acido acetico. Al contrario, elevati valori di DY, caratteristici di impasti più soffici, in combinazione con temperature più elevate (ca. 35-37 °C), favoriscono una acidificazione essenzialmente lattica, a causa del più rapido sviluppo di batteri lattici omofermentanti dotati di una maggiore capacità di acidificazione".

Temperatura di fermentazione:

Influenza direttamente il tasso di acidificazione dell'impasto acido in relazione al suo DY. Ovviamente, le fasi connesse al regime di temperatura condizionano la natura della microflora. Incongruenze nel rispetto dei tempi e

temperature determinano una perdita della microflora nei rinfreschi ripetuti (Decock e Cappelle, 2005).

Coltura/e Starter/s:

La microflora è costituita, di solito, da stabili associazioni tra LAB e lieviti con mutuo interesse nello sviluppo rispettando, nel consorzio, temperatura, pH e acidi organici. Il trofismo di Batteri lattici e lieviti considerando le condizioni ambientali ne condiziona la competizione verso i substrati disponibili con conseguenti eterogeneità della popolazione sopravvissuta (De Vuyst, LB. e Neysens, P., 2005). Per quel che riguarda i batteri lattici le due principali classi, Omofermentanti ed Eterofermentanti, si distinguono nel rapporto molare di acido lattico ed acetico prodotto, caratterizzati rispettivamente per la capacità acidificante e quella aromatizzante (Decock e Cappelle, 2005).

Ossigenazione:

La concentrazione di ossigeno nell'impasto è la conseguenza delle operazioni unitarie di miscelazione e impastamento; normalmente la pressione parziale di O₂ si riduce velocemente nelle prime 2-3 ore della maturazione dell'impasto, in conseguenza del consumo dell'ossigeno soprattutto da parte dei lieviti. La presenza dell'ossigeno condiziona i prodotti finali del metabolismo dei batteri lattici eterofermentanti facoltativi; in condizioni di anaerobiosi essi producono CO₂, acido lattico ed etanolo, mentre in presenza di ossigeno il metabolismo si sposta verso la formazione di acido acetico. Inoltre quando l'ossigeno termina è utilizzato il fruttosio come accettore di elettroni con produzione di mannitolo.

Substrato:

Contenuto in ceneri: direttamente connesso al tasso di estrazione nella raffinazione dei cereali grezzi. Maggiore è il tasso di macinazione e maggiore è il contenuto delle ceneri. La crusca, contenente minerali e micronutrienti, è la parte che più utile allo sviluppo della microflora. Le ceneri determinano una capacità tampone nell'impasto acido (Decock e Cappelle, 2005).

Acidità titolabile totale (Total Titrable Acidity, TTA): collegato alla capacità tampone, il contenuto di acidi totali prodotti durante la fermentazione è determinato con la titolazione di 10g di impasto acido (diluiti con 90g di acqua distillata) utilizzando una soluzione 0,1N NaOH al raggiungimento di un valore di pH di 8,4 (Decock e Cappelle, 2005 e Gobbetti *et al.*, 2010).

L'indice di caduta di Hagberg o Falling Number: indica il livello di enzima (α -amilasi) nella farina, più basso è il valore e maggiore è l'attività delle α -amilasi e più zuccheri liberi sono disponibili per la microflora (Decock e Cappelle, 2005).

pH: È il logaritmo dell'inverso della concentrazione di ioni idrogeno in una soluzione. Essa fornisce un'indicazione dell'attività di questi ioni sui comportamenti dell'ambiente; inoltre influisce sulle reazioni chimiche e biochimiche e di conseguenza sui microrganismi.

Quoziente di fermentazione, QF: Rapporto molare tra acido lattico e acetico, secondo la formula:

$$QF = \frac{g \text{ Acido Lattico su } 100g \text{ di impasto} : p.m. \text{ Acido Lattico}}{g \text{ Acido Acetico su } 100 g \text{ di impasto} : p.m. \text{ Acido Acetico}}$$

Il range considerato ottimale, secondo Onno e Roussel., (1994), è compreso tra 1,5 e 4,0.

1.10 Tecnologie produttive dell'impasto acido

Le preparazioni del lievito naturale seguono diverse procedure che si differenziano per tecnologia e condizioni fermentative, ingredienti e numero di rinfreschi. Tutte queste metodiche possono scaturire da modalità operative più o meno empiriche fino a modalità operative più o meno codificate e validate sul fronte scientifico. In ogni caso lo scopo del processo sarà quello di disporre di un agente lievitante naturale in grado di produrre una quantità sufficiente di CO₂ e,

contemporaneamente, una adeguata acidificazione, requisito indispensabile per la produzione di pane di segale o frumento conferendogli caratteristiche di pregio (Hammes *et al.*, 2005).

In passato Foschino e Galli (1997) da un punto di vista microbiologico osservando le differenze della microflora (lieviti e LAB) presente nel lievito naturale, suddivise gli impasti acidi in due tipologie: ad associazione labile e ad associazione stabile.

L'impasto ad associazione labile si allestisce per acidificazione spontanea di una miscela di acqua e farina lasciata a temperatura ambiente durante la sosta notturna, oppure innestata con una "madre" acida non mantenuta in condizioni rigorose di maturazione. In questo caso la microflora che si seleziona è molto variabile, soprattutto nelle prime ore del riposo quando le condizioni ambientali non sono ancora così restrittive da selezionare un gruppo microbico piuttosto che un altro. L'impasto ad associazione stabile, è un impasto in cui vive e si sviluppa una microflora caratteristica costituita unicamente da LAB eterofermentanti, generalmente *Lb. sanfranciscensis*, e da un blastomicete, solitamente *Saccharomyces exiguus* o la sua forma asessuata *Candida holmii* oppure *Candida humilis* un tempo definita *Candida milleri*. Questa forma di impasto è definito comunemente "madre". A causa della composizione microbica complessa della pasta madre, la necessità di una accurata selezione dei ceppi utilizzati come starter rappresenta l'applicazione delle moderne tecnologie le quali sono in grado di migliorare le prestazioni microbiche, obiettivi fondamentali per le industrie panificatorie che per la produzione di prodotti da forno naturali richiedono consistenze e sapori particolari, lunghe shelf-life e rispetto dei criteri di sicurezza.

1.10.1 Impasti acidi a più stadi

Questa tecnica, diffusa prevalentemente in Germania e nel Nord Europa, prevede la preparazione dell'impasto acido attraverso diversi stadi di fermentazione. Per ciascuno di essi l'impasto subisce un rinfresco e viene attivato aggiungendo farina ed acqua di modo che venga aumentato il pH e vengano forniti nutrienti alla microflora.

Il primo stadio (definito 'rinfresco acido') si basa sul rinfresco della madre proveniente da una lavorazione precedente (0,5-1 %); l'impasto di consistenza fluida (DY = 200-240) viene mantenuto per 6 ore a 25-26°C per favorire lo sviluppo dei lieviti. Nel secondo stadio si aggiungono nuova farina ed acqua, in modo tale da ottenere un DY= 160-180 e l'impasto ottenuto ("base acida") si lascia fermentare per 5-8 ore a 26-30 °C. In tale fase si assiste allo sviluppo dei batteri lattici, con conseguente diminuzione del pH. L'ultima fase, definita 'completo acido', prevede un'ulteriore fermentazione di 2,5-3 ore a 30-33 °C dell'impasto con DY = 180-200. La quantità di farina utilizzata in ciascuna fase dipende dal tempo di fermentazione: maggiore è la dose di farina, maggiore sarà il tempo. Complessivamente il processo dura dalle 16 alle 24 ore. Sebbene i lieviti si moltiplichino in maniera adeguata, è consuetudine aggiungere una dose di lievito compresso in quantità pari a 0,5-1 % ed un procedimento ottimale prevede l'aggiunta di una quantità che varia tra il 15 e il 35 % d'impasto acido.

Questa tecnica di lavorazione è quella maggiormente legata alla tradizione ed è eseguita nei laboratori artigianali di piccole dimensioni; la produzione del 'pane francese della baia di San Francisco', per esempio, prevede il rinfresco della madre 3 volte al giorno per tutti i giorni della settimana e l'utilizzo di una porzione elevata dell'impasto ottenuto dalla lavorazione precedente.

1.10.2 Impasti acidi a stati ridotti

Nella moderna tecnologia di lavorazione degli impasti acidi, il processo tradizionale appena descritto è stato semplificato ed automatizzato in sistemi basati su uno o due fasi di fermentazione.

Nel sistema a due stadi s'omette il rinfresco o la base acida; nella prima fase si utilizza un quantitativo di madre maggiore (2,5 % anziché 0,5-1 %) e l'impasto ottenuto (DY = 150) viene fermentato ad una temperatura di 22-26 °C per 15-24 ore. Il secondo stadio (DY = 180) prevede il mantenimento dell'impasto per un periodo di 2-3 ore alla temperatura di 27- 33 °C. L'impasto acido costituisce il 20-40 % dell'impasto finale, a cui si aggiunge lo 0,4-1,2 % di lievito compresso.

Il sistema a singolo stadio presenta il vantaggio che i tempi di prefermentazione

possono essere facilmente modificati. Esistono diverse tecniche:

- Metodo Detmold: si prepara un impasto con un $DY = 180$ e lo si lascia fermentare per 15-24 ore. La temperatura di fermentazione varia con la quantità di starter utilizzato: infatti sarà di 20-23 °C con un 20 % di madre e di 27- 28 °C con un 2 %.
- Sistema Berlino: processo che prevede l'utilizzo di un'alta percentuale di madre (oltre il 20%) e temperature di fermentazione elevate (35-36 °C), per un tempo di appena 3-4 ore. L'impasto ha una consistenza fluida ($DY = 190$) e le perdite di fermentazione sono circa la metà rispetto al metodo tradizionale.
- Sistema a singolo stadio “salato”: prevede l'aggiunta di 1-2 % di sale all'impasto finale; di quest'ultimo un 6 % è addizionato nel momento in cui si crea l'impasto acido, così si ha la possibilità di controllare l'andamento della fermentazione. La tecnica è applicata negli impianti continui e prevede l'utilizzo di cisterne a causa dell'elevata fluidità ($DY = 200$) dell'impasto.

1.10.3 Impasto acido surgelato

Ottenuto tramite un processo a tre stadi al termine della fermentazione l'impasto acido è congelato ad una temperatura di - 30 °C in sotto vuoto. Il preparato commerciale che ne consegue, contiene diversi batteri lattici e tutte le sostanze aromatiche tipiche di tali impasti; viene utilizzato direttamente in proporzioni del 20-25 % per acidificare il composto finale.

1.10.4 Impasto acido sistema francese

Questo sistema è utilizzato per la produzione di lievito naturale per il "*pain au levain*" francese. La preparazione incomincia con la produzione di un impasto compatto (DY ca. 150-152), di farina di grano, acqua ed eventualmente sale e malto, lasciando fermentare l'intero composto per un tempo di circa 24 ore. Questa iniziale fase corrisponde all'avvio delle attività fermentative dei lieviti e dei batteri lattici autoctoni della farina dalle quali deriva una debole produzione di acidi organici e CO₂. La diminuzione del pH determinata dalla sintesi degli acidi organici induce una attivazione delle proteasi della farina, le quali, insieme agli enzimi idrolitici dei batteri, agiscono sul glutine determinando una diminuzione, più o meno spinta, della consistenza dell'impasto. La seconda fase della preparazione inizia nel momento in cui si esegue il primo rinfresco, necessario per ossigenare il mezzo e apportare nuovi carboidrati fermentescibili per lo sviluppo e l'attività dei microrganismi. Il rinfresco è eseguito aggiungendo una quantità di farina equivalente al peso dell'impasto fermentato e la quantità di acqua utile per ottenere un valore di DY lievemente inferiore a quello precedente. Questo impasto sarà caratterizzato da una maggiore velocità di fermentazione e i rinfreschi saranno ripetuti fino ad ottenere un lievito naturale con costanti capacità lievitanti. La terza fase corrisponde alla ripetizione dei rinfreschi ogni 7-8 ore con lo scopo di mantenere inalterato le caratteristiche biotecnologiche dell'impasto acido grazie alla selezione dei microrganismi autoctoni dell'impasto acido. Il lievito naturale così ottenuto è indicato con il nome di "*levain chef*" (Gobetti *et al.*, 2010).

1.10.5 Impasto acido sistema americano

Secondo questo sistema, gli ingredienti di partenza per la preparazione di un lievito naturale sono rappresentati semplicemente da acqua e farina di grano, o farina di segale o una miscela delle due. Si preferisce usare farine integrali o con alto grado di estrazione per i più elevati valori di carica microbica e il maggior potere tampone rispetto alle farine di maggiore raffinazione (Gobetti *et al.*, 2010).

A differenza del sistema francese, il DY può variare da 225 (impasto liquido con rapporto di 1,25:1 acqua e farina) a 250 (rapporto 1,5:1) ed è mantenuto costante durante i diversi rinfreschi. I tempi e le temperature di fermentazione sono rigidamente controllati in ogni fase del processo. Nelle prime fasi la miscela è fermentata a 32-35°C per 24 ore favorendo lo sviluppo dei lattici per ottenere una certa acidità. Al termine si esegue il primo rinfresco aggiungendo all'impasto fermentato farina e acqua, così da ottenere un nuovo impasto con lo stesso DY. Dopo altre 8 ore di fermentazione a 32-35°C, si esegue un secondo rinfresco, lasciando fermentare il nuovo impasto per 16 ore (Gobetti *et al.*, 2010). Dopo questa prima fase di preparazione, la sequenza dei rinfreschi è eseguita, alternativamente, ogni 8-16 ore, lasciando fermentare gli impasti alla temperatura di 24-27°C. Così operando, il valore di DY di 255 rimane invariato fino all'ottenimento del lievito naturale caratterizzato da un valore di pH di 3,6-3,8 e TTA di 16-20 ml di NaOH/20g di impasto (Gobetti *et al.*, 2010). Questo metodo di produzione consente l'ottenimento del lievito naturale in 5 giornate lavorative, dove nelle ultime 8 ore (24-27°C) vengono raggiunte le ottimali proprietà sensoriali e lievitanti. Per mantenere attivo il coadiuvante, la conservazione avviene a 4°C con un rinfresco giornaliero (Kulp, 2003).

La tecnologia dell'impasto acido liquido rappresenta un potente strumento per il pane confezionato di qualità con distinte proprietà. Sempre più studi saranno richiesti per comprendere ed gestire le diverse dinamiche che governano la fermentazione dell' impasto acido. Le interazioni tra starter microbici, fattori ambientali e le tecnologie applicative influenzano la qualità del prodotto e le sue proprietà. Secondo P. Carnevali *et al.*, (2007) le applicazioni industriali di questa tecnologia devono tenere in considerazione una estrema conoscenza dei substrati fermentativi e dell'ecologia microbica nella sua tipologia ed interazioni.

La possibilità di guidare lo sviluppo microbico modificando leggermente la composizione del substrato (xilosio, ribosio ed arabinosio al posto di maltosio) permette di raggiungere alti livelli di crescita batterica, elevate acidità ed alti livelli di acidi organici. Il catabolismo degli amminoacidi permette, con le reazioni di deaminazione, decarbossilazione e transaminazione di modificare le catene laterali liberando maggiormente dei chetoacidi, ammoniaca, ammine,

aldeidi, acidi e alcoli, che sono essenziali per il gusto e l'aroma dei prodotti da forno. Le tendenze per i prossimi anni potrebbero essere orientate verso un maggiore uso della pasta madre al fine di mostrare su scala industriale questo prodotto unico che permette l'ottenimento di prodotti naturali di qualità difficilmente riproducibile con i metodi convenzionali (Gobbetti *et al.*, 2005).

1.11 Ruolo degli ingredienti nella produzione dei prodotti da forno

La produzione dei prodotti da forno, famiglia altamente eterogenea, fin dagli albori necessita di tre essenziali ingredienti: farina, acqua ed agente lievitante. Diversi per composizione, processo produttivo e caratteristiche fisico-strutturali, nei prodotti da forno tutte le tipologie di ingredienti utilizzati sono state caratterizzate da un punto di vista tecnologico. Di seguito, si mettono in evidenza i ruoli e le funzioni degli ingredienti o delle loro specifiche componenti in panificazione:

- **Farina:** La farina ovviamente rappresenta il principale ingrediente in quanto può modulare, in relazione alle sue caratteristiche, gli attributi del prodotto da forno finito. Sul mercato numerose tipologie sono disponibili, ma quella maggiormente utilizzata in panificazione deriva dalla raffinazione del frumento tenero.

Nel suo complesso la cariosside dei cereali contiene: amido ed altri carboidrati (maltosio, arabinosio, fruttosio, cellulosa, pentosani etc..), ceneri, fibre (solubili, es: xilani; e insolubili, es: β -glucani), lipidi, proteine, acqua e in piccola parte vitamine (lipo e idrosolubili, es: Vit. E e B, H), minerali (ferro, magnesio, manganese, fosforo, calcio e potassio) ed enzimi (es: α e β -amilasi, proteasi, fitasi, lipasi) (Gobbetti *et al.*, 2010; Rupesh S. e Shraddha R, 2011).

Secondo dati dell'INRAN (2000) in media su 100g di farina di cereali si riscontrano: 12,30% acqua; 11,00% proteine; 75,00% carboidrati; 1,00% grassi; 0,05% ceneri e 0,20% cellulosa.

Ciò che determina la “struttura” di un prodotto da forno è il glutine (frazione proteica), un composto ottenuto dall’influenza reciproca di due proteine, gliadine e glutenine, con l’acqua. L’interazione definisce un reticolo tridimensionale proteico continuo e omogeneo in tutta la massa con caratteristiche reologiche distintive e modulari, in quanto la propria viscoelasticità ne garantisce estensibilità e deformabilità in lavorazione durante l’impastamento, lievitazione e in cottura (prime fasi), permettendo poi di conservare elasticità e tenacità tali per cui la struttura sviluppata rimanga della forma assegnata (Gobbetti *et al.*, 2010). Fattori chiave nella formazione di questa particolare disposizione costitutiva sono dovuti al rapporto gliadine/glutenine e alla struttura, composizione e peso molecolare delle diverse frazioni proteiche (MacRitchie, 1992; Sherwry, 2003).

La variabilità nel contenuto proteico (10-16%) e le interazioni quali/quantitativi della sua frazione determinano la superiorità tecnologica del frumento tenero in panificazione rispetto alle similari farinacee coltivate (Gobbetti *et al.*, 2010). A tal proposito, le differenti varietà cerealicole, sebbene siano in grado di formare la struttura glutinica, possiedono differenze nelle rispettive frazioni proteiche determinando nel reticolo dei legami con caratteristiche che variano per tenacità ed estensibilità. Legami non covalenti come legami idrogeno, ionici, idrofobici, sono importanti per l’aggregazione di gliadine e glutenine e per creare la struttura determinando le proprietà fisiche menzionate. Quantità e qualità delle proteine del glutine sono in gran parte influenzate per i requisiti di mixing durante l’impastamento e dalla sensibilità all’eccessiva lavorazione (tasso di abburattamento) dei differenti farinacei cerealici. A prescindere dal cereale, un fattore che influenza in maniera incisiva le proprietà dell’impasto è la presenza di polisaccaridi di natura non amidacea, soprattutto in quantità elevate nella farina. Cellulosa, β -glucani, arabinoxilani etc. complessivamente riconosciute come fibra, sono costituenti della parete cellulare della cariosside. Di conseguenza tanto più è abbondante la loro presenza e tanto meno la farina è raffinata. La

struttura lineare di questi composti, caratterizzata da cospicui gruppi –OH, possiede una specifica interazione con l'acqua, di conseguenza gli sfarinati con tassi elevati di estrazione consentono di ottenere una maggior resa in produzione (Gobbetti *et al.*, 2010).

- **Malto**

In panificazione il malto è un ingrediente che riveste diverse funzioni: apporta zuccheri ed enzimi (α -amilasi), permettendo un maggiore sviluppo del volume del pane e la formazione di un'alveolatura regolare, conferisce una colorazione più intensa alla crosta e fornisce al pane profumo e sapori migliori. Il malto è presente in commercio in due forme:

1. farina di malto con un contenuto d'umidità del 12%;
2. estratto di malto con un contenuto solido del 70- 75%

Nel passaggio dallo stadio di latenza alla fase vitale, all'interno della cariosside si attivano le diastasi, le quali cominciano a degradare le riserve nutritive. Quando si forma la radichetta, la germinazione viene bloccata, il cereale viene essiccato, formando il malto. Se viene macinato a secco, si costituirà la farina, se viene schiacciato, posto in acqua, per completare l'azione enzimatica sull'amido, e successivamente viene filtrato e concentrato, s'otterrà l'estratto, il quale potrà essere ulteriormente essiccato per dare estratto di malto in polvere.

L'impiego dell'estratto di malto, avendo una concentrazione più elevata di zuccheri semplici fermentescibili (maltosio 60-72%), rispetto alle farine maltate (maltosio 5-10%), agevola la fermentazione. Le farine maltate, invece, contenendo grandi quantità d'enzimi, vengono utilizzate nelle farine a bassa attività amilasica.

Quantità eccessive di malto negli impasti possono provocare un'intensa azione proteolitica nei confronti dei lieviti e del glutine, con conseguenze negative sia sulla lievitazione che sulla consistenza dell'impasto stesso.

- **Agente lievitante:** sostanze che direttamente o indirettamente contribuiscono al rigonfiamento degli impasti in fermentazione e dei prodotti da forno. Il principale agente lievitante è l'anidride carbonica, ma hanno una notevole importanza anche il vapore acqueo e l'aria che, inglobate durante la preparazione dell'impasto permettono la dilatazione dell'impasto durante la fase di cottura. Tutti i prodotti da forno si possono distinguere secondo il metodo di lievitazione usato:

Lievitazione chimica: ottenuta tramite sostanze che producono repentinamente in cottura, in modo controllato e completo, anidride carbonica (CO₂). Questa categoria sfrutta differenti processi chimici acido/base (un esempio: bicarbonato di sodio e tartrato acido di potassio) o decomposizione di sali (bicarbonato d'ammonio). Questa tipologia di lievito è utilizzata nel settore dei prodotti da forno dolciari, dove le elevate concentrazioni di zuccheri e grassi in formulazione ostacolano lo sviluppo dei lieviti biologici, causa elevate pressioni osmotiche sulla microflora, riducendone il potere fermentativo. Per ciò i lieviti chimici svolgono un'azione sinergica verso il lievito biologico in questa categoria di prodotti.

Il loro cospicuo utilizzo è dovuto dalla totale mancanza di tossicità (tipologia di lievito e giuste quantità in formulazione, per non lasciare residui nel prodotto finito), basso costo, facilità d'uso e elevata solubilità a temperatura ambiente in formulazione (Gobbetti *et al.*, 2010).

Lievitazione biologica: prodotti in cui la lievitazione è ottenuta dalla produzione di anidride carbonica per fermentazione del substrato da parte dei microorganismi, lieviti e/o batteri lattici (es. lievito compresso, lievito naturale, sistema a biga). Nella panificazione moderna il lievito biologico più utilizzato è rappresentato da biotipi selezionati di *Saccharomyces cerevisiae*. Questo microorganismo è selezionato, ai fini

panificatori, sulla base del vigore fermentativo, mentre le variabili secondarie sono shelf-life, osmotolleranza, contenuto d'acqua e temperatura di conservazione. In condizioni anaerobiche, producendo CO₂, permettono l'aumento di volume della maglia glutinica, in relazione al microrganismo dominante o al consorzio microbico.

Lievitazione fisica: prodotti in cui l'approccio fisico dell'inclusione d'aria tramite intense azioni meccaniche permette la creazione di una microalveolatura forzata (lievitazione fisica) che in seguito a cottura, con l'evaporazione dell'acqua, permette un aumento del volume finale stabilizzandone la struttura (es. meringhe, "paste battute" come pan di spagna) (Gobbetti *et al.*,2010).

Lievitazione per evaporazione: prodotti in cui la lievitazione è dovuta essenzialmente all'evaporazione dell'acqua emulsionata o separata in strati rispettivamente in/da grassi (es. bignè e pasta sfoglia).

Sistemi misti, Biologica con Laminazione: particolare processo produttivo riservato a poche realtà gastronomiche, in particolare si ricorda la "pasta danese". La metodica prevede una prima lievitazione biologica, formato con processo di laminazione (come per la pasta sfoglia) (Gobbetti *et al.*,2010).

Sebbene la CO₂ sia il prodotto maggiormente responsabile dell'aumento del volume, bisogna ricordare che sono presenti, in minori concentrazioni, ulteriori sostanze (gas e sostanze basso bollenti) che permettono in cottura di aumentare la massa, come etanolo e ammoniaca.

- **Acqua:** solvente necessario per la formazione dell'impasto, interagisce con le frazioni proteiche di gliadine e glutenine dell'amido condizionando la natura viscoelastica della matrice. Aggiunta come tale o attraverso i differenti ingredienti utilizzati nella formulazione (Tab. 6):

Ingrediente	Umidità (%)
Farina	12,0-14,5
Uova (intero, gallina)	~75
Latte di vacca	~87
Zucchero (raffinato, bianco)	0
Sciroppo di glucosio	18,0-20,0
Burro e Margarina	14,0-16,0
Lievito di Birra	~
Sale	0

Tabella 6: Umidità ingredienti (Gobetti *et al.*,2010).

Essa subisce importanti alterazioni durante le varie fasi di lavorazione in termini di umidità assoluta (totale) e relativa (residua). Oltre alla dissoluzione di sali e zuccheri aggiunti in formulazione, rende uniforme la dispersione delle cellule di lievito (biologico o chimico) nell'impasto. Inoltre favorisce l'innescio delle idrolisi degli zuccheri ed è importante per la gelatinizzazione durante la cottura e contribuisce all'aumento di volume con la vaporizzazione.

Collegata alla sua funzione universale di solvente, l'acqua presenta aspetti tecnologici differenti in relazione alla sua "durezza" (contenuti di cationi multivalenti disciolti, principalmente Ca^{2+} e Mg^{2+} presenti nelle forme: bicarbonati, solfati, cloruri e nitrati), termine arretrato che, nel contesto sociale, è suddiviso in tre tipologie: dolce, dura e alcalina. Nel settore della panificazione, in relazione al grado di durezza, si ottengono differenti comportamenti tecnologici nella matrice. L'acqua media, secondo Pyler, (1988), è la più adatta in panificazione in quanto lo specifico contenuto di sali rafforza, la maglia glutinica e permette un effetto positivo nella trofia dei lieviti. Acque "dolci" inducono minori interazioni nella struttura con conseguenti ricadute nella reologia tanto che gli impasti formati con queste acque risultano molli ed appiccicosi (Gobbetti *et al.*, 2010). Infine per le acque "alcaline", l'elevato potere tampone ne scoraggia l'uso in quanto limita l'attività metabolica di acidificazione della microflora e riduce lo sviluppo dell'impasto in lievitazione (Gobbetti *et al.*,2010).

- **Zuccheri:** tecnologicamente, a causa della loro spiccata idrofilicità e della quantità d'acqua aggiunta in formulazione, condizionano l'impasto in tutte le fasi del processo, rendendolo più consistente (Gobbetti *et al.*, 2010). Sono responsabili della vitalità cellulare della microflora nei differenti step di fermentazione (“rinfreschi”). Ulteriori zuccheri sono rilasciati durante lo sviluppo di gas in fermentazione, azione degli enzimi (α e β -amilasi) della farina. Gli zuccheri possiedono una funzione antiplasticizzante, ritardando il blocco dell'amido “nativo” riducendo il fenomeno del rafforzamento inibendo la retrogradazione.
- **Sale:** il cloruro di sodio è considerato un ingrediente con attivo ruolo funzionale nella produzione di molti prodotti da forno. L'uso rafforza la maglia glutinica dell'impasto e controlla l'azione della microflora (Miller e Hosney, 2008), determinando il volume finale del prodotto. Piccole quantità in formulazione migliorano il flavour e favoriscono l'azione delle amilasi comportando un rilascio di maltosio a favore del trofismo dei microrganismi (lieviti e batteri lattici). Inoltre questo ingrediente svolge delle sinergie nei confronti di additivi e di miglioratori applicati in panificazione.
- **Uova:** sono un ingrediente molto utilizzato nelle preparazioni alimentari per la loro versatilità. L'albume viene impiegato singolarmente per la sue capacità schiumogene e gelificanti. Il tuorlo è utilizzato per il suo potere colorante ed emulsionante, data la presenza di fosfolipidi, come la lecitina. Impiegando uova nei prodotti da forno occorre valutare il rapporto tra ingredienti solidi (farina e zucchero) ed ingredienti liquidi (acqua, uovo e latte), per evitare cedimenti di struttura a fine cottura, se le uova sono in quantità insufficiente rispetto allo zucchero, o minor aumento di volume, se le uova sono in numero eccessivo.

- **Lipidi:** utilizzati in panificazione, sono di diversa natura: oli vegetali (olio d'oliva) e grassi animali (strutto o burro, uova). Sono ottimi ingredienti nei prodotti da forno in quanto possono influenzare positivamente la lavorabilità dell'impasto e la produzione del profilo aromatico. Il principale ruolo tecnologico è quello di "lubrificare" la maglia glutinica permettendo una migliore estensibilità prima della rottura, promuovendo quindi un maggiore sviluppo del prodotto in lievitazione e cottura (Desgrez, 1994). L'uso di certe frazioni lipidiche può stabilizzare le alveolature create in lievitazione, rendendole più regolari (Gobbetti *et al.*, 2010). Durante la conservazione, i lipidi prevengono la retrogradazione dell'amido e ostacolano la trasmigrazione dell'acqua tra reticolo proteico e amido, riducendo il fenomeno del rafferimento (Gray e Bemiller, 2003).
- **Additivi:** secondo il Reg. CE 1333/2008 ed integrazione Reg. CE 1129/2011 gli additivi alimentari costituiscono una grande famiglia di sostanze che abitualmente non sono consumati come tali negli alimenti, ma sono intenzionalmente aggiunte ad alimenti per scopi tecnologici. La libera circolazione di alimenti sicuri e sani è un elemento fondamentale del mercato interno e contribuisce in maniera significativa alla salute e al benessere dei cittadini. L'uso degli additivi alimentari deve essere sicuro, e non deve indurre in errore i consumatori e deve presentare un vantaggio per questi ultimi. Nella panificazione sono comunemente utilizzati le seguenti categorie di additivi:
 1. Coloranti, nella fattispecie solo E150a-d, un caramello utilizzabile prettamente per il pane al malto.
 2. Antimuffe, quali acido sorbico (E200), potassio sorbato (E202) e calcio sorbato (E203), acido tartarico e suoi sali (E 334-E337) anche l'acido lattico (E270) e acido propanoico e i suoi sali (E280-E283) sono conservanti "secondari" oltre la loro funzione primaria

3. Antiossidanti, come i lattati (E325 – E329). Sono sostanze utilizzate ai fini tecnologici che modificano l'estensibilità, la forza e la tenacità dell'impasto quali acido ascorbico (E 300), ascorbato di sodio (E301), ascorbato di calcio (E302) e gli esteri dell'acido ascorbico con acidi grassi (E304). Per gli emulsionanti come lecitine (E322, svolgono anche un ruolo antiossidante), mono e digliceridi di acidi grassi (E471), esteri dei mono e digliceridi di acidi grassi (E472a,d,e,f), sodio stearolil-2-lattilato (E 481) e i fosfati e polifosfati (E 450,E 452); sali di fusione, queste sono un gruppo di sostanze che disperdono le proteine realizzando in tal modo una distribuzione omogenea dei grassi e degli altri componenti. Il glutine, può essere usato come migliorante delle farine destinate alla panificazione (glutine secco vitale di grano), ed enzimi quali proteasi ed amilasi;
4. Sostanze anti “collasso” dell'impasto, come acido acetico (E 260), acetato di potassio (E261), acetato di sodio (E262), acetato di calcio (E263), acido lattico (E 270), acido propionico (E 280), propionato di sodio (E 281), propionato di calcio (E282) e propionato di potassio (E283);

1.12 Influenza dell'impasto acido nella formulazione dei prodotti da forno

Le qualità intrinseche nell'uso di questa tecnologia si possono riassumere in relazione a differenti ambiti:

- **Nutrizionali.** I cereali, principalmente il frumento maggiormente utilizzato nelle produzioni di prodotti da forno a livello mondiale, sono fondamentali per gli apporti energetici giornalieri, tuttavia presentano carenze per quel che concerne i contenuti proteici, specialmente su diversi aminoacidi essenziali, come lisina, treonina, metionina, triptofano e isoleucina e anche per alcuni apporti vitaminici. Invece le farine integrali

sono ricche in fibre, minerali, vitamine e molti composti fitochimici come fenoli, tocotrienoli, tocofenoli, lignani e acido fitico.

La fermentazione con lievitazione naturale, migliorando l'appeal del prodotto, permette, oltre all'aumento della digeribilità di proteine e carboidrati, di incrementare la biodisponibilità di alcune componenti tramite la scissione delle associazioni chimico-fisiche tra l'amido e i micro/macronutrienti come vitamine, minerali (Larsson e Sandberg 1991; Lopez *et al.*, 2003), proteine, senza quindi toglierne le importanti funzionalità nutrizionali ma enfatizzandole (Rupesh S. e Shraddha R. 2011). Inoltre, in seguito ai bassi valori di pH associati ad una acidificazione microbiologica o chimica, dell'impasto di grano, anche se per quest'ultimo metodo in minor entità, porta a una solubilizzazione dei complessi fitati (mio-inositolo-esafosfati), composti presenti in particolare nella crusca della cariosside, quindi nelle farine integrali, che impediscono l'assorbimento di ferro, calcio e zinco ed inattivano alcuni enzimi digestivi. Questa distruzione determina un incremento nella biodisponibilità dei minerali (Rupesh S. e Shraddha R, 2011). Onno e Roussel (1994), mostrano le differenze nutrizionali comparando un pane ottenuto con impasto acido e un con lievito di birra:

Pane con lievito naturale	Pane con lievito di birra
<ul style="list-style-type: none">• Attività ottimale delle fitasi e degradazione dell'acido fitico responsabile della formazione di complessi con alcuni ioni (Ca^{2+}, Fe^{2+}, Mg^{2+} ecc)• Incremento della concentrazione di amminoacidi liberi• Diminuzione dei valori di indice glicemico. Probabile maggiore tolleranza da parte di soggetti intolleranti al glutine o affetti da allergie ai cereali.	<ul style="list-style-type: none">• Azione ridotta delle fitasi, effetto decalcificante• Concentrazione di amminoacidi liberi simile a quella della farina

Un'altra caratteristica osservata da Korakli *et al.*,(2001) in un impasto acido fermentato con un solo ceppo, esattamente un *Lb.sanfranciscensis*, ha notato che la sua produzione di EPS (Esopolissacaridi) migliora le proprietà nutrizionali dei prodotti da forno in cui è applicato, in virtù del fatto che questi polimeri possono essere utilizzati dal microbiota intestinale, specialmente da bifidobatteri. Inoltre la fermentazione con il lievito naturale determina una rimozione dei composti indesiderati come tossine endogene, micotossine, composti cianogenici e riduzione delle flatulenze prodotte dai carboidrati nella digestione intestinale. Infine, Di cagno *et al.*,(2002), hanno dimostrato come alcuni batteri lattici nell'impasto acido possiedono un'attività idrolitica verso peptidi della prolamina, coinvolta nelle intolleranze umane sui cereali.

- **Sensoriali.** L'aroma e il sapore sono indubbiamente i più importanti attributi che determinano la qualità intrinseca dei prodotti da forno. Questi, negli ultimi anni, hanno subito radicali cambiamenti in quanto il mercato richiede e apprezza sapori e gusti autentici, antichi, con tipiche note riscontrabili nel tradizionale pane artigianale (Decock e Cappelle, 2005). L'aroma del pane rimane comunque una delle più complicate sfide in relazione alla sua complessa natura. L'utilizzo della tecnologia dell'impasto acido, al posto del classico lievito di birra, caratterizza sensorialmente il profilo aromatico e la palatabilità del prodotto; questo miglioramento richiede cure durante il processo che va controllato per evitare, ad esempio, eccessive acidità (percepita come un sapore amaro o pungente), riuscendo ad ottenere quei connotati positivi e apprezzati nel flavour come aromi d'arrosto nella crosta di pane (Katina *et al.*, 2004).

Le colture starter, il contenuto di ceneri nelle farine, la temperatura di fermentazione e la resa dell'impasto sono segnalati come i principali fattori che influenzano il sapore del pane (Gobbetti *et al.*, 1995.; Hansen e Hansen, 1996; Martinez-Anaya, Colletto, & de Barber, 1995; Meignen *et al.*, 2001). Tradizionalmente, un ampio e pungente sapore è stata

controllato limitando la quantità d'utilizzo del lievito naturale a 5-10 g su 100 g di pasta. Tuttavia, questo approccio limita la quantità di precursori aromatici della pasta madre, non riuscendo a sfruttare le importanti potenzialità aromatiche dell'impasto acido nel prodotto finito. Alcuni studi hanno constatato che controllando il processo di lievitazione naturale su acidità moderate si ottengono elevate quantità di precursori aromatici grazie a fermentazioni ottenute dall'utilizzo di lieviti e LAB con particolari proprietà tecnologiche (Mori, Okada, Onishi, e Takaki, 2001).

Nel consumo di prodotti che contengono quantità cospicue di lievito naturale, è possibile constatare dei connotati aciduli imputabili principalmente al maggior tempo di fermentazione (12-24 ore) dove l'azione della microflora determina, oltre alla riduzione del pH in seguito ai metabolismi biochimici (acido lattico e acido acetico) ad opera principalmente dei batteri lattici, un'azione più spinta degli enzimi proteolitici, i quali vanno ad arricchire l'impasto di aminoacidi e altri composti più semplici delle proteine (peptidi), precursori di sostanze aromatiche direttamente coinvolte nella formazione di composti aromatici durante la reazione di Maillard. La fermentazione con il lievito naturale permette di suddividere gli aromi prodotti durante le attività biologiche e biochimiche (Spicher, 1983) in due principali categorie: i composti non volatili, acidi organici prodotti dai batteri omo ed etero fermentanti (Gobbetti *et al.*, 1995), e i composti volatili che includono, alcoli, aldeidi, chetoni, esteri e composti solforati (Tab.7).

Il pane ottenuto con la lievitazione naturale ha un contenuto più elevato di composti volatili ed, inoltre, ottiene punteggi più alti nelle prove sensoriali rispetto al pane chimicamente acidificato con acido lattico e acetico (Hansen *et al.*, 1989; Hansen e Hansen, 1996, Carnevali *et al.*, (2007).

	Alcohols	Esters	Carbonyls and others
Imitated sourdough ^a	Propanol, pentanol	Ethyl acetate (tr)	Hexanal, benzaldehyde(E)-2-heptenal
Sourdoughs fermented with starter cultures	Ethanol, methylpropanol, butanol, pentanol, hexanol, 2-hexanol, (E)-2-hexenol, heptanol	Ethyl acetate, ethyl lactate, ethyl octanoate, hexyl acetate	Hexanal, (E)-2-heptenal, 2-pentylfuran
Sourdoughs fermented with starter cultures and sourdough yeasts	Ethanol, propanol, methylpropanol, 2-butanol (tr), butanol, 2- and 3-methylbutanol, pentanol, hexanol, 2-hexanol, (E)-2-hexenol, heptanol, octanol (tr)	Ethyl acetate, ethyl propanoate, butyl acetate, 2-methylbutyl acetate, pentyl acetate, ethyl hexanoate, hexyl acetate, ethyl lactate, ethyl octanoate	3-Hydroxy-2-butanone (acetoin), 2,3-butanedione (diacetyl), (E)-2-heptenal, 2-pentylfuran

Tabella 7: Composti aromatici in due diverse tipologie di sourdough fermentate con solo colture starter (sopra) e con colture starter e lieviti specifici per sourdough (Hansen A, Schieberle P, 2005).

- **Tecnologiche.** Avvalersi dell'applicativo impasto acido implica discrepanze sia nella gestione dei consueti impianti produttivi panificatori che nelle caratteristiche reologico-produttive dei prodotti derivati. Nelle industrie, la scelta di questo coadiuvante necessita di specifiche strumentazioni (biofermentatori) e di personale altamente qualificato che governino e controllino l'intero processo fermentativo garantendone una qualità costante in produzione, in quanto se non soddisfatti questi requisiti, in relazione alla complessa natura del prodotto, il risultato finale non potrà essere costante compromettendone la qualità.

Onno e Roussel (1994) hanno evidenziato alcune delle principali differenze tecnologiche osservabili in un pane ottenuto tramite lievito di birra e con lievito naturale:

	Pane con Lievito Naturale	Pane con Lievito di Birra
pH	3,8-4,6	5,3-5,8
Acido Lattico	0,4-0,8%	0,005-0,04%
Acido Acetico	0,10-0,40%	0,005-0,04%
Sviluppo del pane (g/dm³)	0,22-0,30	≤ 0,20
Caratteristiche Sensoriali	Odore e Sapore più complessi e gradevoli	-
Conservazione Microbiologica	Lunga	Corta

L'approccio con lievito di birra permette sì una conduzione semplificata del processo, con attivazione dei *Saccharomyces cerevisiae* in forma solida o granulare in vasche termoriscaldare con acqua e zuccheri per periodi di

tempo di circa 4 ore, ma la differenza sostanziale del lievito naturale è determinata dalle tempistiche di produzione che oscillano, dalle 4 alle 24/36 ore (a seconda della tipologia di impasto acido e condizioni di fermentazione) con utilizzo di un inoculo prefermentato su preinoculo di impasto acido o tramite colture microbiologiche prefermentate.

L'entità di acidificazione dell'impasto acido varia in relazione alla natura della coltura starter o autoctona in fermentazione, ma, per l'impasto acido di grano il range di pH si attesta in media su 3.5 – 4.3 (Collar *et al.*, 1994a). Data una applicazione nei prodotti da forno di circa il 20%, i valori di pH degli impasti addizionati di impasto acido variano dai 4,7 a 5,4 di pH (Collar *et al.*, 1994a). L'acidificazione della pasta madre e l'acidificazione parziale dei prodotti in cui è in uso ha un impatto sulla struttura di alcuni componenti come glutine, amido e arabinosilani. Questo abbassamento del pH determina un maggior gonfiore del glutine (Collar *et al.*, 1994a), infatti Gobbetti *et al.*, (2010) mostra differenze nel volume specifico e nella porosità della mollica, con 3,0 ml/g e 18% nel pane prodotto con panificazione diretta con lievito di birra e 3.6 ml/g e 23% nel pane prodotto con lievito naturale e metodo indiretto.

Gli acidi organici prodotti nell'impasto acido, secondo quanto riportato da E.K. Arendt *et al.*,(2007), influenzano fortemente la miscelazione e il comportamento degli impasti dove gli impasti con valori bassi di pH richiedono tempi di miscelazione leggermente più corti, tuttavia con minore stabilità della struttura rispetto agli impasti normali (Hoseney, 1994). L'influenza diretta degli acidi organici prodotti sulle proprietà reologiche degli impasti, sono state esaminate intensamente utilizzando metodi sia empirici che tecniche fondamentali (E.K. Arendt *et al.*,2007). Diversi studi su impasti di grano utilizzando metodo farinografico dimostrano che l'assorbimento di acqua aumenta mediante aggiunta di acidi organici e in assenza di sale (Tanaka *et al.*,1967; Maher Galal *et al.*,1978). Inoltre l'aggiunta di acidi organici sostanzialmente diminuisce il tempo di miscelazione dell'impasto ma ne indebolisce la struttura (Maher Galal *et al.*,1978; Wehrle *et al.*,1997) come già riportato da Hoseney,

1994. Maher Galal *et al.*,(1978) avanzato l'ipotesi che, in un ambiente acido, vi è una considerevole carica netta positiva e la solubilità delle proteine aumenta. La maggiore repulsione elettrostatica intramolecolare porta ad un dispiegarsi delle proteine del glutine e ad una maggiore esposizione dei gruppi idrofobici, ma la presenza di una forte forza elettrostatica repulsiva intermolecolare impedisce la formazione di nuovi legami. L'effetto netto di tali eventi è un indebolimento della struttura e quindi un effetto ammorbidente. Tale ipotesi è sostenuta da Takeda *et al.*,(2001), che riporta un aumento della solubilità proteica del glutine in ambiente a pH acido. Questa disaggregazione della rete glutinica per aggiunta di acido è in linea con i risultati ottenuti dalla misurazione empirica delle proprietà dell'impasto utilizzando metodo estensografico, che dimostra come l'aggiunta di un acido, in presenza di sale, crei impasti con una maggiore resistenza all'impastamento ma una minore estensibilità (Tsen, 1966. Tanaka *et al.*, 1967).

L'aggiunta di polisaccaridi vegetali (glutine, amido etc) è una comune pratica nella produzione di pane per migliorare la texture e la shelf-life del pane, ma sono sempre più in studio le idoneità tecnologiche di alcuni possibili sostitutivi come gli EPS prodotti da batteri lattici. Delle due classi di EPS da LAB (omo ed eteropolisaccaridi), maggiori e positivi riscontri si osservano per gli eteropolisaccaridi in quanto le colture starter di LAB producono principalmente questi polisaccaridi nelle fermentazioni del latte in quantità generalmente inferiori ai 0,5-1g/l (De Vuyst e Degeest, 1999). Una preliminare valutazione delle prestazioni in cottura nei prodotti da forno di alcuni EPS (reuterano, destrano e levani) ottenuti da LAB è stato recentemente discusso da Brandt *et al.*,(2003), ma si riscontrano influenze positive nella reologia del pane con l'utilizzo del fruttano da *Lb. sanfranciscensis* (Brandt, 2001; Korakli *et al.*, 2000). Interessanti sono le EPS prodotte in situ dai batteri lattici che fanno riscontrare una maggiore efficacia rispetto a quelle aggiunte di proposito. I diversi polimeri prodotti dai LAB inducono influenze benefiche su alcune proprietà tecnologiche del pane come un maggiore assorbimento dell'acqua da parte dell'impasto,

una migliore lavorabilità dello stesso e un aumentato volume nel prodotto finito. Inoltre si riscontrano ritardi nel rafferimento del pane con possibili attributi di carattere probiotico se consumato regolarmente (Dal Bello *et al.*, 2001 ; Tieking and Ganzle, 2005).

Oggi giorno le industrie utilizzano diverse tipologie di additivi per migliorare le caratteristiche qualitative e conservative dei prodotti da forno. Questo trend vede un rapido cambiamento verso l'uso razionale e sempre più naturale di ingredienti salutari e completamente organici.

L'utilizzo dell'applicativo impasto acido rappresenta una di queste possibili con i possibili additivi biotecnologici concessi in panificazione come enzimi esogeni, polisaccaridi non amidacei. Corsetti *et al.*, (2000) ha valutato le loro potenzialità determinando il contributo del tasso di rafferimento in seguito all'aggiunta distinta di α -amilasi, proteasi, pentosani nel pane con impasto acido, preparato con ceppi di *S. cerevisiae*, *Lb. sanfranciscensis* e *Lb. plantarum*. Gli autori hanno riportato un effetto positivo nel tasso di rafferimento, ulteriormente rallentato dall'aggiunta delle α -amilasi. Invece nel pane con aggiunta di soli pentosani e in quello con una miscela di pentosani ed enzimi delle endoxilasi del ceppo di *Lb. hilgardii*, si è osservato un maggior ritardo nel rassodamento del pane. Gli autori hanno concluso che l'uso combinato di LAB e pentosani può essere un fondamentale prerequisito nel ritardo della solidificazione della crosta.

Conservative. Il rafferimento e il deterioramento da parte dei microrganismi sono le cause principali di una minore conservabilità del pane. La temperatura, il contenuto di umidità, cambiamenti nella struttura del glutine e la migrazione dell'acqua dal glutine all'amido sono i fattori che influenzano la cinetica di rafferimento del pane.

Additivi come monogliceridi, esteri diacetiltartarici, sodio stearoil-lattilato, carbossimetilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa e le α -amilasi di batteri e funghi sono oggi riconosciuti come agenti anti-rafferimento.

L'acidificazione, la produzione di CO₂ e l'idrolisi dell'amido incidono

positivamente sui cambiamenti chimico-fisici del pane durante il periodo di stoccaggio, migliorando il processo di lievitazione e ritardando il raffermimento (Crowley *et al.*,2002). Combinazioni di ceppi di batteri lattici selezionati e additivi, quindi, potrebbero essere un utile metodo nel preservare le proprietà del pane durante la conservazione. I LAB, inoltre, contribuiscono al miglioramento della sicurezza igienica del pane. La loro attività antimicrobica è dovuta alla produzione di acidi organici, anidride carbonica, perossido di idrogeno, diacetile, ma anche alla sintesi di batteriocine (Messens e De Vuyst, 2002). Le batteriocine sono composti proteici con attività antibatterica contro microrganismi filogeneticamente affini (Tagg *et al.*,1976). Questo aumento della conservazione attraverso l'acidificazione e la produzione di etanolo e composti antimicrobici (batteriocine) può determinare un'inibizione degli agenti patogeni (*Bacillus cereus*, *Burkholderia gladioli*, *Staphylococcus aureus*) ed inibizione di microrganismi indesiderati nei prodotti da forno in particolare *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*.

Il pane presenta una maggiore conservabilità anche per la presenza di pullulanasi, enzima prodotto da alcuni microrganismi, il quale impedisce la formazione di legami tra le molecole lineari d'amilosio durante il raffermamento del pane e, secondo una più recente ipotesi, favorirebbe l'idrolisi dei legami α 1-6, permettendo di migliorare l'aspetto del pane. Durante la fermentazione dell'impasto acido la formazione di acido lattico ed acetico in seguito, soprattutto, all'attività dei batteri lattici determina un'azione inibitoria sulla crescita dei microrganismi estranei all'ambiente dell'impasto acido e soprattutto dei microrganismi nocivi. E' stato mostrato che l'attività antimicrobica dei vari LAB varia, e che essa è soprattutto associata con i LAB etero fermentanti obbligati. Altri composti prodotti dai batteri lattici sono importanti per la loro attività antimicrobica come per esempio la CO₂, l'etanolo, l'idroperossido di idrogeno, diacetile, batteriocine e anche sostanze antibiotiche (reutericiiclina) (Messens *et al.*, 2002).

Capitolo 2: Il Selenio

2.1 Cenni storici

Il selenio (Se), dal nome “Selene”, dea dell’antica greca raffigurante la luna (Flohe *et al.*, 1973), fu identificato nella sua purezza da Jon Jacob Berzelius nel 1817 (Hurd and Kipling, 1964). Questo richiamo alla divinità mitologica è da attribuirsi alla duplice natura dell’elemento, che, come riportato da Ujang Tinggi , (2003): “come le due facce della luna che simboleggiano mitologicamente la luminosità e l’oscurità, il selenio può essere ritratto come un elemento essenziale alla vita umana ma anche tossico, che può portare alla morte se non controllato quantitativamente nel suo consumo”.

Le prime osservazioni di questo elemento risalgono al lontano 13° secolo, grazie ad Arnaldo di Villanova e al grande Marco Polo. Il selenio venne descritto per il suo peculiare colore rosso indicato dal Villanova nel suo *Rosarium Philosophorum* come uno zolfo rosso, lo stesso ricercato dal Berzelius 500 anni dopo (Hoefler, 1842), e dalle cronache dell’avventuriero italiano, descritto durante l’attraversamento della provincia cinese del Tanguth come un elemento tossico che provocava alterazioni della morfologia degli zoccoli dei cavalli al pascolo su terreni ricchi di questo elemento con flore che ne consentivano un elevato accumulo negli apparati vegetativi (Spallholz, 1994).

Nelle ricerche scientifiche degli elementi traccia, le iniziali scoperte del 1930 consideravano il selenio come tossico in quanto si riteneva colpevole di cecità e di alcune malattie nel bestiame allevato in aree con alti contenuti di selenio. Dal 1957, tuttavia, le scoperte inerenti al ruolo attivo del Se nella prevenzione delle necrosi epatiche causate da carenza di vitamina E (K. Schwarz, 1957) permise di sostituire la supplementazione di vitamina E nelle diete di ratti e pulcini, come riportato da K Schwarz *et al.*, (1957), per la prevenzione delle lesioni vascolari, muscolari e/o epatica. Alle luce di queste evidenze, le funzioni fisiologiche del Se sono state studiate estensivamente sino ad oggi. Da quel momento, è emersa

l'importanza di questo elemento essenziale per la salute umana, sia per le maggiori probabilità di morte associata ad una carenza, come pure per ridurre i rischi del cancro con un sovra dosaggio nella dieta. Inoltre, nel 1973, i risultati di due gruppi di ricerca (L, Flohe, 1973 e JT Rotruck, *et al.*, 1973) attribuirono al Se la capacità di essere un costituente efficiente nel sito attivo della glutazione perossidasi (GPx) fornendo una base logica del ruolo del Se come elemento antiossidante. I risultati di mortalità e morbilità indotte dalla malattia di Keshan (una cardiomiopatia giovanile) sono state drasticamente ridotte dalla supplementazione con selenite di sodio, aspetto che ha promosso gli studi sul ruolo nutrizionale di Se nella salute umana.

2.2 Proprietà del selenio

Il selenio appartiene “formalmente” alla categoria dei non metalli, situato nel VIa gruppo della tavola periodica. Questo gruppo racchiude dei non metalli situati sopra al selenio, ovvero lo zolfo e l'ossigeno, e dei metalli situati al di sotto, come il tellurio e il polonio, se si considera il periodo, invece, il selenio si trova tra il Va gruppo adiacente quindi all'arsenico e tra il VIIa gruppo nel quale è presente il bromo. Questa particolare locazione all'interno della tavola periodica, permette di considerare il selenio come un metalloide avente entrambe le proprietà degli elementi metallici e non metallici. Alcune delle principali proprietà del selenio sono elencate nella tabella 8:

Atomic number	34
Atomic mass	78.96
Stable isotopes	⁷⁴ Se, ⁷⁶ Se, ⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸⁰ Se, ⁸² Se
Electronic structure	[Ar]3d ¹⁰ 4s ² 4p ⁴
Atomic radius	0.14 nm
Ionization energy	940.7 kJ/mol
Pauling electronegativity	2.4
Melting point	217°C
Boiling point	685°C
Band energy gap	178 kJ/mol

Tabella 8: Proprietà atomiche, chimiche e fisiche del selenio (Conor, R. 2006).

Le proprietà caratteristiche del selenio, in relazione alla particolare configurazione elettronica ($3d^{10}4s^24p^4$) con le interazioni biologiche annesse a zolfo, arsenico e fosforo, sono state comprese ampiamente da eminenti biochimici da ormai 4 decenni (Frost, 1972).

Il selenio, similmente allo zolfo, possiede diverse forme allotropiche, in natura è possibile osservare questo elemento nella sua forma monociclica (selenio rosso), una polvere amorfa, oppure nel suo stato cristallino di colore grigio, denominato “fiori di zolfo” (Conor, R. 2006). Quest’ultima forma vitrea rappresenta la conformazione più stabile alle alte temperature e la più comune tra le diverse allotropie del selenio.

Per le caratteristiche fisiche si osserva come questo elemento possieda proprietà elettriche uniche per un non-metallo. La sua conduttività, bassa in assenza di luce, incrementa in modo esponenziale se esposto alle sorgenti luminose, generando piccole correnti elettriche, aspetto che gli attribuisce capacità semiconduttrice infatti è ampiamente sfruttato a livello industriale per le asimmetrie di conduttività capaci di indirizzare il flusso elettrico in una specifica direzione (Conor, R. 2006). Il selenio possiede un punto di ebollizione relativamente basso di 685°C ; questo aspetto, in seguito alle produzioni industriali con tecnologie inerenti l’uso del calore, può determinare un inquinamento atmosferico sia per il selenio elementare che per i composti più complessi in cui è riscontrata la sua presenza (Crystal, 1973). Tuttavia, sotto il punto di ebollizione, l’elemento selenio è molto stabile ed altamente insolubile. Queste proprietà sono molto importanti dal punto di vista ambientale in quanto i composti organici del selenio possono essere convertiti, in condizioni riduttive, a selenio elementare diventando non disponibile nel trofismo della flora. Questo processo rappresenta un metodo per la riduzione dell’inquinamento ambientale da parte del selenio (WHO, 1987).

Esistono quattro diversi stati ossidativi per il selenio: 0 (Se, elementare), -2 (Na_2Se , sodio seleniuro), +4 (Na_2SeO_3 , sodio selenite o selenito di sodio), +6 (Na_2SeO_4 , selenato di sodio). Lo stato -2 è la forma più comunemente coinvolta nella maggior parte dei composti organici ed inorganici con presenza di selenio (Tab. 9). In questo stato il selenio può formare composti metallici e non metallici

come FeSe, Al₃Se₂, Na₂Se, e H₂Se. Molti di questi elementi si decompongono in acqua o in acidi diluiti per formare infine l'idrogeno seleniato (H₂Se), un gas incolore dall'elevata tossicità (Ujang Tinggi, 2005). In molti modi, i composti organici del selenio e i rispettivi composti con base zolfo possono rimpiazzare lo zolfo nella cisteina e nella metionina per formare seleniocisteina e seleniometionina (Ujang Tinggi, 2005). Tuttavia, ci sono delle differenze fra questi due elementi, selenio e zolfo, dove i selenoli (composti chimici caratterizzati dalla presenza di selenio e di un tiolo, R-SeH, pK_a=5,2) sono acidi forti rispetto ai semplici tioli (R-SH, pK_a=8.3) (Ujang Tinggi, 2005). Inoltre, i selenoli sono prontamente dissociabili a pH fisiologico, potendo così svolgere un importante ruolo catalizzatore, mentre i tioli sono per lo più indissociabili (Ursini e Bindoli, 1987). Diversi composti al selenio naturalmente presenti in natura si possono osservare in tabella 9:

Compound	Formula
Selenite	SeO ₃ ²⁻
Selenate	SeO ₄ ²⁻
Selenomethionine	CH ₃ -Se-CH ₂ CH ₂ CH(NH ₂)COOH
Selenocysteine	HSe-CH ₂ CH(NH ₂)COOH
Selenocystathionine	HOOC(NH ₂)CHCH ₂ -Se-CH ₂ CH ₂ CH(NH ₂)COOH
Selenocystine	HOOC(NH ₂)CHCH ₂ -Se-Se-CH ₂ CH(NH ₂)COOH
Se-methylselenocysteine	CH ₃ -Se-CH ₂ CH(NH ₂)COOH
γ-Glutamyl-Se-methylselenocysteine	CH ₃ -Se-CH ₂ (COOH)CH-NH-CO-CH ₂ CH ₂ CH(NH ₂)COOH
Methylselenol	CH ₃ -SeH
Dimethylselenide	CH ₃ -Se-CH ₃
Trimethylselenonium ion	(CH ₃) ₃ -Se ⁺

Tabella 9: Composti organici e inorganici del selenio presenti in natura (Ujang Tinggi, 2005).

2.3 Selenio nell'ambiente

Il selenio riveste un ruolo importante nella salute dell'uomo e della fauna, inoltre presenta un'importanza simile per altri organismi come batteri e alghe (Alina Kabata-Pendias, 2007). Nell'ambiente, tuttavia, vi sono diverse preoccupazioni per le deficienze e le tossicità che il selenio può indurre.

Dal 1983 le dinamiche di sviluppo delle ricerche scientifiche in entrambe le malnutrizioni, deficit o eccessi, arrivano a comprendere i diversi cicli biologici (Fig.12) del selenio e le proprietà salutistiche per umani ed animali. Il selenio è largamente distribuito, sebbene in modo discontinuo, sulla superficie della crosta terrestre. In ordine di abbondanza, questo elemento rappresenta, circa, il 70iesimo per abbondanza.

La concentrazione del selenio nella crosta terrestre è compresa comunemente tra il 0.05 e 0.5 mg/kg. Tuttavia, questo quantitativo è leggermente più concentrato nelle rocce femiche (o mafiche, associazione delle parole *ferro* e *magnesio*: indica quei componenti minerali nelle rocce magnetiche che sono ricchi di composti di questi elementi) raramente eccede i 0.1 mg/kg.

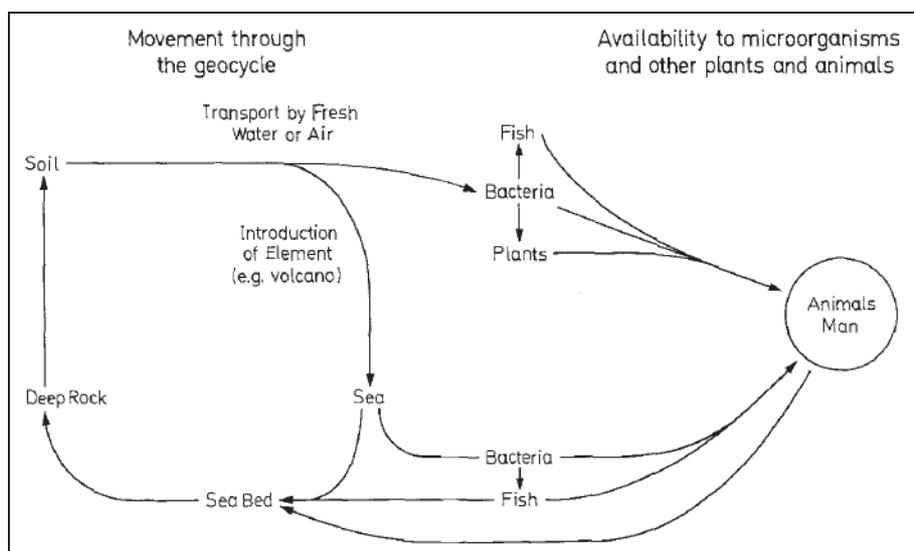


Figura 12: Le diverse interazioni ambientali del selenio attraverso i geocicli (Wood, 1975).

Tuttavia, alcune rocce sedimentarie non formate in epoca vulcanica sono comunque ricche in selenio, probabilmente a causa delle normali attività atmosferiche (Alina Kabata-Pendias, 2007). Elevate concentrazioni di selenio si riscontrano in rocce del cretaceo con valori che superano i 100 mg/kg, condizioni scaturite dai gas vulcanici e dalle polveri sedimentate grazie alle piogge nell'era cretacea. Casi di spiccato rilievo (al di sopra dei 1200 mg/kg) si osservano nelle rocce derivate da materiali selenio ferrosi come scisti rocciose, arenarie, calcarie,

ardesie e carboni (Fordyce F., 2005). Terreni ricchi in selenio sono diffusi negli Stati Uniti, Canada, Sud America, China e Russia (Fairweather S.J. *et al.*, 2011) e Irlanda (Fleming, 1962). Nel 2004, Plant *et al.*, registrò la più alta concentrazione di selenio, 6500 mg/kg nei territori cinesi, esattamente presso alcune miniere di carbone.

Nei suoi diversi stati ossidativi, fatta eccezione per la valenza -2 (predominante nei composti organici), il comportamento del Se a livello geochimico è legato a quello dello zolfo, elemento più abbondante rispetto al selenio. In quest'ambito il selenio mostra diverse proprietà, come calcofilia e siderofilia. Questi effetti, nel loro complesso comportamento geochimico, sono il risultato delle variazioni del suo stato ossidativo (Alina Kabata-Pendias, 2007). Comunemente le specie selenite (Se^{+4}) e selenato (Se^{+6}) sono le più comuni nel suolo, presentano una mancata formazione a livello geologico di composti stabili e si riscontrano sotto forma di minerali, in particolar modo quelli argillosi, e, dagli ossidi e idrossidi del ferro e del manganese. Approssimativamente in natura sono conosciuti 60 minerali comprendenti il selenio (Conor, R. 2006).

Il comportamento del selenio nel suolo, grazie alle numerose sperimentazioni passate, è caratterizzato dall'influenza dei parametri di acidità (pH) e dal potenziale redox (Eh) che ne influenzano la forma chimica del selenio nel terreno. Tuttavia, altri parametri influenti sono da ricercare nei diversi ligandi organici, suoli argillosi, ossidi e idrossidi (Alina Kabata-Pendias, 2007). La mobilitazione del selenio è influenzata direttamente dal pH. Condizioni alcaline favoriscono la conversione del selenio inorganico (Se^0) in selenato (Se^{+6}), mentre in condizioni acide è favorita la conversione a selenite (Se^{+4}) assorbito dalle argille, fissata fortemente dagli idrossidi di ferro (Combs G.F., 2001). La mobilitazione e il suo contenuto nel suolo stanno ricevendo una grande attenzione dal mondo accademico, specialmente nei Paesi dove è conclamata la malnutrizione per questo minerale traccia, sia per l'alimentazione umana che animale. Un esempio attivo nel migliorare le condizioni di salute è stato condotto in Finlandia nel 1984. E' il programma di incremento delle concentrazioni nel suolo tramite fertilizzazione con selenio inorganico (sodio selenite) fino a valori tra i 6 e 10

mg/kg con picchi di 15 mg/kg migliorandone la frazione solubile dopo 3 mesi dalla fertilizzazione (Vuori *et al.*, 1994).

Il selenio è naturalmente emesso nell'atmosfera terrestre tramite dei composti alchilici (dimetil selenide e dimetil diselenide). Questi composti sono rilasciati principalmente dall'evaporazione delle acque marine, dalle eruzioni vulcaniche e dalle emissioni industriali, inoltre si riscontrano emissioni anche dal suolo, liquami e sedimenti come risultato delle attività fungine o microbiche. La concentrazione media del selenio nell'aria è di 0,2 ng/m³ di aria, ma il valore può raggiungere livelli di 4.0 ng/m³ se ci si trova in territori inquinati (Reimann e Cariat., 1998). Anche la flora influenza l'emissione del selenio nell'atmosfera, tanto che Terry e Zayed (1994), riportano le attività di colture specifiche di riso che possono rilasciare circa 1500µg Se/kg al giorno su base del peso secco. Nelle acque il selenio è presente in basse concentrazioni, di solito al di sotto di 1 µg/l per le acque potabili. Nelle acque marine si riscontrano livelli fino a 10 volte inferiori, invece, presso le rive di fiumi il cui percorso avviene presso territori selenio ferrosi, le concentrazioni di selenio risultano elevate, al di sopra di 1000 µg/l (Elkin, 1980).

Per quel che concerne il mondo vegetale, il contenuto di selenio per molte piante è correlato linearmente alla presenza del selenio nel suolo. Sebbene non venga considerato un nutriente essenziale per le piante (Terry *et al.*, 2000), la privazione del selenio nelle colture porta ad un calo nello sviluppo delle piantagioni come: riso (Zhou, 1990) e grano (Peng *et al.*, 2000).

Nel mondo si riscontrano vegetali con bassi contenuti di selenio, circa 25 µg/kg, eccedendo oltre i 100 µg/kg e raramente con livelli ben al di sopra dei 1000 µg/mg (Alina Kabata-Pendias, 2007). Questi variazioni dipendono da diversi fattori come il clima, parametri del suolo e capacità di accumulare selenio negli apparati vegetativi. L'umidità del suolo in condizioni di basse precipitazioni e bassa lisciviazione del suolo determina una maggiore disponibilità del selenio per le piante. Ciò significa che la disponibilità del Se nel suolo può essere influenzata da una gestione idrica con procedure come l'irrigazione, aerazione, calcinazione limitando in questo modo la fertilizzazione del terreno (Gissel-Nielsen, 1998).

Quando presente in forma solubile, il selenio è rapidamente assorbito, sebbene ci siano differenze anche molto pronunciate tra le varie specie vegetali (Ellis e Salt, 2003) (Tab. 9).

Plant and food item	Range ^a	Average
Food plants		
Carrot	6 – 29	17
Potatoes	4 – 23	13
Cauliflower	0 – 103	9
Tomato	0 – 19	2
Onion, bulbs	0 – 39	6
Green beans	0 – 13	1
Apple	3 – 6	4
Orange	0 – 12	1
Strawberries	0 – 12	3

Tabella 9: Differenti contenuti di selenio in diverse specie vegetali, valori espressi in $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ATSDR, 2002b).

Il contenuto di selenio nelle colture alimentari è importante per comprendere l'apporto nel livello nutrizionale, aspetto che sta ricevendo una attenzione sempre maggiore nella catena alimentare delle diverse nazioni nel mondo (Tab. 10).

Food	UK	USA	Australia	Ireland	Thailand	New Zealand
Bread	43–92	282–366	92.6–125	15–158	–	31.6–59.4
Rice	4–13	75	25	10–17	29–65	0
Beef	30–76	134–190	72–121	61–105	72–226	22.3–83
Pork	140	144–450	94–205	82–129	142–250	19.3–150
Chicken	60–70	190–276	116–280	86–147	156–271	137–145
Eggs	90–120	225–308	190–414	56–282	145–420	157–161
Fish	200–500	126–502	20–632	268–298	196–1137	195–512
Milk	10–15	20–21	2.5–25.9	14–22	19–36	1.0–14
Cheese	7.4–12	13.9	70–78.9	9.5–11.5	–	23
Vegetables	3–22	2–19	0.5–32	10–38	1–127	0–2.5
Mushrooms	90	88	255	25–38	8–15	76.6
Peanuts	30	75	140	–	32–186	46–105

Tabella 10: Livelli di selenio negli alimenti di diversi Paesi, valori espressi in $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Conor, R. 2006).

I cereali, una delle più importanti fonti alimentari per il selenio, contengono da 100 a 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di peso fresco di questo elemento. Per esempio, i cereali integrali

contengono più di 2 mg Se/kg (peso secco) se prodotti in USA, rispetto agli 0,11 mg Se/kg (peso secco) se prodotti in Nuova Zelanda e solo 0,005 mg Se/kg (peso secco) se prodotti in Cina (provincia dello Shaanxi) (Combs, 1986a). Ironicamente, su scala mondiale, le colture con il più basso e più alto contenuto di selenio si trovano in Cina, rispettivamente nelle provincie dello Shaanxi/ Sichuan e Hubei. Come per la fertilizzazione al selenio attuata nel 1984 in Finlandia, Gumpata e Gumpata, (2000) riportano una sperimentazione dove l'aggiunta di selenio nel suolo (10 g/ettaro) incrementa il contenuto del minerale traccia in orzo e avena rispettivamente: da 19 a 260 µg/kg ; da 32 a 440 µg/kg. In generale la concentrazione media di selenio nei grani è elevata nei territori a clima arido e in quelli con climi umidi.

2.4 Selenio negli alimenti

A livello alimentare, l'ammontare del selenio nella dieta dipende dal luogo di coltivazione delle colture, in relazione tuttavia alle diverse capacità di accumulo degli apparati vegetativi (Streit e Stumm, 1993). L'apporto del selenio nel settore zootecnico è dato dal foraggio utilizzato per l'alimentazione e soprattutto dai quantitativi alimentari nella dieta degli animali. Un esempio dei diversi contenuti in selenio negli alimenti trasformati è osservabile in tabella 11 :

Food items	Range ^a	Average
Bread, whole wheat	280 – 670	40
Bread, white	230 – 540	320
Rye bread	155 – 400	260
Corn flakes	26 – 120	63
Potato chips	0 – 27	26
Egg noodles, cooked	140 – 420	190
Cottage cheese	52 – 68	60
Chicken, cooked	170 – 260	210
Beef, cooked	190 – 510	260
Pork, ham	190 – 510	330
Salmon, canned	310 – 1490	750
Shrimp, canned	210 – 1610	640
Brazil nuts	200 – 253 000	14 700
Brazil nuts ^b	70 710 – 87 320	–
Coconut ^b	405 – 678	–

Tabella 11: Differenti contenuti in comuni alimenti trasformati, valori espressi in µg/kg (ATSDR, 2002b).

Gli effetti sulla biodisponibilità delle diverse specie di selenio e relative statistiche sono state dimostrate recentemente (Fairweather-Tait S.J. *et al.*, 2010 e Fairweather-Tait S.J. *et al.*, 2011). I principali gruppi alimentari che provvedono all'apporto di selenio nella popolazione umana sono rappresentati da pane e cereali, carne, pesce, uova e prodotti lattiero caseari come il latte.

Come riportato dalla UK Food Standards Agency (2006), le diverse percentuali degli alimenti che consentono l'apporto giornaliero di selenio sono (Fig. 13):

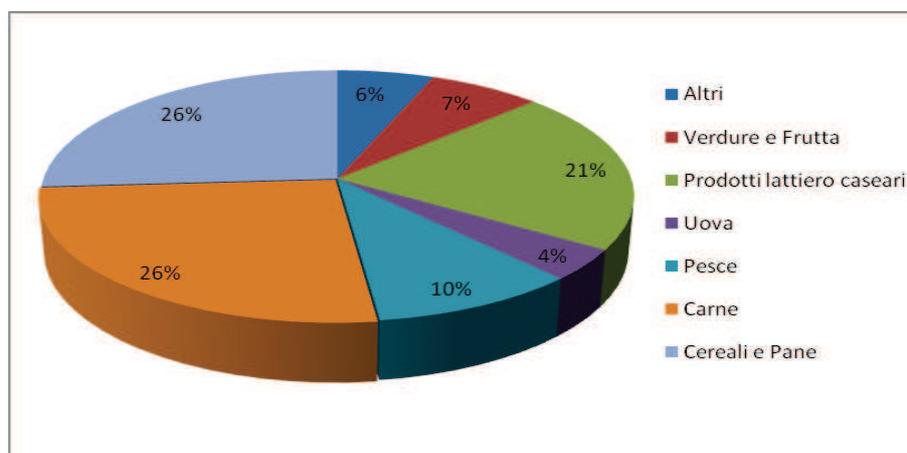


Figura 13: Contributo di ogni classe alimentare all'apporto di selenio nella popolazione britannica (Food Standards Agency, 2006).

Per il comparto di cereali e pane l'apporto di selenio si aggira intorno alle 0,001-30 mg/kg (Rayman, MP, 2008). Nella media, cereali e pane provvedono ad un quarto della dieta, soprattutto per le popolazioni dell'est, in quanto, sebbene non contengono grandi quantitativi, sono significativamente consumati. Le specie predominanti di questo apporto sono seleniometionina (circa un 55 – 85%), selenio-cisteina (circa dal 4 – 12%) e selenite/selenato di (circa dal 12 – 19%) (Whanger PD, 2002). La dominanza degli alimenti a base di cereali per l'elemento selenio si riscontra in molti Paesi, ciò è dipendente da diversi fattori: raccolta cereali, prezzo internazionale dei cereali, politiche commerciali etc. Dal 1980, nel Regno Unito l'apporto di selenio tramite prodotti cerealicoli apportava il 47%, mentre, 10 anni dopo, questo valore si aggirava sul 20% (Barclay *et al.*, 1995). Diverse investigazioni hanno scoperto che le politiche economiche di quei decenni, riducendo l'importazione dei cereali del Nord America a favore del consumo interno delle

colture prodotte in Europa, hanno causato questo calo negli apporti di selenio (MacPherson *et al.*, 1997; Rayman, 1997; Zimmleri *et al.*, 1998).

Per i prodotti animali (carne, pesce e uova) il contenuto di selenio dipende da diversi fattori trofici e genetici. Per molte popolazioni, la carne rappresenta la principale risorsa per l'apporto di selenio nella dieta, specialmente nel nord Europa ed America (Koutnik and Ingr., 1998). In Irlanda, carni e prodotti derivati contribuiscono per il 30% al fabbisogno di selenio, mentre cereali e pani derivati apportano sino al 24% (Murphy *et al.*, 2002). Le interiora contengono elevati quantitativi di selenio in particolare: reni, fegato e altri (tessuti del cuore nei manzi) sono ricchi di questo elemento con livelli che vanno da 1,45 µg/kg nel rene di maiale, a 0,14 µg/kg sul totale della carne dell'animale stesso (British Nutrition Foundation, 2001). Ci sono differenze nei livelli di selenio in differenti tipologie di carni e relativi tagli muscolari, con alti livelli nelle carni di maiale rispetto a quelle di manzo, agnello e pollo. Le specie predominanti nelle porzioni edibili possono essere: seleniometionina (~50-60% sul totale delle specie estraibili di selenio) e seleniocisteina (~20-30% e ~50% sul totale di selenio estraibile su pollo e agnello, rispettivamente) (Bierla K *et al.*, 2008). Il contenuto di selenio riflette l'apporto nutrizionale indotto durante l'alimentazione zootecnica e queste differenze sono da attribuirsi alle condizioni di allevamento, nonché al contenuto di selenio nei mangimi e alla loro origine territoriale.

Il contenuto di selenio nel pesce è compreso tra 0,1 mg/kg e 5,0 mg/kg (Fairweather-Tait S.J. *et al.*, 2010; Rayman MP *et al.*, 2008). Diverse specie ittiche marine possiedono elevati quantitativi di selenio, per esempio il merluzzo, lo squalo e il tonno in scatola, che contengono rispettivamente: 1,5, 2,0 e 5,6 mg/kg (Fairweather-Tait S.J. *et al.*, 2010). La principale forma di selenio presente nel pesce è la seleniometionina con contenuti che spaziano dal 29% al 70% e in minor quantità le specie inorganiche di selenito e selenato, in un range dal 12 al 45% (Fairweather-Tait S.J. *et al.*, 2010). Anche per il settore ittico si denota un contenuto quali/quantitativo delle specie di selenio differente tra i profili delle diverse specie marine.

Nel comparto degli ovoprodotti si osservano contenuti di selenio che spaziano tra 3 e 25 µg/kg di selenio per uovo intero (Lipiec E *et al.*, 2010). Lubus *et al.*,(2010) hanno evidenziato come la supplementazione di selenio nella dieta della galline ovaiole possa incrementare il contenuto di selenio fino a 0,34-0,58 mg/kg. La principale specie di selenio riscontrabile nelle uova è la seleniocisteina, seguita da seleniometionina, con una concentrazione che supera il 50% del selenio totale nell'uovo. Uova ad alto contenuto di selenio sono prodotte in buona parte del mondo (Fisinin V.I. *et al.*, 2009).

Per i prodotti lattiero caseari, il contenuto di selenio varia in relazione alle condizioni di allevamento e tipologia di mangimi, e, come per le carni, il contenuto di selenio in questi prodotti è specie-dipendente. I maggiori composti con selenio presenti in questi prodotti sono: seleniocisteina, seleniometionina e selenite (Muniz-Naveiro O *et al.*, 2007).

Frutta e verdura, tipicamente, contengono bassi quantitativi di selenio. Nei prodotti vegetali non arricchiti nelle coltivazioni con selenio, la specie che detiene il maggior quantitativo di selenio è la cipolla (Kotrebai M *et al.*, 2000) seguita dall'aglio (Kotrebai M *et al.*, 2000). Certi tipologie vegetali, come cipolle, aglio e broccoli quando cresciute su terreni ricchi o arricchiti di selenio possono accumulare questo elemento in un range di concentrazioni da 0.5 mg/kg fino a 140- 300 mg/kg. Questi vegetali, durante la coltivazione, possono accumulare le diverse forme organiche ed inorganiche di selenio (Kotrebai M *et al.*, 2000) in relazione al livello di arricchimento del suolo. Queste metodiche agronomiche sono di grande interesse oggi, in quanto i vegetali così prodotti possiedono una maggiore attività contro il cancro se si comparano le quantità e le diverse forme di selenio accumulate rispetto ad altre (Finley JW, 2005).

Per meglio comprendere la distribuzione del selenio tra le diverse categorie alimentari citate, Fairweather-Tait S.J. *et al.*,(2011) riporta un'elaborazione di studi sulle concentrazioni e tipologie di selenio negli alimenti (Fig. 14):

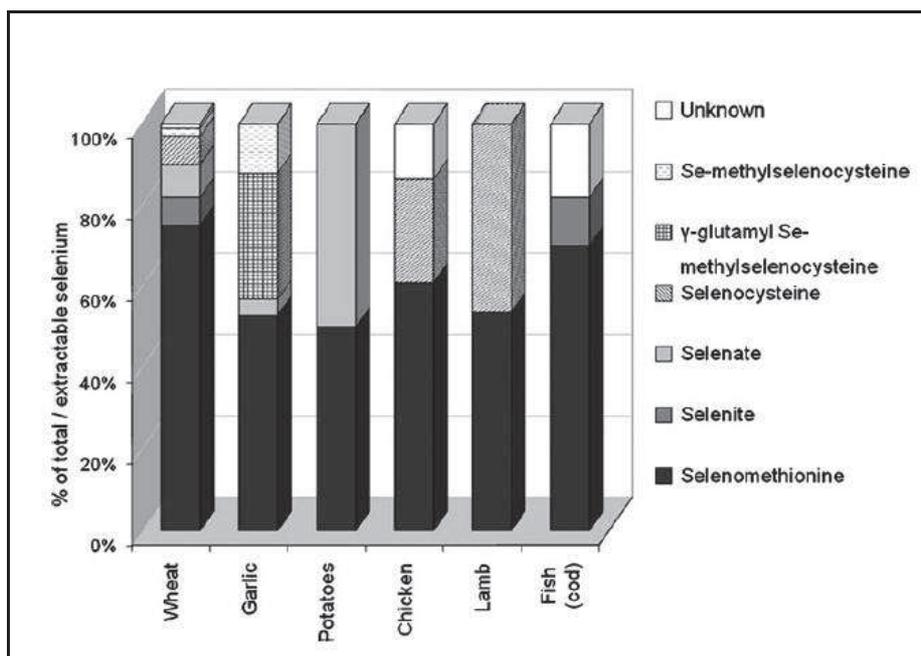


Figura 14: Diverse specie di selenio presenti in alimenti non arricchiti, divisi sulla percentuale di contribuzione al selenio totale estraibile (Fairweather-Tait S.J. *et al.*, 2011).

2.5 Incremento del selenio nel sistema alimentare

Nel mondo, diversi sistemi alimentari non consentono di provvedere alle razioni raccomandate di selenio al fine di garantire un efficiente status fisiologico connesso a questo elemento. Questo deficit, presente in molte popolazioni, purtroppo, determina una ridotta attività dei sistemi di difesa verso gli stress ossidativi, aspetto che può incrementare i rischi verso varie malattie croniche (cuore e polmoni) ed anche il cancro.

Sebbene in Cina l'eterogeneità del selenio nel sottosuolo crei delle disomogeneità nell'apporto di selenio nella popolazione, si stima che ben oltre 400 milioni di persone soffrano per carenze di selenio (Combs G.F., 2001). Per ridurre questi rischi il sistema alimentare dovrebbe provvedere ad almeno 40 µg/die (per adulti). Gli studi di Clark *et al.*, (1996, 1998) suggeriscono che per la prevenzione del cancro bisognerebbe raggiungere valori di 200 - 300 µg/die. Nel 1984, l'utilizzo dei fertilizzanti al selenio su scala nazionale in Finlandia permise un drammatico incremento del contenuto di selenio in molti alimenti (soprattutto vegetali), permettendo di aumentare il contenuto dei composti connessi al selenio di ben 4 volte

(Mäkelä *et al.*, 1993). Questo metodo di fertilizzazione può prevenire la deficienza di selenio in zootecnia portando alla produzione di carni di alta qualità) e prodotti derivati (latte, uova o prodotti trasformati) ad alto contenuto di selenio. Altresì, questi fini possono essere ottenuti attraverso l'uso di integratori al selenio nel mangime.

In risposta alla necessità di sostenere al meglio la salute umana, l'elemento selenio è diventato una risorsa per lo sviluppo di alimenti funzionali (Reilly, 1998). Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi alimenti arricchiti al selenio. In Europa, le specie di selenio consentite negli alimenti arricchiti per particolari alimentazioni, tra cui bambini in lattazione artificiale e l'alimentazione parenterale (forma non fisiologica di alimentazione), sono selenato di sodio, selenito di sodio e sodio idrogeno selenite (Flynn A *et al.*, 2009). Come riportato da Combs G.F (2001) è possibile distinguere prodotti arricchiti al selenio come: sale da tavola, margarina, cereali da prima colazione e diverse bevande. Per gli alimenti arricchiti al selenio con diverse tecniche di fertilizzazione del suolo, o con alimentazione zootecnica in caso di bestiame, è possibile trovare: cavoletti di Bruxelles, broccoli, cavoli, aglio, cipolle, sedano, menta, camomilla, thè, aceto, birra, lieviti, funghi, cozze e carni di alta qualità.

Gli sforzi per ottimizzare il contenuto di selenio negli alimenti dovrebbero tenere in considerazione le diverse forme chimiche e l'ammontare dell'elemento fornito. Selenite e selenato possono essere sì efficaci come integratori nei mangimi per prevenire la carenza di selenio nel bestiame, tuttavia quelle forme hanno un impatto piuttosto limitato sui contenuti di selenio in carne, latte e uova perché ciascuna di queste due forme inorganiche può essere mantenuta solo se incorporata nelle proteine (come seleniometionina e seleniocisteina). Maggiori livelli di selenio nei tessuti cellulari possono essere raggiunti utilizzando direttamente fonti di selenio organico. La via dei selenio aminoacidi è sfruttata per incorporare questo minerale nella sintesi generale delle proteine tissutali. Le piante possono utilizzare sia la selenite o il selenato per sintetizzare i composti organici di selenio, ciascuno dei quali può incorporare in modo non specifico proteine nelle parti edibili (Stadtman, 1996). Le colture alimentari con il maggior potenziale di accumulo del se-

lenio sarebbero quelle che naturalmente contengono grandi quantità di zolfo amminoacidi, ad esempio gli aglio e cavoli.

Per i procarioti, si osserva come i LAB possano prendere ossidi inorganici del selenio e trasformarli in selenio amminoacidi (Calomme *et al.*, 1995a,b). Diversi studi sui prodotti del lievito arricchito al selenio sono di particolare importanza in quanto tali forme di selenio presentano una particolare efficacia nel ridurre il rischio di cancro se consumati nella normale nutrizione (Clark *et al.*, 1996). La seleniometionina sembra comprendere almeno il 65% del totale Se nei lieviti prodotti. La restante parte comprende la seleniocisteina, che come la prima viene metabolizzata a H₂Se anti-cancerogena (Lü *et al.*, 1994), inoltre si osserva anche una minore quantità di Se-metilseleniocisteina, un precursore metabolico dalle proprietà anticarcinogeniche (Ip e Ganther, 1990/1993).

L'accettazione da parte dei consumatori di alimenti con maggiori quantitativi di selenio richiede numerosi sforzi al fine di aumentare al rilevanza sul mercato degli effetti che questo elemento ha sulla salute umana. Questa condizione per poter essere raggiunta, richiederà diverse informazioni scientifiche; che con le tecniche del marketing alimentare, potrebbe portare ad un naturale coinvolgimento dei consumatori agevolando la comprensione delle proprietà del selenio, con l'inclusione delle informazioni specifiche sulle etichette degli alimenti, e garantendo una definizione di procedure di controllo qualità per ridurre al minimo i rischi di sovraesposizione al selenio.

2.6 Fabbisogno, biodisponibilità e metabolismo del selenio

Nella vita quotidiana l'effettivo stato nutrizionale del selenio è di difficile comprensione in quanto molte variabili influenzano il contenuto di selenio nel corpo (meccanismi di escrezione, perdita di capelli, unghie), inoltre il contenuto di questo elemento negli alimenti non si presenta in modo costante e tutto ciò non consente una semplice valutazione dello stato nutrizionale. Stime sulle più idonee assunzioni sono state comprese tramite delle indagini dietetiche, tabelle di composizione alimentare e indagini di mercato, permettendo di raccomandare un apporto

giornaliero nel range di 40-55 µg/die (per adulto) con valori di TUIL (Tolerable Upper Intake Level, Livelli di assunzione massimi giornalieri tollerabili) e NOA-EL (No Observed Adverse Effect Level, Dose senza effetto avverso osservabile) di 400 e 800 µg/die rispettivamente. Dalle valutazioni della OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) e IPCS (International Programme on Chemical Safety) nel 2002 sono stati suddivisi i diversi apporti necessari di selenio sulla base di diverse fasce di età (Tab. 12):

Fasce	1980, DDI	1996, DRA	2000, DRA
Neonato	10 -- 60	6 -- 12	15 -- 20
Bambino			
< 10 anni	20 -- 200	20 -- 25	20 -- 40
> 10 anni	50 -- 200	30 -- 36	40 -- 55
Adulto (>14 anni)			
Maschio	50 -- 200	40	40 -- 55
Femmina	50 -- 200	30	55
Donne			
Gestazione	65	60	70
Lattazione			70

Tabella 12: Apporto di selenio raccomandati, valori espressi in µg/die (Alina Kabata-Pendias, 2007).

Nel mondo l'apporto di selenio presenta un'eterogeneità conclamata tra i diversi continenti e nelle stesse nazioni interne. Come si è osservato nell'articolo di Fairweather-Tait S.J. *et al.*, (2011) (Fig. 15) gli apporti giornalieri di selenio sono differenti da nazione a nazione e, per Regno Unito, Danimarca, Olanda ed Italia, le differenze si denotano anche tra l'uomo e la donna. Inoltre i dati presentati da Combs G.F. (2001) indicano che nei Paesi Europei, in media, l'apporto di selenio si aggira nel range tra 11 e 95 µg/die e tra i 60 e 350 µg/die, in altri Paesi nel mondo (Canada, Venezuela, USA, Giappone e Grecia).

Per la Cina, l'eterogeneità del selenio nel suolo determina un apporto alquanto disomogeneo all'interno della popolazione, dove è possibile riscontrare un range di 7-11 µg/die, fattore che induce la malattia di Keshan oppure altre aree dove

l'elevato quantitativo di selenio nella dieta, dai 750 – 4990 µg/die, determina aspetti tossici come la selenosi.

Per meglio uniformare queste disuguaglianze nel deficit di selenio, esistono differenti formulazioni che includono più composti (come multivitaminici) o specifiche per singoli minerali. Secondo Fairweather-Tait S.J. *et al.*, (2011), il contributo degli integratori di selenio dovrebbe provvedere ad un aumento nell'apporto di selenio di 5-30 µg/die. Questa quota rappresenta solo una piccola parte dell'apporto totale in quanto la biodisponibilità dipende sia dalla forma chimica del selenio e dall'ammontare della quantità ingerita dall'individuo, nonché dalla concentrazione plasmatica del selenio.

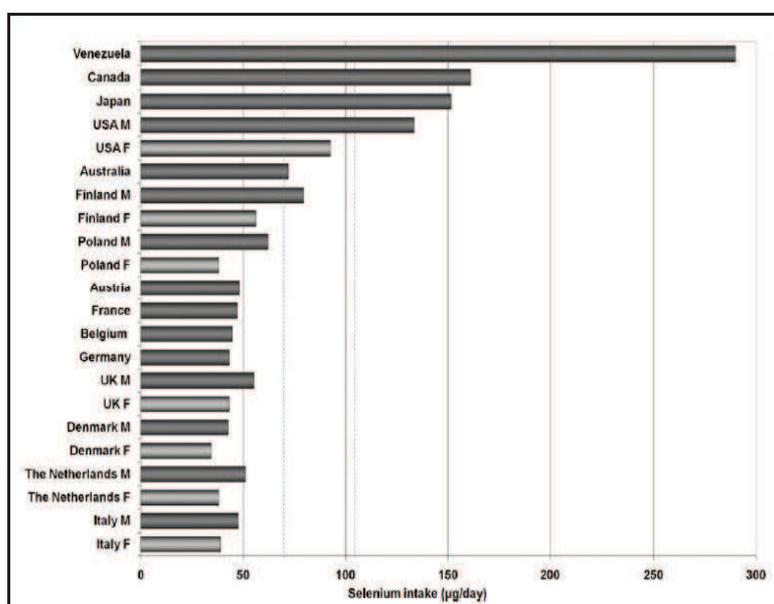


Figura 12: Variazioni nell'apporto di selenio fra diverse popolazioni nel mondo (Fairweather-Tait S.J. *et al.*, 2011).

La biodisponibilità dei nutrienti dipende dalla capacità degli stessi ad esercitare modifiche verso i diversi meccanismi fisiologici ed omeostatici che controllano il loro assorbimento e che successivamente potrebbero causare effetti positivi o negativi sulla salute (Stahl *et al.*, 2002). Il tasso di assorbimento del selenio e la sua biodisponibilità dipendono dalle sue forme chimiche (Fairweather-Tait S.J., 2011). Quelle organiche, come la seleniometionina, predominano negli alimenti e possie-

dono una maggiore velocità di assorbimento (dal 95 al 97%) rispetto alla selenite inorganica (dal 44 al 70%) (Whanger, 1998). Anche secondo Combs GF Jr & Combs SB, (1986a), di tutte le forme chimiche del selenio presenti in natura (nello specifico quelle alimentari) l'assorbimento del selenio nella sua forma organica presenta la migliore percentuale, circa un 70 – 95%. Mentre Bopp BA, (1982), considera irrilevante la forma chimica del selenio e il tasso di assorbimento per umani ed animali si aggira per ogni forma chimica intorno all'80%. Tuttavia, l'assorbimento può variare a seconda della digeribilità dei vari alimenti contenenti le selenio proteine. Per esempio, la seleniometionina entra come una proteina generica nel pool metabolico, imitando la normale metionina, ed è ben mantenuta; tuttavia, questo assorbimento si riduce se la concentrazione di metionina nella dieta è elevata. La biodisponibilità può anche essere influenzata dalle diverse forme proteiche: per esempio, la biodisponibilità di selenio in una dieta a base di pesce è inferiore rispetto ad una a base di manzo e cereali (Djujic, *et al.*, 2000). Il trattamento delle proteine con una fonte di calore causa la degradazione della struttura proteica e ne migliora la digeribilità, questo può facilitare il rilascio del selenio legato, con il successivo aumento della biodisponibilità (Ornsrud e Lorentzen, 2002). A livello metabolico, anche se esistono numerosi studi sul metabolismo del selenio nell'uomo, gli specifici processi biochimici non sono completamente caratterizzati. Negli studi su animali, il selenio viene assorbito nel tratto gastrointestinale (complessivamente un 80%, Boop BA, 1982) e trasportato al fegato, dove viene metabolizzato ad altre forme di composti selenio organici (Sunde, 1990). L'assorbimento, il trasporto e la distribuzione del selenio nell'organismo dipendono dalla sua forma chimica, dalla quantità ingerita e dalla sua interazione con altri componenti alimentari come vitamine A, E e C (Reilly, 1996). Durante la sintesi proteica, la seleniocisteina è incorporata nelle proteine in seguito all'azione di un codone specifico per seleniocisteina residua (Lee *et al.*, 1996). Le proteine che contengono residui di seleniocisteina sono riferite alle selenioproteine, che possono svolgere un ruolo funzionale fondamentale nelle reazioni redox come il centro attivo dei selenio enzimi (Suzuki e Ogra, 2002). A livello biochimico il selenio può essere metabolizzato seguendo due vie (Fig. 16):

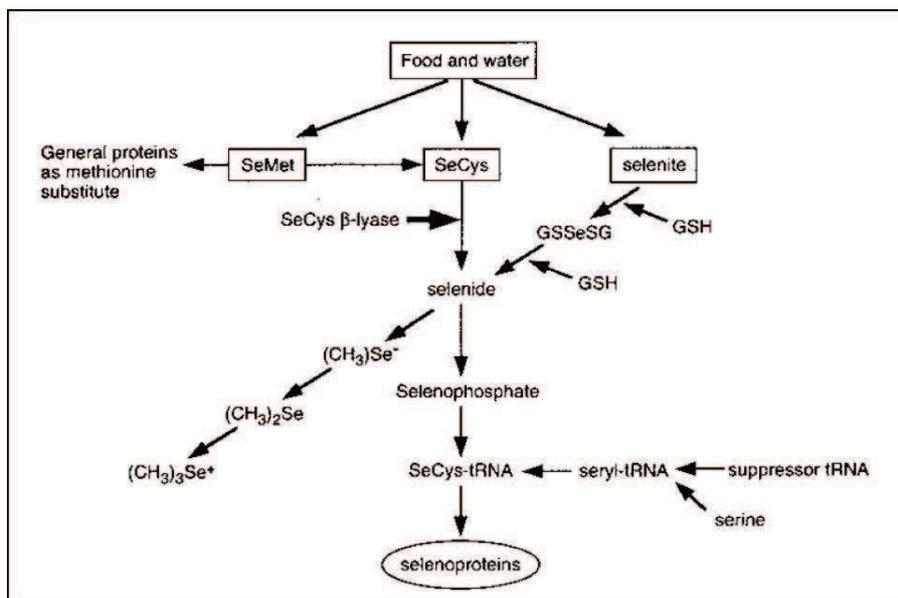


Figura 16: Via biochimica del selenio nel corpo umano (Himeno Seiichiro and Imura Nobumasa, 2002).

Il selenio assorbito a livello dell'intestino tenue e crasso è trasportato in modo attivo all'interno delle cellule. In relazione alla forma chimica si innescano diversi passaggi. La seleniometionina è convertita in seleniocisteina attraverso il percorso simile alla cistationina, lo stesso percorso che converte metionina in cisteina, poi a seleniuro dalla seleniocisteina β -liasi. Il secondo percorso per la seleniometionina è una incorporazione non specifica in proteine generali come sostituta della metionina in quanto il tRNA per la metionina non può distinguere metionina dall'omonima con selenio (McConnell KP, 1982). Il rapporto seleniometionina /seleniocisteina dipende dallo stato nutrizionale della metionina. I composti inorganici, come la selenite e il selenato, sono ridotti dalla glutazione (GSH) a seleniuro. Questo elemento è un importante intermedio del metabolismo del selenio non solo per la sintesi delle selenioproteine ma anche per le interazioni con altri metalli (zolfo).

La principale via di escrezione del Se è l'urina. L'escrezione fecale è trascurabile sia perché l'assorbimento intestinale di Se è alto che per la ridotta escrezione biliare. Quando apporti eccedenti di Se sono somministrati a agli animali, una parte di Se è eliminato dal corpo in forma di esalazioni volatili come dimetilselenide. Co-

me mostrato in Figura 16, il seleniuro viene metilato sequenzialmente a metilsele-
nolo (CH_3Se^-) e dimetilselenide ($(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$). La metilazione dei metaboliti del se-
lenio è importante non solo per l'escrezione, ma anche per l'attività anticarcinoge-
nica degli stessi.

Se dal seleniuro si passa alla via dei seleniofosfati si arriva, con l'azione della Se-
ril tRNA, alla sintesi delle selenioproteine.

Il Se è contenuto nelle catene polipeptidiche delle selenioproteine principalmente
nella forma di seleniocisteina, ma la caratteristica distintiva di queste selenio-
proteine, rispetto alle altre proteine legate a ioni metallici, è relativa al fatto che gli
ioni metallici sono legati alla proteina come un ligando e che la sintesi delle apo-
proteine precede l'incorporazione dei metalli nella proteina (TC Stadtman, 1996).
Il Se è incorporato nelle selenioproteine nel momento della traduzione cellulare
delle stesse. Il meccanismo di incorporazione della seleniocisteina nella catena
polipeptidica di selenioproteine è stato ampiamente studiato da Chambers *et al.*,
(1983) quando trovò che il codone per la seleniocisteina corrispondeva ad un co-
done stop "UGA". La figura 17 illustra il meccanismo di incorporazione della se-
leniocisteina nelle proteine dei mammiferi. Un tRNA soppressore specifico rico-
nosce il codone "UGA" e si carica di serina giocando un ruolo chiave nella sintesi
delle selenioproteine. L'OH della serina legato a questo tRNA soppressore viene
convertito in selenio idruro, formando così SeCys-tRNA.

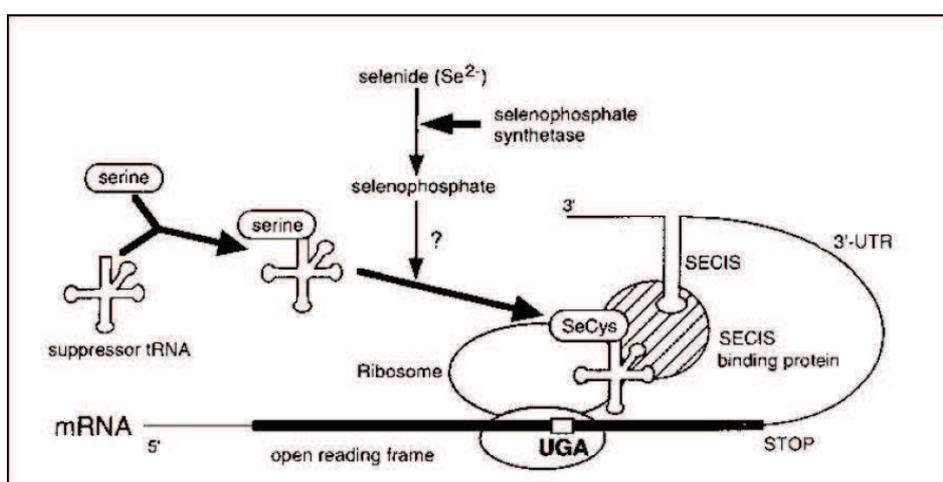


Figura 17: Possibili meccanismi di incorporazione della seleniocisteina nei mammiferi (Himeno
Seiichiro and Imura Nobumasa, 2002).

L'enzima responsabile di questa reazione è stato isolato e caratterizzato nei batteri (P Tormay, *et al.*, 1998), ma non ancora in mammiferi (Mizutani T *et al.*, 1992).

Tra tutte le selenioproteine si può riassumere il loro numero sulla base delle loro differenti funzioni (Tab.13):

Famiglia della glutazione perossidasi
GPxI (citotossica o classica)
GPxII
GPxIII
GPxIV
GPxVI
Famiglia della iodotironina deiodinasi
Tipo I (fegato e Rene tiroide)
Tipo II (cervello)
Tipo III
Tioredoxina reduttasi
Seleniofosfato sintetasi
Selenioproteina P
Selenioproteina W

Tabella 13: Selenioproteine presenti nei tessuti animali (Arienti, 2010).

Nella famiglia della glutazione per ossidasi, le diverse forme proteiche utilizzano degli equivalenti riducenti della glutazione per catabolizzare gli idroperossidi. Delle diverse glutazione perossidasi la, GPxI si trova in abbondanza a livello cellulare (Colon, Fegato, Linfociti e Tiroide). La GPxII, anch'essa cellulare, si riscontra prettamente a livello gastroenterico (Colon). La GPxIV differisce dalle altre glutazione perossidasi per la capacità di ridurre gli idroperossidi in acidi grassi esterificati come fosfolipidi. Le glutazione perossidasi mostrano una riduzione numerica in relazione al livello di deficienza del selenio, inoltre questo aspetto sembra essere maggiormente legato alla tipologia di enzima e alla sua ubicazione a livello organico (HeskethJ, 2008).

2.7 Malattie da carenza ed eccesso di selenio

Nel mondo, la grande variazione nell'assunzione di selenio, egregiamente riportata nell'operato di Combs Jr G. F. (2001) solleva alcuni dubbi sugli impatti salutistici, sia per assunzioni ridotte che elevate dell'elemento, in relazione alle concentrazioni di selenio nel suolo e alle abitudini alimentari delle popolazioni.

Tra le carenze, sono state attribuite al selenio due malattie da deficit con livelli endemici: una cardiomiopatia giovanile (malattia di Keshan) e una osteoartrite endemica (malattia di Kaschin-Beck).

La prima, originaria della Cina e scoperta nel 1935 nelle provincie dello Keshan e Heilongjiang, si tratta di una miocardite multifocale che si verifica soprattutto nei bambini e, in misura minore, nelle donne di età fertile. Essa si manifesta come una insufficienza acuta o cronica della funzione cardiaca con possibili dilatazione cardiaca ed aritmie (Combs G.F., 2001). Nelle aree in questione la concentrazione del selenio, sia nel suolo che nelle colture in esso coltivate, rispecchia valori molto bassi, inferiori ai 0,125 mg di Se/kg di cui solo il 2,5% è solubile (Tan *et al.*, 1987) e nei cereali il contenuto si aggira generalmente sui 0,040 mg di Se/kg. Le malattie da carenza di selenio associate o meno alle carenze di vitamina E nel bestiame (ad esempio la malattia del muscolo bianco tipica degli agnelli, o la cardiopatia "del gelso" nei suini) sono endemiche. Questi aspetti influenzano direttamente le concentrazioni di selenio a livello umano dove si riscontrano bassi valori nei tessuti di selenio (Combs G.F., 2001).

Per la Kaschin-Beck (una osteoartrite endemica, scoperta e descritta in Cina), l'instaurarsi della patologia avviene durante la preadolescenza o l'adolescenza, ed interessa la cartilagine epifisaria articolare e l'epifisi cartilaginea nell'accrescimento delle ossa. Tale malattia si manifesta con articolazioni ingrossate (soprattutto in mani, piedi e ginocchia) o con dita accorciate negli arti inferiori, e, in gravi casi, nanismo. Gli effetti positivi della supplementazione del selenio nella prevenzione terapeutica di questa patologia hanno dato risultati incoraggianti anche se non è chiaro se le carenze da selenio siano la causa primaria nell'insorgenza della malattia, constatando ampiamente come le gravi

carenze endemiche del selenio siano un fattore predisponente gli effetti negativi di altri agenti tossici, come gli acidi fulvici nelle acque potabili (Guo *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1999) e le micotossine tricoteceni negli alimenti (Xiong *et al.*, 1998).

Le diete con basso apporto proteico possono condizionare l'apporto di selenio in quanto questo minerale è legato prettamente negli alimenti a strutture proteiche come i selenio amminoacidi. Soggetti affetti dalla sindrome di kwashiorkor (o marasma infantile), in cui l'inadeguata assunzione di proteine permette di osservare carenze nutrizionali di selenio, aspetto osservato in Guatemala (Burk *et al.*, 1967), Marocco (Squali *et al.*, 1997) ed Egitto (Ashour *et al.*, 1999). I bambini malnutriti necessitano di un aumentato fabbisogno di selenio e di altri nutrienti ad azione antiossidante, per sopperire agli effetti pro-ossidanti indotti dalla malnutrizione e dalle infiammazioni (Squali *et al.*, 1997; Ashour *et al.*, 1999).

E' probabile che le carenze da selenio possano essere un fattore prevalente nell'insorgenza di altre malattie. Alcuni studi nell'Africa centrale hanno rilevato che la prevalenza delle malattie indotte da carenza di iodio, come il gozzo e l'ipotiroidismo, presentano cadenze maggiori tra le popolazioni con bassi livelli nutrizionali di selenio rispetto a quelle con un maggiore quantitativo nella dieta (Vanderpas *et al.*, 1993 e Thilly *et al.*, 1993). Bassi livelli di selenio sono stati collegati all'aumento del rischio di preeclampsia (Rayman *et al.*, 1996), aborti spontanei (Barrington *et al.*, 1996) e infertilità maschile (Vézina *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 1997). Inoltre è stato dimostrato che le gravi carenze di vitamina E possono aumentare i tassi di mutazione dell'RNA virus (Beck *et al.*, 1994 a, b; 1995; Beck, 1997), il che rende plausibile suggerire che la carenza di selenio può aumentare i rischi non solo per la Keshan ma anche di altri malattie causate da RNA virus (es. morbillo, influenza, epatite e AIDS).

Per quel che concerne le malattie da eccesso di selenio, l'esposizione per inalazione o ingestione causa diversi effetti sulla salute umana, specialmente degli apparati respiratori, neurologici, riproduttivi, immunologici e influisce sulle capacità di sviluppo (Ujang Tinggi, 2003). Nella letteratura scientifica solo pochi casi di esposizione ad elevati livelli di selenio sono stati accuratamente documentati. La natura di queste esposizioni è attribuita maggiormente alle

condizioni lavorative in ambito industriale di alcuni soggetti dove il selenio era presente in condizioni gassose ed assorbito per inalazione. Questi casi dimostrano che l'esposizione acuta di alti livelli di selenio possono produrre effetti sulla salute come l'ipotensione (risultante dalla vasodilatazione), stress respiratori e un odore agiaceo dell'alito. La selenosi cronica è stata identificata nel 1960 tra i residenti delle provincie dello Enshi e Hubei in Cina (Combs G.F., 2001) causata dalle elevate concentrazioni di selenio nell'ambiente locale e nelle coltivazioni derivate (Yang Zhou, 1994). I livelli di selenio nel suolo si aggiravano sugli 8 mg di Se/kg, ed il carbone (la cenere di cui era utilizzato per modificare il terreno) conteneva il più 84 g di Se/kg. Gli alimenti prodotti localmente contenevano la più alta concentrazioni di Se mai osservata, come per il mais con 6,33 mg Se/kg e il riso 1,48 mg Se/kg. Anche l'acqua, che attraversava le falde acquifere in concomitanza con dei giacimenti di carbone, conteneva concentrazioni insolitamente elevate di selenio (0,054 mg Se/l). La morbilità nella popolazione si aggirava sul 50%, quasi tutti i residenti mostravano i segni più comune per la selenosi quali perdite di capelli ed unghie. Alcuni, inoltre, con lesioni cutanee (ad esempio eritema, edema, eruzioni, prurito intenso), epatomegalia e polinevrite (es. anestesia periferica, dolore alle estremità, convulsioni, paralisi e emiplegia) e disturbi gastrointestinali (Combs G.F., 2001).

Capitolo 3: Selenio e batteri lattici interazioni nell'impasto acido

Le politiche agricole Europee instaurate nel 1970, a favore del maggior consumo delle coltivazioni nostrane a discapito delle importazioni estere (Nord America e Canada), ridussero l'import dal ~50% (1970) a meno del 10% (1995) e ciò determinò un deficit nei livelli nutrizionali di selenio nelle popolazioni europee in quanto le colture cerealicole prodotte nei territori del nord America possedevano rilevanti quantitativi di selenio nel suolo mentre in Europa non si riscontrava nessuna analogia culturale. In Inghilterra, nel 1970, l'uptake di selenio si aggirava sui 60 µg/die mentre nel 1997 il valore si attestava intorno ai 29-39 µg/die ed attualmente si osservano valori di 48-58 µg/die (Food Standards Agency, 2009; Hurst *et al.*, 2010; Sunde, Paterson, Evenson, Barnes, & Lovegrove, 2008).

La supplementazione del selenio tramite fertilizzazione del suolo (Es: Finlandia nel 1984), sta divenendo sempre più popolare per la maggiore domanda nutrizionale e per gli attributi chemio preventivi derivati (Shu Kai Xia *et al.*, 2007). Diversi prodotti alimentari sono stati sviluppati negli ultimi anni, dai consueti integratori in "pillole" alle diverse varietà di prodotti naturali e biologici con alte concentrazioni di selenio come: lieviti, grano, frutta e verdura (pomodori, broccoli, cipolle e aglio) coltivati in terreni ricchi di selenio nel suolo (Suhajda, A *et al.*, 2000). Queste tipologie di alimenti giocano un ruolo centrale nella selezione del microbiota intestinale. Un recente studio ha dimostrato un interessante effetto nello status fisiologico del selenio sulla composizione del microbiota intestinale nei topi (Kasaikina *et al.*, 2011). Gli autori hanno evidenziato una maggiore diversità nella flora batterica intestinale, in particolare, una correlazione tra la supplementazione del selenio nella dieta e i *Parabacteroides* del genere della *Bacteroidetes* phylum. Mostrando anche un modesto aumento dei clostridi nel microbiota.

Le tendenze alimentari di epoca moderna rivolgono parte delle attenzioni al benessere gastrointestinale, dove i batteri gastrointestinali (*Lactobacillus* e

Bifidobacterium) svolgono, in simbiosi, molti importanti ruoli nella prevenzione delle malattie e nel mantenere un buono status di salute. Cambiamenti nella dieta possono alterare la sua composizione. Per meglio contrastare sofisticazioni del microbiota, il consumo di prebiotici e probiotici è consigliato per mantenere equilibrata e dinamica attività intestinale, prevenendo infezioni, disordini metabolici, infiammazioni e neoplasie (Lamberti *et al.*, 2011).

I batteri lattici presenti in molte preparazioni fermentate in ambito casalingo o industriale (yogurt, salami, formaggi, verdure fermentate: olive, sottaceti e crauti etc) mostrano nel loro costante consumo ampi effetti fisiologici (antimicrobico, immunomodulante, antitumorale, antidiarroico, anallergico e antiossidante) (Jay, J. M, 1996 ; Saxelin, M *et al.*, 2005). Un nuovo approccio utilizza la tipologia dei probiotici come vettori nutraceutici per migliorare l'assunzione di alcuni micronutrienti. Alzate *et al.*,(2008) evidenzia come alcuni ceppi di *Lactobacillus* possiedano capacità specifiche nella produzione di metallo-proteine e peptidi (Lamberti *et al.*, 2011). Già nel 1995, Calomme *et al.*, (1995) scoprì che varie specie di *Lactobacillus* possono concentrare del Se dall'ambiente intracellulare, resistendo ad alte concentrazioni di selenio (Alzate *et al.*, 2010) e quindi rappresentano una potenziale fonte dietetica di selenio organico. La supplementazione nutrizionale del selenio tramite i microrganismi ha ricevuto molta attenzione negli ultimi dieci anni (Chasteen, T.G, 2003), in quanto è essenziale per la vita dei batteri (Sawers *et al.*, 1991; Kiffney e Knight, 1990).

3.1 Metabolismo del selenio nei batteri lattici

Nelle diverse forme presenti in natura (vedi capitolo 2) il selenio si comporta come una arma a doppio taglio nei sistemi biologici, presentando un sottile confine tra la concentrazione fisiologicamente essenziale e quella tossica.

Secondo quanto riportato da Jasna Mrvčić *et al.*, (2012): « I microrganismi presentano una naturale affinità verso gli ioni metallici, aspetto da ricondurre alla composizione delle membrana delle pareti cellulari (Blackwell *et al.*, 1995). Solo di recente, i diversi trofismi dei LAB nel legare gli ioni metallici si sono dimostrati un rilevante argomento di studio, tanto che, Wang e Chen (2009),

hanno prodotto una vasta analisi sulle capacità di bioassorbimento degli ioni metallici per molte specie di microrganismi.

I complessi meccanismi che governano i legami tra ioni metallici e batteri lattici, come per altri microrganismi, sono dipendenti dalle caratteristiche degli stessi ioni, dalle proprietà fisiologiche dei LAB e dalle caratteristiche fisico-chimiche ambientali (pH, temperatura, concentrazione ioni metallo). In letteratura sono descritti due meccanismi base nel legame degli ioni metallici (Jasna Mrvčić *et al.*, 2012 ; Doran J.W, 1982):

- *Bioassorbimento*, gli ioni metallici attraversano passivamente la parete cellulare
- *Bioaccumulo*, processo attivo dove gli ioni metallici passano la membrana cellulare e si accumulano all'interno della cellula (Fig.18).

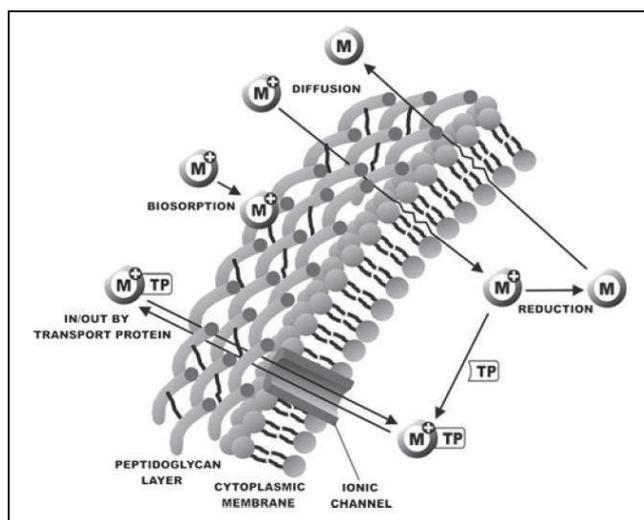


Figura 18: Meccanismo di legame degli ioni metallici nei microrganismi (Jasna Mrvčić *et al.*, 2012).

Le diverse sperimentazioni moderne (Lamberti *et al.*, 2011; Shu Kai Xia *et al.*, 2007) hanno approfondito quanto scoperto da Calomme *et al.*, (1995), riuscendo a dedurre le principali vie biochimiche dei batteri lattici nel metabolismo del selenio, già indagate da Doran J.W nel 1982. Come riporta il più recente Lamberti *et al.*,(2011): "Nei batteri lattici, a livello metabolico, quattro prodotti genici sono

direttamente coinvolti nella biosintesi delle selenoproteine: SelA (selenocisteina sintasi), SelB (selenocisteil-tRNA), SelC (Selenocisteina-tRNA specifica) e SelD (selenofosfato sintasi). Le selenoproteine presenti nei batteri comprendono almeno tre forme della formiato deidrogenasi (FdhN, FdhO, FdhH) trovate in *E. coli*, una glicina reduttasi (forma A e B) trovata invece in specie di *Clostridium* ed infine una idrogenasi NiFeSe trovata in *Desulfovibrio vulgaris*. A pH fisiologico il gruppo selenolo è nella sua totalità ionizzato ed è in grado, quindi, di operare come un catalizzatore redox molto efficiente”.

Per quel che concerne piante e batteri, il Se viene assimilato tramite il pathway di assimilazione dello zolfo con la selenate attivata dalla ATP sulfurilasi che viene successivamente convertita in selenometionina (de Souza *et al.*, 2000).

La reazione della selenite con la glutatione genera la selenoglutatione che potrebbe essere successivamente ridotto a glutatione e selenolo. Questi ultimi due composti sono intermedi chiave nella trasformazione del Se a livello metabolico. La selenocisteina liasi (SCL) è un enzima piridossil fosfato-dipendente con elevata similarità alla famiglia delle proteine NifS (Mihara, H *et al.*, 1999). La sua scissione permette di ottenere esclusivamente selenocisteina, alanina e Se elementare o seleniuro di idrogeno (H_2Se) se però sono presenti composti riducenti. La SCL è molto specifica per la selenocisteina e non agisce sui composti simili con zolfo (L-cisteina). SCL è l'enzima chiave del metabolismo Se (Fig.19).

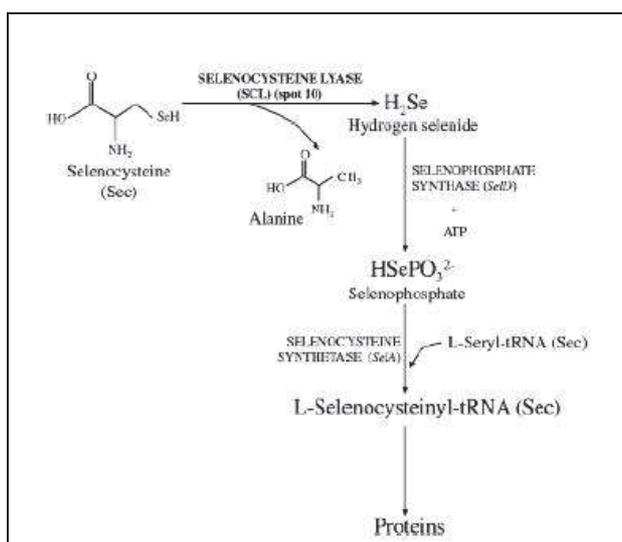


Figura 19: Incorporazione della selenocisteina (Sec) nelle selenoproteine (Lamberti *et al.*, 2011).

H₂Se derivato dalla selenocisteina è incorporato in seleniofosfato dalla seleniofosfato sintetasi. Questo meccanismo risulta essere più efficiente rispetto al H₂Se prodotta direttamente dalla riduzione del selenito di sodio assorbito (Lacourciere, G., 1998). Quindi l'attivazione del complesso meccanismo che coinvolge le quattro proteine (SelA, SelB, SelC e SelD) porta alla costituzione della selenocisteina in selenoproteine>>>.

3.1.1 Detossificazione del selenio

Nel regno “*Bacteria*” esistono diversi meccanismi protettivi per la rimozione di molti elementi tossici presenti nel substrato (Jay, J. M, 1996).

Nel metabolismo del selenio, se presenti elevati quantitativi di selenio nel substrato, i batteri lattici instaurano un meccanismo di detossificazione, ovvero la riduzione del selenio presente, come nel caso del selenato convertito in selenite, comportando la formazione di selenio elementare (Se⁰) (Andreoni, V *et al.*, 2000). Nel lavoro di Lamberti *et al.*,(2011) e Shu Kai Xia *et al.*,(2007), la sovra espressione dell'enzima SCL insieme alla detossificazione del Se (IV) a Se (0) ha determinato durante la fase stazionaria di due diverse specie di batteri lattici (*Lb. bulgaricus* e *Lb. reuteri*) una pigmentazione rossa della parete cellulare della biomassa, in seguito all'eccesso di selenio nel medium (Fig. 20 e 21):

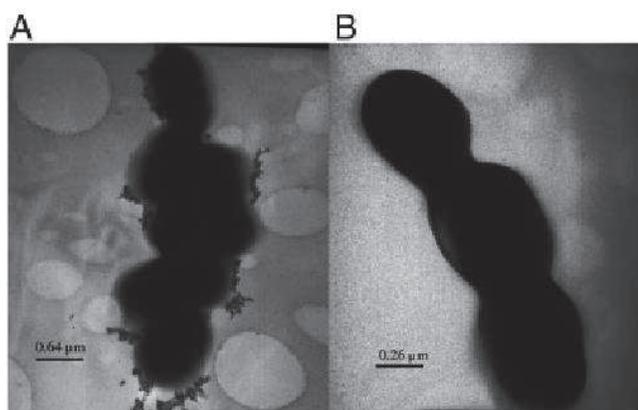


Figura 20: Fotografie al TEM (Transmission Electron Microscopy) di *Lb. reuteri* Lb2 BM trattato con (A, 4,38 mg/l Na₂SeO₃) e senza (B). In A si osservano i depositi di Se(0) (Lamberti *et al.*, 2011).

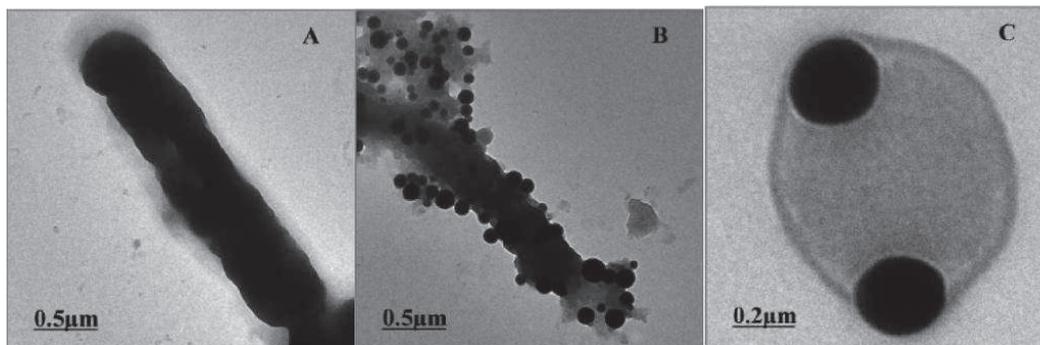


Figura 21: Fotografie al TEM (Transmission Electron Microscopy) di *Lb. bulgaricus* trattati con o senza 64 mg/l Na_2SeO_3 . Condizione di controllo, senza supplemento di Na_2SeO_3 (foto A) senza alcun deposito, invece, in B (esposizione al Na_2SeO_3) si osservano numerosi depositi vicino nella parete cellulare. In C si osservano depositi nel citoplasma di Na_2SeO_3 (Shu Kai Xia *et al.*, 2007).

3.2 Interazioni del selenio con i batteri lattici nell'impasto acido

Le recenti strategie di supplementazione alimentare instaurate all'interno dell'Unione Europea sono focalizzate su l'utilizzo dei prodotti a base di cereali per il loro cospicuo consumo, che apporta nella dieta la maggior quantità di selenio (Rayman M. P, 2008). Una sperimentazione condotta in Polonia da Bryszewska M. A. *et al.*, (2005), ha portato allo sviluppo di un pane di grano o segale con impasto acido arricchito al selenio, un primo approccio per sfruttare i bioprocessi fermentativi che aumentano la qualità nutrizionale di questo prodotto di largo consumo.

Per poter meglio comprendere le interazioni tra i batteri lattici e il selenio all'interno del processo fermentativo dell'impasto acido, in quanto poco note, è necessario descrivere le diverse forme e concentrazioni di selenio presenti nei prodotti da forno. In questa categoria di prodotti la maggior fonte di selenio è apportata dalla farina e pertanto, in questo capitolo, verrà trattato solo questo fondamentale ingrediente, in quanto i restanti ingredienti (acqua, grassi, sale, zucchero etc.) non ne forniscono un apporto rilevante (4,6 μg selenio/g peso secco, Hart, D.J *et al.*, 2011).

La concentrazione di selenio nelle diverse specie cerealicole presenta una correlazione approssimativamente lineare tra quella del suolo (con o senza apporto di fertilizzanti specifici) e quella presente nella cariosside (Hart D.J *et al.*,

2011). La specie maggiormente presente nella farina è la selenometionina (~65%) (Huerta *et al.*, 2003; Warburton & Goenaga, Infante, 2007). Altre specie di selenio presenti nella farina e prodotti derivati sono: selenocisteina (~5 %), Se-metilselenocisteina (~3%), selenite (~5 %) e selenato (~4 %) (Fig. 22). Dall'immagine si evince come, a seconda dei diversi passaggi tecnologici (tasso di abburattamento o raffinazione etc.) e dei diversi sottoprodotti ottenuti, la selenometionina sia presente sempre in grandi quantitativi, con concentrazioni anche del 78% sul selenio totale nei prodotti finiti (Hart D.J *et al.*, 2011).

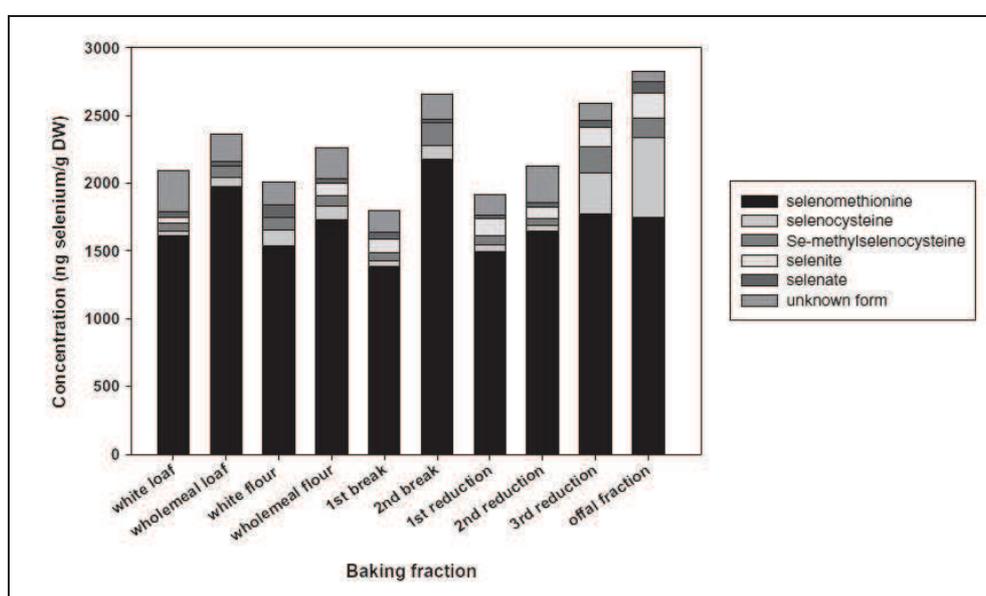


Figura 22: Concentrazione delle specie di selenio nelle frazioni di macinatura di grano (Hart D.J *et al.*, 2011).

Il selenio presente nei cereali è metabolizzato efficientemente nella dieta umana. Un 80% del selenio totale è assorbito e trattenuto (Fox *et al.*, 2005), inoltre alcuni studi condotti sulla supplementazione umana di grano e pane arricchiti dimostrano l'incremento della concentrazione plasmatica e di altri biomarcatori associati allo status nutrizionale del selenio (Hart D.J *et al.*, 2011). Questo eccellente assorbimento e il suo valido metabolismo è in buona parte da attribuire alle diverse specie chimiche presenti in questi prodotti.

Il processo fermentativo dell'impasto acido permette di trasformare il selenio presente nella farina dalla forma inorganica (selenite e selenato) alla forma organica (Diowksz *et al.*, 2000, Alzate *et al.*, 2010) aspetto che determina una

migliore efficacia a livello nutrizionale se il consumo di questi prodotti è protratto nel tempo. Il lavoro di Bryszewska M. A. *et al.*,(2005), con l'obiettivo di sviluppare un pane con impasto acido arricchito al selenio per il comparto industriale che possedesse le normali caratteristiche qualitative del pane di grano o segale, doveva apportare elevati contenuti di Se, garantire una conversione controllata dei composti inorganici durante le diverse fasi del processo produttivo e una comprovata qualità nutrizionale del prodotto, da giustificare l'acquisto.

La determinazione del selenio con HPLC-ICP-MS (cromatografia liquida ad alta prestazione abbinata a spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente) ha inizialmente evidenziato le differenze del selenio tra il pane arricchito e quello non arricchito (controllo) (Bryszewska M. A. *et al.*, 2005) (Fig. 23):

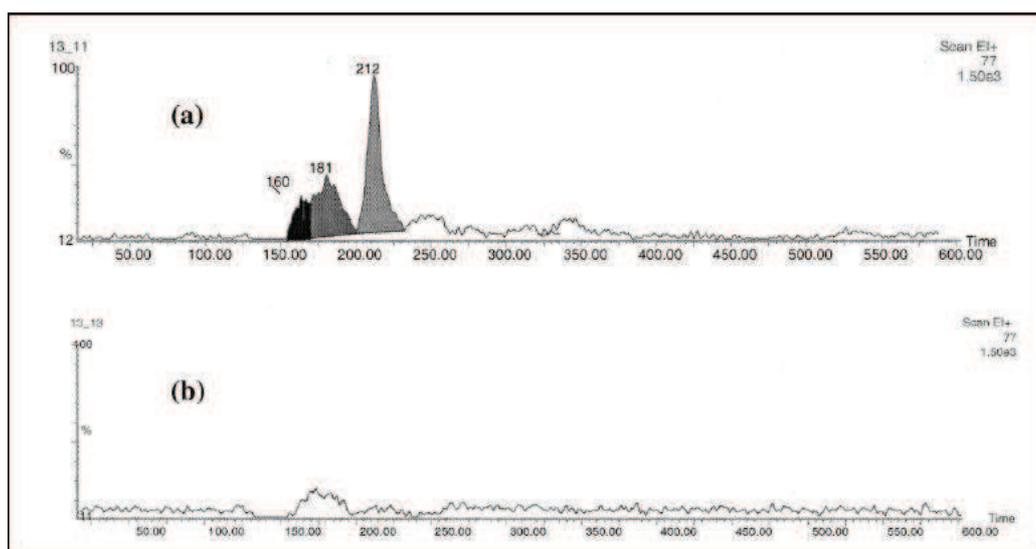


Figura 23: Cromatogramma di pane di segale e grano con sourdough all'HPLC-ICP-MS.

Si nota come il pane controllo (Fig. 23 a) non mostri alcuna area significativa per i composti al selenio mentre, il pane arricchito (Fig. 23 b) evidenzi un picco (212) raffigurante la selenometionina che dalle analisi corrisponde al 42% del selenio identificato nelle aree del cromatogramma.

Per la somministrazione umana dei due pani prodotti, i risultati delle analisi mostrano un aumento del selenio nei livelli plasmatici, durante le 6 settimane per

il gruppo alimentato con pane arricchito, come si evince dalla tabella sottostante (Tab. 14). Diversamente per l'attività della GPx1 (Glutathione per ossidasi 1) non si evidenziano differenze sostanziali (Malgorzata A. *et al.*, 2007). Una possibile spiegazione ricade sulla forma chimica del selenio nel pane arricchito. Anche secondo Brown *et al.*,(2000) che ha svolto esperimenti con umani volontari somministrando della selenometionina pura, ha constatato che l'attività della GPx mostra poca o nessuna risposta alla supplementazione alimentare, nonostante la concentrazione plasmatica del selenio anche in questo caso fosse crescente.

Experimental time points	Week 0	Week 1	Week 2	Week 4	Week 6
Plasma selenium level ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
Control group (n=12)	60.1 \pm 8 (47-76)	61.1 \pm 8 (48-76)	58.0 \pm 7 (50-68)	58.7 \pm 7 (47-71)	60.1 \pm 8 (48-79)
Enriched group (n=12)	56.3 \pm 6 (48-65)	61.9 \pm 6 (51-73)	65.7 \pm 10 (50-86)	66.5 \pm 6 (56-76)	63.1 \pm 7 (53-80)
Platelet GPx1 activity (U/mg protein)					
Control group (n=12)	0.29 \pm 0.10 (0.13-0.44)	0.31 \pm 0.07 (0.20-0.41)	0.33 \pm 0.07 (0.21-0.43)	0.34 \pm 0.08 (0.22-0.48)	0.30 \pm 0.09 (0.16-0.45)
Enriched group (n=12)	0.15 \pm 0.07 (0.10-0.36)	0.29 \pm 0.08 (0.19-0.44)	0.33 \pm 0.09 (0.16-0.50)	0.32 \pm 0.09 (0.13-0.41)	0.29 \pm 0.07 (0.16-0.45)

Tabella 14: Livelli plasmatici di selenio e attività piastrinica della GPx1 (Malgorzata A. *et al.*, 2007).

Capitolo 4: Analisi economica del mercato dei prodotti funzionali

Nell'ambito del programma Spinner 2013 (Programma Operativo Regionale (POR) Fondo Sociale Europeo (FSE), Obiettivo 2 "Competitività regionale ed Occupazione" 2007-2013 dell'Assessorato Scuola, Formazione Professionale, Università, Lavoro, Pari Opportunità della Regione Emilia-Romagna):



ho realizzato un'analisi del mercato dei prodotti funzionali finalizzata alla possibile sfruttamento dell'idea di un prodotto funzionale arricchito di selenio di cui il seguente lavoro di tesi ne rappresenta la sua parte scientifica. In particolare sono state realizzate delle valutazioni economico imprenditoriali inerenti le analisi del mercato bakery funzionale Italiano, la comprensione delle dinamiche odierne per possibili applicazioni biotecnologiche future nell'ambito dei prodotti da forno, nello specifico per il comparto bakery funzionale. Ciò che il progetto si poneva come obiettivo nel breve periodo (tre anni), se vi fossero stati gli estremi necessari per la creazione di un'attività imprenditoriale, consisteva nella formulazione di un ingrediente con attitudine funzionale salutistica applicabile in diverse formulazioni di alcuni prodotti alimentari come pane, biscotti, prodotti per la prima colazione (brioche), prodotti della tradizione italiana (panettoni, pandori, colombe, piadine), grissini e prodotti legati al territorio (piadina). Inoltre, il progetto intendeva porre le basi per la possibile instaurazione futura di una attività imprenditoriale.

4.1 Abitudini alimentari in epoca moderna

Secondo l'indagine Consumer Confidence Survey (Consumer Confidence Survey, 2011) le principali preoccupazioni degli italiani riguardano principalmente: sicurezza sul posto di lavoro, economia del paese, aumento delle bollette, debito pubblico e salute. Questo comportamento è in linea con l'andamento Europeo.

All'interno delle società avanzate, nelle quali le esigenze nutrizionali sono soddisfatte e si è raggiunta la "fase di sazietà" (Malassis, 1995), gli alimenti assumono connotati diversi, tra i quali anche quello ludico ed edonistico (Poulain, 2002) e, attraverso la loro assunzione, si provocano piacevoli stimoli sensoriali legati al gusto e alla vista. Inoltre sussiste una sempre maggior volontà di seguire una corretta e migliore alimentazione in grado di ottimizzare la salute ed il benessere.

Nel comparto alimentare il consumatore ritiene che le proprie conoscenze siano sufficienti per comprendere le informazioni presenti nelle etichette degli alimenti, aspetto confermato dal 59% degli intervistati (su un campione di 14.108 individui). Al contrario, il 36% ritiene che solo una parte dell'etichetta sia comprensibile, mentre un 5% non comprende l'etichetta nella totalità. Il consumatore, oggi, presta una maggiore attenzione solo a determinate informazioni contenute in etichetta, in particolare a: contenuto di vitamine (27%), freschezza (31%) e provenienza (28%). Questi dati sono stati raccolti da un campione di 506 consumatori come mostra la figura 23 (Nielsen, 2012).

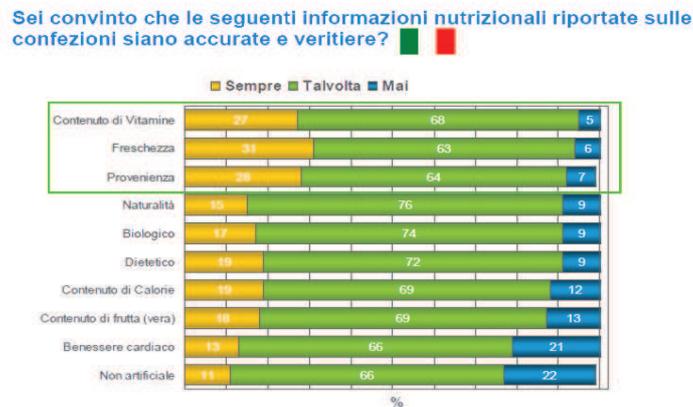


Figura 24: Valutazioni complessive dei 506 consumatori italiani alla domanda indicata in figura (Nielsen, 2012).

Mentre, per quel che concerne la tendenza all'acquisto dei consumatori verso prodotti che offrono benefici per la salute presenti sul mercato agroalimentare italiano, l'indagine di Nielsen (2012), su un campione di 501 individui offre, per l'idea imprenditoriale in studio, una valutazione dettagliata del comparto bakery suddivisa in tre possibili aree di interesse: prodotti integrali/fibre, cereali arricchiti e pane o sostituti arricchiti con calcio e vitamine b (Fig. 25). La valutazione di queste tre categorie traccia l'attuale tendenza nel settore bakery funzionale, dove i prodotti ricchi in fibre presentano una regolarità all'acquisto del 23% rispetto al 7% dei cereali arricchiti e 3% di pane e sostituti arricchiti. Invece, per gli acquisti occasionali (indicato con "talvolta") si osservano percentuali del 34, 17 e 11%. La differenza più rilevante si osserva nell'assenza di una frequenza di acquisto dove la categoria dei "pani o sostituti o arricchiti con calcio o vitamine" presenta una quota addirittura del 72% su 501 intervistati con quote più contenute del 57% e 22% per cereali arricchiti e prodotti integrali e fibre.

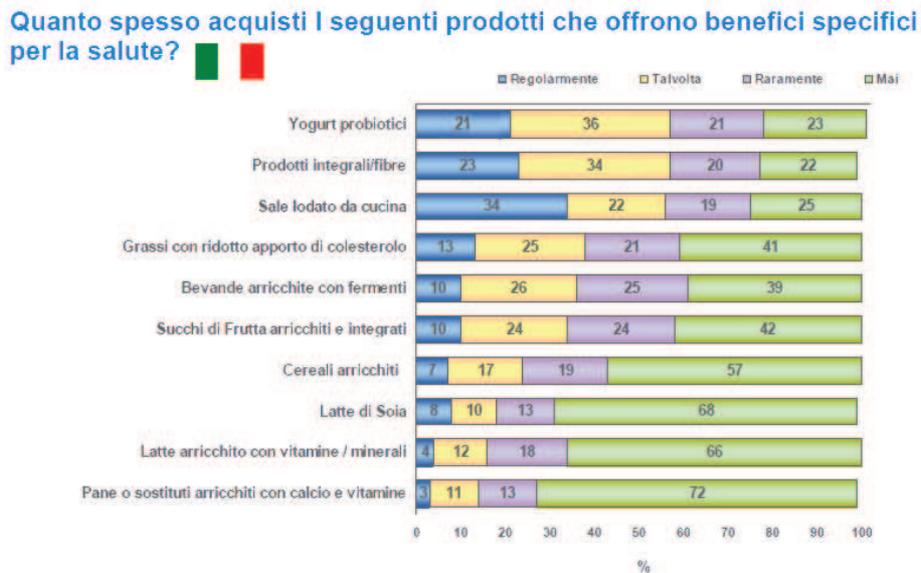


Figura 25: Valutazione complessiva delle risposte di 501 consumatori italiani alla domanda indicata in figura (Nielsen, 2012).

Infine, sempre da dati Nielsen (2012) su un'ulteriore valutazione di 6.421 individui (Fig. 26), si comprendono le dinamiche che regolano le scelte alimentari della popolazione Italiana ed Europea con intenzione di perdere peso, approccio

che può essere traslato nella valutazione generale di come migliorare lo status di benessere psico-fisico attraverso il consumo alimentare.

Nell'odierna società dove gli aspetti ludici ed edonistici dominano la ricerca del benessere, i principali approcci che si osservano riguardano le azioni evidenziate nel riquadro verde dell'immagine sottostante (Fig.26).

Le condotte dei consumatori volte al tentativo di perdere peso, denotano, sia per l'ambiente Europeo che Italiano, una ferma decisione nel migliorare la propria alimentazione con connotati più freschi e naturali, ridotte porzioni con minor elaborazione nelle formulazioni alimentari e con sporadici cambiamenti nel regime alimentare.

In che modo stai variando la tua dieta con l'obiettivo di perdere peso?

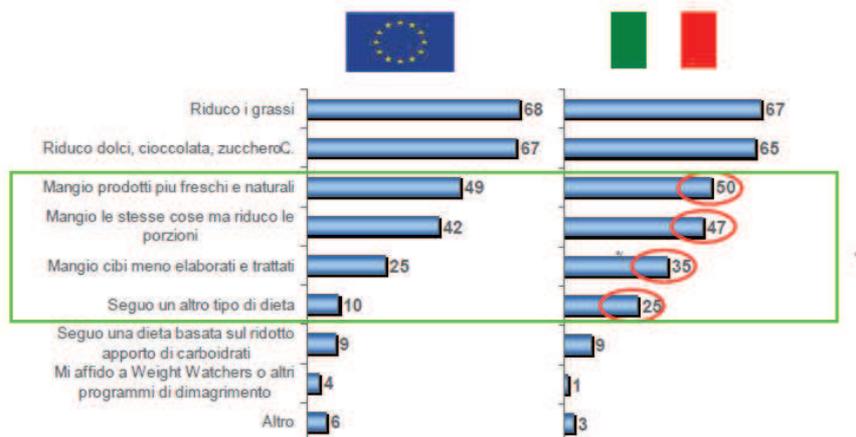


Figura 26: Valutazione complessiva delle risposte di 6421 consumatori tra europei e italiani alla domanda indicata in figura (Nielsen, 2012)

4.2 Andamento del settore

All'aumentare del reddito pro-capite si assiste a una progressiva variazione dello stile alimentare, con un aumento considerevole del consumo di alcuni prodotti e la diminuzione di altri che fino a poco tempo prima erano di gran lunga superiori. L'aumento del potere di acquisto e la diversa struttura sociale hanno, inoltre, diversificato i bisogni alimentari comportando anche una modificazione nei sistemi di produzione, di trasformazione e di distribuzione degli alimenti.

Il consumatore, oggi, una volta soddisfatti i propri fabbisogni quantitativi, e ancora di più pensandoli soddisfatti per il prossimo futuro, in virtù anche della disponibilità di un reddito pro-capite superiore, orienta le proprie scelte verso prodotti con alti requisiti qualitativi, compresi quelli salutistici a scapito magari delle caratteristiche organolettiche.

Il problema della salute è visto con maggiore attenzione al punto che il consumatore è molto più attento ed esigente e richiede prodotti con elevate garanzie igienico-sanitarie, per il timore di potenziali danni alla propria salute causati dagli alimenti (Gios-Boatto, 1990; Gios-Clauser, 1995; Belletti-Marescotti, 1995; Antonelli, 1996).

L'evoluzione appena tracciata ha investito anche i prodotti da forno e il pane in particolare, per il quale in questi ultimi anni si è riscontrata una tendenza al ribasso dei consumi pro-capite, per effetto della modificazione degli stili di vita ed alimentari dei consumatori e per la graduale sostituzione del pane con altri prodotti succedanei quali le fette biscottate, i cracker, i grissini, i quali, invece, hanno registrato aumenti delle vendite e delle quote di mercato.

Nonostante i ridotti consumi registrati, la nostra civiltà ha allargato il ventaglio dei gusti; infatti, da uno studio condotto in Italia (Insor, 2000) emergono circa 200 diverse tipologie di pane che sono un ordine di grandezza piuttosto che un numero esatto.

Sull'arco del periodo 2000-2011, la produzione del settore ha messo a segno un progresso in termini quantitativi del +10,4%, con oltre 25 punti di differenza rispetto al +15,2% segnato in parallelo dalla totalità dell'industria nazionale (Ismea, 2012). Attualmente le ombre che gravano sul quadro macroeconomico del settore alimentare, vengono soprattutto dai consumi interni. Se si guarda indietro, si scopre, infatti, che i consumi alimentari domestici delle famiglie espressi in valori costanti, nell'ultimo decennio, hanno raggiunto la "punta" più alta nel lontano 2006, quando riuscirono a salire di 4 punti percentuali sopra l'anno base 2000 (Ismea, 2012). Poi è cominciato il calo che ha portato il 2008 e 2009 "sotto", rispettivamente, del -3,5% e del -3,0% rispetto agli anni precedenti. Invece nel 2010 è emerso un marginale rimbalzo in valori costanti del +0,3% (Ismea, 2012).

La serie storica del decennio dice, in definitiva, che c'è stato un triennio (2001-2003) di cali e riflessività, un quinquennio (2004-2008) in cui i consumi hanno avuto un andamento “a campana”, comunque sopra il livello del 2000 (Ismea, 2012). Infine, il ritorno dei consumi nel 2009-2010 sotto il livello di inizio periodo. In pratica, i consumi 2010 si sono posti 2,6 punti sotto il livello del 2000. Va aggiunto che il 2011 dovrebbe arrecare, secondo attendibili stime, un'ulteriore taglio in valori costanti delle vendite di circa 2 punti sull'anno precedente.

I consumi alimentari hanno in parte tradito la loro fama di inossidabile rigidità e mostrano ormai profili “strutturali” nella crisi odierna. Ed è chiaro, altresì, che la produzione cede, trainata in basso da una perdurante flessione dei consumi che non riesce più a trovare contrappeso sufficiente nella dinamica espansiva dell'export (Ismea, 2012).

Sul passo lungo, il ruolo dell'alimentare come galleggiante anticiclico del sistema ne è uscito perciò esaltato. Anche se il 2011 ha recato nuove criticità, col riapparire della tendenza flettente della produzione che si era presentata nel biennio 2008-2009 (Ismea, 2012). Nel mondo, il “made in Italy” si identifica sempre più, quindi, con i prodotti dell'industria alimentare nazionale di qualità e tradizione. Va aggiunto che l'export di settore ha accresciuto la propria quota mondiale passando, dal 3,8% del 2001, al 4,3% del 2010 (Ismea, 2012). Sul lungo periodo, comunque, anche l'export alimentare ha mostrato un andamento interessante. I suoi trend, anzi, sono stati più brillanti e più stabili di quelli della produzione (Ismea, 2012). Nello stesso confronto 2000-2011, l'export dell'industria alimentare ha messo a segno infatti una crescita stimata in valuta del +87%, con oltre 40 punti di vantaggio rispetto al +44% registrato in parallelo dall'export totale del Paese (Ismea, 2012).

Secondo una recente analisi di Gea (Gea, 2011) le leve su cui puntare in questo periodo di congiuntura economico recessiva riguardano l'innovazione e le sempre maggiori occasioni di consumo, aspetti che possono garantire migliori risultati in termini di redditività, grazie alla possibilità di poter innescare economia di scala e sinergie competitive sul fronte della marca. I consumi in GDO sono in sofferenza e con prospettive non particolarmente positive. Le dinamiche moderne sono diverse da comparto a comparto, così come l'inflazione del carrello mostra, nei

diversi reparti, dinamiche altalenanti. Si conferma una maggiore propensione all'acquisto in "promozione" con una ripresa dell'efficacia di questa leva.

Gli investimenti in innovazione del prodotto e nel packaging hanno ridato dinamicità ad un settore maturo con un'elevata penetrazione nelle famiglie Italiane. Registrano inoltre segnali positivi, evidenziando una discreta vitalità, i prodotti di marca caratterizzati da innovazione. La riformulazione dei prodotti dolciari, fin dal 2008, ha portato le aziende Italiane a investire oltre 30 milioni di euro per trasformare una fetta rilevante di alimenti "quotidiani" come biscotti, cereali da prima colazione, merendine, cracker e gelati in prodotti più innovativi e anche nutrizionalmente migliori rispetto a quelli di qualche anno fa.

Aidepi (Associazione delle Industrie del Dolce e della Pasta Italiane) fissa al 2014 alcuni obiettivi, tempistiche e risultati attesi da questo percorso con l'obiettivo di migliorare ulteriormente il prodotto e le confezioni, in particolare quelli destinati ai bambini nella fascia di età 3-12 anni, e favorire consumi più consapevoli attraverso una maggiore informazione e sensibilizzazione del consumatore (Aidepi, 2013).

L'impatto dell'innovazione ha determinato un trend con differenti entità nei rispettivi comparti, esempi innovativi già attuati sono osservabili nel comparto biscotti, specialmente biscotti (frollini), dove la strategia di diversificazione della gamma e relative offerte rivolte verso specifici target per nuove occasioni di consumo ha incrementato del 2,5% (in valore e volume) il settore (Gea, 2011). I frollini hanno trainato il settore dolciario, in quanto si prestano facilmente alla sofisticazione e all'additivazione, rispetto al semplice biscotto secco. Altro filone interessante sono i prodotti funzionali e "free from" che costituiscono ormai il 20% del segmento biscotti (Gea, 2011).

Nel panorama delle industrie alimentari Italiane, per quanto concerne il mercato degli alimenti funzionali, le tecnologie attualmente disponibili prevedono un approccio di tipo puramente chimico, dove le sostanze nutritive richieste dai consumatori (vitamine, antiossidanti) sono aggiunte nei prodotti, o un approccio di tipo puramente fisico attraverso la riduzione di colesterolo, sostanze tossiche e della digeribilità del prodotto tramite processi tecnologici. Ciò che rende la nostra idea innovativa è l'utilizzo di un processo completamente organico, che permette

sia di ottenere un prodotto con maggiori connotazioni naturali sia una versatilità di applicazione per i diversi prodotti di panificazione.

Nonostante la congiuntura economica recessiva, il mercato dei prodotti salutistici è in espansione, aspetto confermato anche da Nielsen durante il salone internazionale dell'alimentazione Cibus (7 maggio 2012). Perciò visto il sempre maggiore interesse del consumatore a soddisfare l'esigenza di prodotti salutistici vi è un aumento della domanda verso di essi (Nielsen, 2012). Per quanto riguarda i claims (indicazioni nutrizionali) più diffusi a livello globale, come si evidenzia in figura 27, al primo posto si trovano quelli che fanno riferimento alle funzionalità digestive (43%), cui seguono con un certo distacco le indicazioni relative alla funzionalità cardiovascolare (17%) e quelli riguardanti le funzionalità immunitaria e ossea (10%), come riportato nel grafico sottostante (Mintel- Jago, 2009) .

Per questo motivo i prodotti funzionali proposti dalle industrie alimentari devono soddisfare le esigenze del consumatore tramite i capillari canali delle grande distribuzione organizzata, che è sempre più attenta a comunicare all'esterno i propri sforzi nel porre attenzione alla salute dei consumatori anche nella scelta dei prodotti a scaffale, o vendita al dettaglio. Allo scopo di incontrare le esigenze del consumatore, l'industria alimentare è sempre più rivolta alla produzione di alimenti con un valore nutrizionale aggiunto, spesso derivato da processi agronomici o tecnologici.

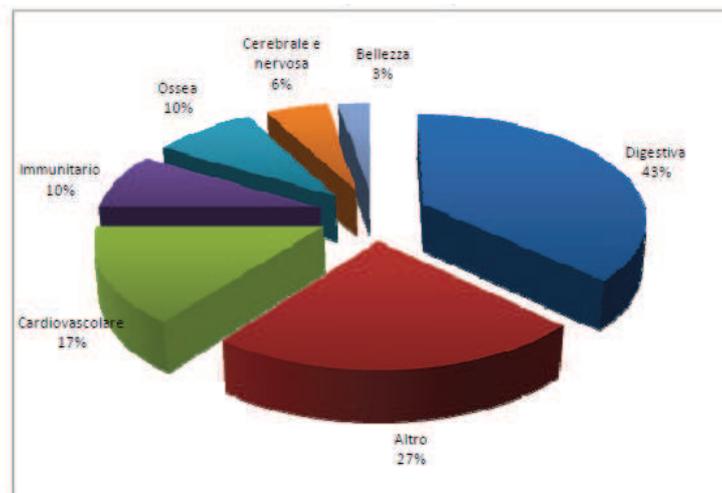


Figura 27: Percentuale di indicazioni funzionali riportate in etichetta nei prodotti alimentari a livello mondiale (Mintel- Jago, 2009)

Per l'anno 2009, il mercato Italiano degli alimenti recanti indicazioni salutistiche e di funzionalità si è attestato intorno a 1,4 miliardi di euro, evidenziando tassi di crescita del fatturato tra il 2007 e il 2008 del 7,2% e del 4,4% tra il 2008 e il 2009, come rappresentato in figura 28 (A.C. Nielsen- Nucci, 2009).

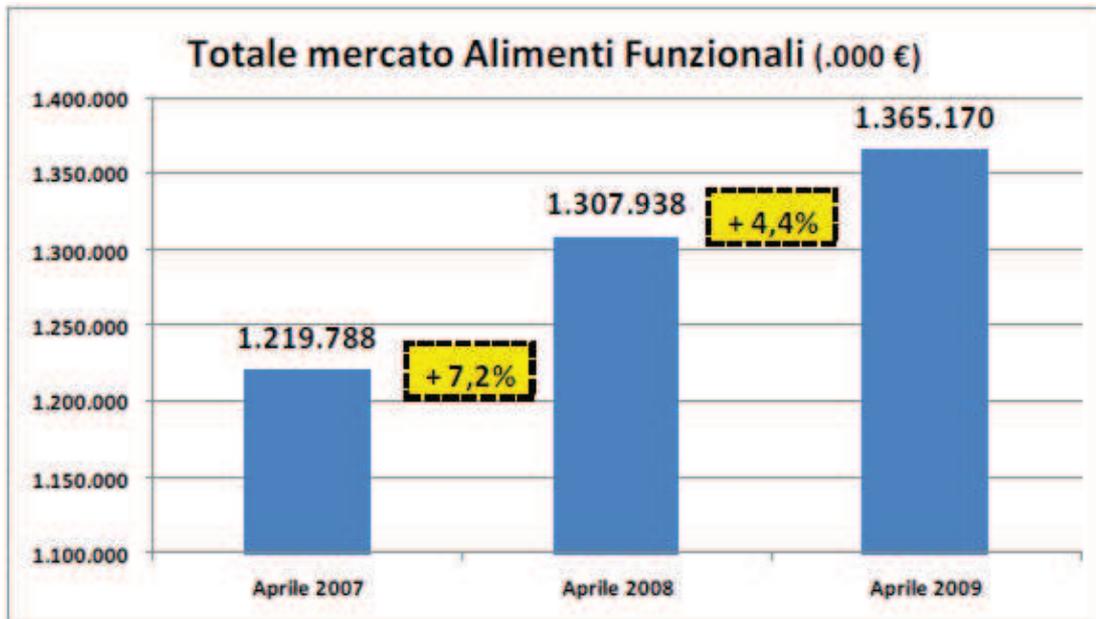


Figura 28: Fatturato alimenti funzionali dal 2007 al 2009 in Italia (A.C. Nielsen- Nucci, 2009).

Nello specifico, il mercato degli alimenti funzionali si suddivide in differenti segmenti, come dimostrato dall'indagine Nielsen (2012), figura 29:

Mercati: Iper+Super + Farmacie + Parafarmacie
Periodo: AT Gen 2012

	V.Val. (€ 000)	Trend	V.Conf. (000)	Trend	Prezzo Medio Conf.	Trend
TOTALE ALIMENTI	1.949.894	4,8	1.002.749	3,8	1,94	1,0
INTOLLERANZA ALIMENTARE	493.774	5,9	229.846	4,3	2,40	0,3
DIETA	277.760	2,1	170.825	5,2	4,39	5,4
INTESTINO	241.154	9,4	111.197	9,3	2,23	0,7
DIFESA	158.815	-2,3	64.121	-1,8	2,48	-0,5
REINTEGRAZIONE ENERGETICA	87.137	2,3	76.703	4,1	2,46	-3,9
ANTICOLESTEROLO	82.259	1,3	29.736	0,8	2,46	-5,0
REINTEGRAZIONE CALCIO	31.912	20,4	21.150	5,0	1,43	8,3
BAKERY SALUTISTICO	577.083	5,7	299.171	3,4	1,93	2,2

Figura 29: segmenti di mercato per gli alimenti funzionali in Italia (Nielsen, 2012).

Dai dati si evidenzia come il mondo degli alimenti funzionali registri una crescita sostenuta prevalentemente dei segmenti di intolleranza alimentare (prodotti per celiaci, intolleranza al lattosio etc.), funzionalità intestinale (prodotti ricchi in fibre), fabbisogno di calcio (lattiero caseari ricchi in calcio) e bakery salutistico; invece è in flessione il mercato dei prodotti destinati ad aumentare le difese immunitarie (Actimel e simili).

Il mercato nazionale Italiano dei prodotti da forno si estende su più classificazioni merceologiche: biscotteria, sostituti del pane, pasticceria, panificazione industriale e artigianale, merendine, prodotti per le ricorrenze. Il settore della panificazione industriale è il maggior consumatore degli impasti acidi. Nello specifico l'evoluzione del mercato ha visto l'istaurarsi di tre specifici settori salutistici nel mercato dei prodotti da forno quali biscotti, merendine e sostituti del pane. Il mercato del bakery tradizionale si attesta ad una quota di 3 miliardi e 315 milioni di euro pari al 85% del mercato totale. Il trend di crescita in valore per il mercato tradizionale è del 3,6% dal 2009 al 2010 e del 2,8% dal 2010 al 2011, fattispecie per il trend di crescita dei volumi aumentati del 3,3% dal 2009 al 2010, nonostante si riscontra una variazione inversa dal 2010 al 2011 con una riduzione del trend dello 0,5%.

Secondo i dati Nielsen del 2012, il comparto dei prodotti funzionali corrisponde a 575,139 milioni di euro (vendita in valore) pari al 15% del mercato bakery Italiano complessivo, che in volume di unità corrispondono a circa 96 milioni (vendita in volume). Oltre al trend di crescita dei prodotti funzionali descritto da Nielsen nel periodo 2007-2009 con entità del 14,9% vengono riportati gli andamenti più recenti dove nel periodo 2009-2010 e 2010-2011 si riscontra sul valore un aumento del 4,8% e 5,7%. Per quel che concerne i volumi, si osserva un incremento del 5% dal 2009-2010 e del 2,9% nel 2010-2011 a differenza del bakery tradizionale che osserva una riduzione nella sua penetrazione di mercato (Nielsen, 2012).

4.3 Indagini di Mercato svolte dal progetto “Selenium Biotec 2”

Durante il progetto Spinner “Selenium Biotec 2” la compagine ha svolto diverse attività di analisi del mercato specifiche per l’idea imprenditoriale in studio con il supporto delle consulenze di alta specializzazione fornite dal Consorzio Spinner. Di seguito verranno esposti i risultati significativi delle diverse analisi economiche.

4.3.1 Focus Group

L’analisi qualitativa ha individuato il target di riferimento per la tipologia di prodotto funzionale in sviluppo nel progetto, ovvero un coadiuvante per l’industria panificatoria.

La valutazione congiunta delle diverse osservazioni dei partecipanti al focus group (tecnica del Concept Test) ha individuato la clientela target selezionando specifici gruppi all’interno del mercato Italiano, ossia fasce di età comprese tra i 20-30 anni (sportivi) e 30-60 anni (invecchiamento attivo).

Dall’analisi si evince come l’influenza dei media pubblicitari provochi ambiguità nel normale processo decisionale per l’acquisto di beni alimentari, soprattutto per gli alimenti funzionali. Titubanze nel consumo di quest’ultima categoria alimentare si riscontrano per diverse motivazioni: aspetti discordanti tra le funzioni biologiche dichiarate in etichetta (claims nutrizionali) e l’opinione del consumatore che, in media, non sempre ritiene veritiere, aspetto da imputare alle ridotte conoscenze scientifiche dello stesso; e per le difficoltà all’acquisto della categoria degli alimenti funzionali per i cospicui aumenti nel prezzo rispetto agli omonimi tradizionali.

4.3.2 Interviste alle aziende target

Successivamente alla qualificazione del mercato, gli sforzi si sono focalizzati nella ricerca della dimensione quantitativa. Sempre con l’ausilio delle consulenze di alta specializzazione la compagine ha svolto delle interviste semi-strutturate a

delle industrie panificatorie presenti nel territorio Italiano. Tra le aziende contattate (Alce nero, Area bio group, Barilla, Bauli, Colussi, Cupiello, DECO industrie, Enervit, Fiorentini alimentari, G.M. Piccoli S.r.l, Galbusera, Gastone, Lanterna alimentari, Micheletto S.r.l, Nestlè, O fiore mio, Panificio Cremona, Re di pane (G.M.G group), Rebu, Selex e Vassalli) le interviste effettuate permettono di comprendere le dinamiche produttive e i trend che governano buona parte del mercato bakery.

Oggi giorno, per la maggior parte delle aziende sopra citate, si osserva un uso massiccio di lievitazioni con lievito di birra o lieviti chimici, aspetti dovuti alla praticità produttiva. Per gli impasti acidi si sono riscontrati molti apprezzamenti positivi per le sue qualità naturali e tecnologiche, ma la complessità di produzione ne giustifica il ridotto uso nelle aziende del bakery. Nello specifico, le due scelte produttive determinano pro e contro distintivi: ad esempio nell'uso del lievito di birra e del lievito chimico ha una maggiore versatilità e semplicità d'uso in azienda, garantendo buoni livelli sensoriali del prodotto finito (sempre in relazione alla formulazione) ma non esula le aziende ad utilizzare conservanti, edulcoranti, additivi etc. Diversamente, per quanto riguarda il lievito naturale, seppur di complicata gestione, il suo uso permette di ottenere migliori caratteristiche sensoriali e reologiche del prodotto rispetto ai metodi precedentemente menzionati, riducendo l'uso di conservanti e additivi, migliorandone la shelf-life. L'ottenimento di tali risultati è sempre meno perseguito a causa delle difficili standardizzazioni produttive e delle disomogenee riproducibilità nel tempo, caratteristiche che richiedono figure altamente professionalizzate in azienda.

Per tutte le aziende intervistate esiste una conclamata problematica legislativa per il corretto inserimento nel mercato dei prodotti funzionali/salutistici. L'uso di certe sostanze aggiunte e, di conseguenza, le specifiche indicazioni nutrizionali in etichetta richiedono studi accurati per evitare problematiche legali con gli organismi del controllo sanitario e l'EFSA (European Food Safety Agency). Inoltre, le problematiche legislative rendono le aziende titubanti nello sviluppo di nuovi alimenti funzionali, precludendo le industrie nella penetrazione di nuovi mercati e riducendo, quindi, le opportunità di business.

4.3.3 Indagine nelle abitudini alimentari del consumatore target

Durante il progetto è stata svolta un'indagine sulle abitudini di consumo della popolazione italiana, per i territori della provincia di Ravenna, Forlì-Cesena e Bologna. L'entità della rilevazione è stata di 207 persone di età compresa dai 20 agli over 60 anni. La strutturazione del questionario è stata ideata per ottenere un approccio informale con l'intervistato così da ottenere un responso sincero. Dopo l'iniziale descrizione del progetto e delle tematiche inerenti gli alimenti funzionali, le diverse domande formulate con tecnica ad imbuto hanno esplorato le complesse valutazioni dei consumatori verso i prodotti da forno in ambito generale, poi è stata focalizzata per ottenere l'attenzione verso l'acquisto di alimenti funzionali da forno e nella valutazione delle diverse abitudini di vita quotidiana.

Complessivamente le osservazioni raccolte permettono di dedurre che il bakery per l'Italiano medio presenta peculiarità importanti sotto i punti di vista del gusto, tradizione e bell'aspetto, e che innovazione e semplicità di formulazione, siano aspetti presi poco in considerazione dal consumatore. Per gli alimenti funzionali, le convinzioni sulla loro necessità nella vita di tutti i giorni (aspetto collegato alla possibile sostituzione di alcune tipologia di farmaci e integratori) permette di valutarli salutari grazie alle indicazioni che riportano in etichetta, ma l'approccio al consumo è frenato pesantemente dagli alti prezzi di vendita.

Ai fini del progetto "Selenium Biotec 2", il questionario è servito a saggiare le potenzialità economiche dell'applicativo di impasto acido funzionale al selenio.

Le conoscenze espresse del consumatore identificano un target già informato sulle potenzialità del minerale selenio, aspetto riconducibile alla conoscenza diffusa del prodotto: "patata selenella". Ciò consente, dai dati rilevati, di avere una buona percentuale di consumatori (35%) che acquisterebbero il prodotto considerando in esso un valore di utilità nella propria vita.

4.4 Conclusioni del progetto

Nelle dinamiche del “bakery functional food” Italiano non si riscontrano prodotti con elevati quantitativi di selenio aggiunto.

Le potenzialità operative della compagine di progetto potrebbero, se introdotte in una realtà produttiva attiva, avviarsi verso un’efficiente attività imprenditoriale in quanto le scelte produttive adottate potrebbero sopperire le difficoltà produttive delle possibili aziende clienti che non possono, per ovvie ragioni di organico specializzato e costo di produzione, produrre il coadiuvante impasto acido nel modo opportuno. Queste scelte si diversificano nella produzione e distribuzione del prodotto (Bag in Box o cisterne) verso tutte le tipologie di soggetti dell’industria del bakery Italiano, garantendo elevata qualità del prodotto e del servizio di messa a punto presso le linee prodotto della clientela. Inoltre, per controbilanciare le diverse problematiche legislative delle aziende clienti, l’instaurarsi di possibili partnership con figure autorevoli nel settore della legislazione alimentare ridurrebbero il gap decisionale per la vendita di alimenti funzionali senza quindi precludere nuovi capitali in mercati per loro di nuova esplorazione.

Capitolo 5: Obiettivi della sperimentazione

Il selenio è un microelemento essenziale per la nutrizione umana, in quanto esso ha funzione coenzimatica in enzimi coinvolti nella protezione dal danno ossidativo e nel metabolismo degli ormoni tiroidei. L'importanza del selenio nel metabolismo dell'uomo è conseguente all'isolamento di un enzima selenio-dipendente, la glutatione perossidasi, che protegge l'organismo da una serie di danni ossidativi dai radicali liberi.

Fino a metà degli anni 70, circa il 60% del grano utilizzato per produrre pane in Europa, veniva importato dal Nord America in particolare dal Canada in cui il frumento risulta possedere una maggiore concentrazione di selenio rispetto a quello coltivato in Europa. Le politiche economiche della CEE (Comunità Economica Europea), adottate in quegli anni, hanno comportato una riduzione nell'importazione di grano Canadese a favore del frumento coltivato in Europa, conseguenza di ciò una forte diminuzione nell'assunzione di selenio nella dieta.

Per aumentare il contenuto di selenio in questo tipo di alimenti, in molti paesi europei si utilizza una supplementazione di selenio.

Nel 2008, è stato reso evidente che i benefici del selenio nell'organismo dipendono dalla forma in cui è ingerito, stabilendo che quella organica è migliore dell'inorganica. L'introduzione di selenio raccomandato a livello internazionale è di 55-70 µg/giorno e la sua specie chimica efficace dal punto di vista biologico è la seleniometionina. Infatti, si può affermare che il selenio in forma inorganica ha una bassa bioattività; al contrario, il selenio legato agli aminoacidi (Se-metionina e Se-cisteina) ha una buona bioattività.

L'attuale tendenza del mercato alimentare del nuovo millennio vede un rilevante incremento nella domanda dei prodotti alimentari salutistici, in seguito alla sempre e maggior volontà di seguire una corretta e migliore alimentazione in grado di ottimizzare la salute ed il benessere. Allo scopo di incontrare le esigenze del consumatore, l'industria alimentare è sempre più rivolta alla produzione di

alimenti con un valore nutrizionale aggiunto, derivato o da formulazioni innovative o da processi tecnologici come quelli fermentativi.

Il progetto che sta alla base di questa sperimentazione mira alla messa a punto di un protocollo per la produzione di un prodotto funzionale a base di cereali arricchito con selenio bioattivo tramite un processo di natura biotecnologica di tipo fermentativo. In specifico utilizzando microrganismi selezionati per le loro caratteristiche tecnologiche è stata studiata la loro capacità di aumentare la componente maggiormente biodisponibile, e quindi bioattiva del selenio (seleniometionina, seleniocisteina) in una matrice alimentare costituita da una miscela di acqua e farina per la produzione di piadina.

Capitolo 6: Materiali e metodi

6.1 Ceppi utilizzati

Scelti dalla ceppoteca del DISTAL, in funzione delle loro capacità fermentative nell'impasti acidi, sono stati inizialmente selezionati 15 ceppi differenti di batteri lattici (Tab.15):

<i>Lactobacillus plantarum</i>
133
206
124a
5bhi
98a
189a
8bhi
98b
<i>Lactobacillus Fermentum</i>
MR13
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
L-RH C1122
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
BB12
<i>Lactobacillus casei e paracasei</i>
105
91
39
25

Tabella 15: Ceppi utilizzati

6.2 Terreni, condizioni di crescita e preparazione dell'inoculo

La crescita dei ceppi è avvenuta su terreno mMRS specifico per batteri attivi nell'impasto acido . La ricetta prevedeva i seguenti dosaggi di reagenti per un litro:

Reagente	Azienda	Quantità (g/L)
Universal Peptone	MERK	10 g
Estratto di carne (Lab-Lemco)	OXOID	2 g
Estratto di Lievito	OXOID	7 g
Glucosio	Carlo Erba	7 g
Fruttosio	Fruttil S.r.l	7 g
Maltosio	Carlo Erba	7 g
Acetato di Sodio	Sigma-Aldrich	5 g
K ₂ HPO ₄	Carlo Erba	2,5 g
MgSO ₄	Carlo Erba	0,2 g
MnSO ₄	Carlo Erba	0,05 g
Fe SO ₄	Carlo Erba	0,01 g
Cisteina HCl	AMRESCO	1 g
Tween 80	Sigma-Aldrich	1 g
Agar	FAGRAN	18 g

I reagenti, disciolti in acqua, hanno raggiunto un pH finale di ~ 5,6 utilizzando Acido Lattico (Carlo erba) con la strumentazione pH-meter basic 20 Crison (Spain). I ceppi sono stati ripresi dallo stoccaggio in -20°C con inoculo di 100µl di coltura in 9ml di mMRS liquido ed incubati a 37°C per 24 ore (carico finale ~10⁹ CFU/log)

Il selenito di sodio (Na₂SeO₃, S5261-25G, Sigma-Aldrich) utilizzato, nelle sue diverse concentrazioni, secondo il protocollo di Lamberti *et al.*, 2011 prevedeva la dissoluzione in H₂O sterile e filtrata in sterilità (cappa a flusso laminare) con filtri trottola sterili da 0.20 µm di Cellulosa su membrana di acetato (VWR).

6.3 Screening dei batteri lattici

Sulla base dell'operato di Lamberti *et al.*,(2011) e in collaborazione della Dott.ssa Pessione del Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, la valutazione della resistenza allo sviluppo dei batteri lattici selezionati (Tab. 15) in presenza di selenio è avvenuta sviluppando i microrganismi su mMRS liquido (no agar) contenente diverse concentrazioni crescenti di selenio.

La crescita dei batteri lattici è avvenuta utilizzando la tecnica della densità ottica (DO, o Optical density) con la strumentazione Pharmacia Biotec, Novaspec II, ad una lunghezza d'onda di 600nm e su taratura dello strumento su bianco di mMRS liquido puro.

In relazione alla lunghezza temporale nello sviluppo dei batteri lattici e per le limitazioni dell'orario lavorativo presso il laboratorio (regolamento di laboratorio presso il campus) la valutazione dello sviluppo batterico è stata osservata, dopo ripresa dei ceppi per 24h a 37°C, in due diverse fasi (Figura 30):

1° Fase: Inoculo del ceppo su terreno mMRS liquido e incubazione a 37°C, valutando la curva di crescita ai tempi di: 0,5 - 1,5 - 2,5 - 3,5 - 4,5 - 5,5 - 6,5 ore.

2° Fase: Diluizione dell'inoculo utilizzato nella (1ml in 9 ml di Fisiologica 0,9% NaCl) fino alla diluizione -4 corrispondente e inoculo nello stesso volume di terreno della 1° fase lasciando in incubazione per 16 ore a 37°C, e leggendo la DO a 600nm alle 16, 17, 18, 19 ore.

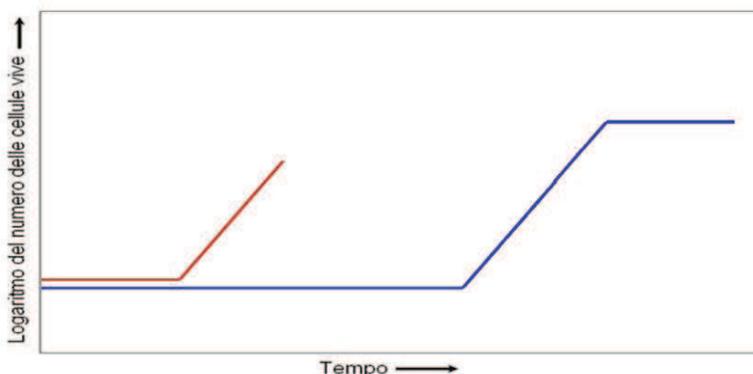


Figura 30: Due diverse fasi nella valutazione della crescita, in rosso fase 1 e in blu fase 2.

La selezione dei batteri lattici da utilizzare nella successiva sperimentazione (Tab.15), è avvenuta in 2 screening distinti, attraverso diverse valutazioni delle curve di crescita e conteggi cellulari:

1° Screening: Utilizzando le concentrazioni, 2.19 e 4.38 mg Na₂SeO₃ / L e la condizione controllo senza selenito di sodio su volumi di 50ml di mMRS in Falcon VWR Sterili, sono state valutate le diverse curve di crescita dei 15 lattici (Tab.15) secondo le due fasi sopracitate. Per ogni ceppo, solo in questo screening, è avvenuta la conta su piastra con tecnica per immersione su mMRS con agar. La lettura delle colonie è avvenuta dopo 36 ore in incubazione a 37°C.

2° Screening: Dopo selezione dei ceppi dal 1° Screening, sugli 8 rimanenti sono state valutate le condizioni di crescita su di un maggior numero di concentrazioni di Na₂SeO₃, ovvero: 2.19 mg , 4.38 mg , 8.76 mg , 17.52 mg , 21.9 mg , 43.8 mg , 87.6 mg e 175,2 mg di Na₂SeO₃/ L. La procedura operativa rimane la stessa delle due fasi sopracitate.

6.4 Preparazione dell'impasto acido

Inizialmente è avvenuta la ripresa dei ceppi scelti nel 2°screening, MR13 e 124a, su 100 ml di mMRS liquido per ogni ceppo (due falcon sterili da 50 ml) ed incubati per 24h a 37°C. Terminata questa fase, è avvenuta la centrifugazione a 4000 rpm per 15 minuti a 4°C e un doppio lavaggio del pellet ottenuto con 50 ml a falcon di H₂O sterile.

In una beuta da 500 ml, una per ogni ceppo, utilizzando farina di grano tenero "00" e acqua sterile in rapporto 100g/120g (low yield) è avvenuta la preparazione del preinoculo dell'impasto acido con 120g di farina e 144g di H₂O sterile. Di questi 144g, 100 ml provenivano dai due falcon da 50 ml del rispettivo pellet risospeso in acqua sterile. Per raggiungere il volume di 144g è stata utilizzata dell'acqua sterile. Il preinoculo è stato poi incubato a 37°C per 24h. Sono state effettuate su di esso le valutazioni in doppio biologico di pH (pH-meter basic 20 Crison, Spain) e campionamento microbiologico al momento T₀ e T₂₄.

Nella preparazione dell'impasto acido con e senza selenito di sodio dei due diversi batteri lattici da utilizzare nella formulazione dei campioni alimentari in tesi, il preinoculo dell'impasto acido a fine fermentazione, è stato utilizzato, mantenendo separate le due popolazioni di batteri lattici, con 110g per la preparazione dell'impasto acido (low yield, 100g/120g) senza selenio e 110g per la preparazione dell'impasto acido con selenio, questo è avvenuto sia per il ceppo MR13 che per il 124a. I volumi utilizzati consistevano, per tutte e 4 le diverse tipologie di impasto acido in 200g Farina e 240g H₂O sterile e 110g del rispettivo preinoculo. L'incubazione è avvenuta, anche in questo caso, per 24h a 37°C. Per meglio agevolare la comprensione del piano sperimentare rimando al grafico 1. L'impasto acido con e senza selenio per ognuno dei due lattici selezionati è stato analizzato, in doppio biologico, per il pH e misurazione della carica cellulare al momento T₀ e T₂₄

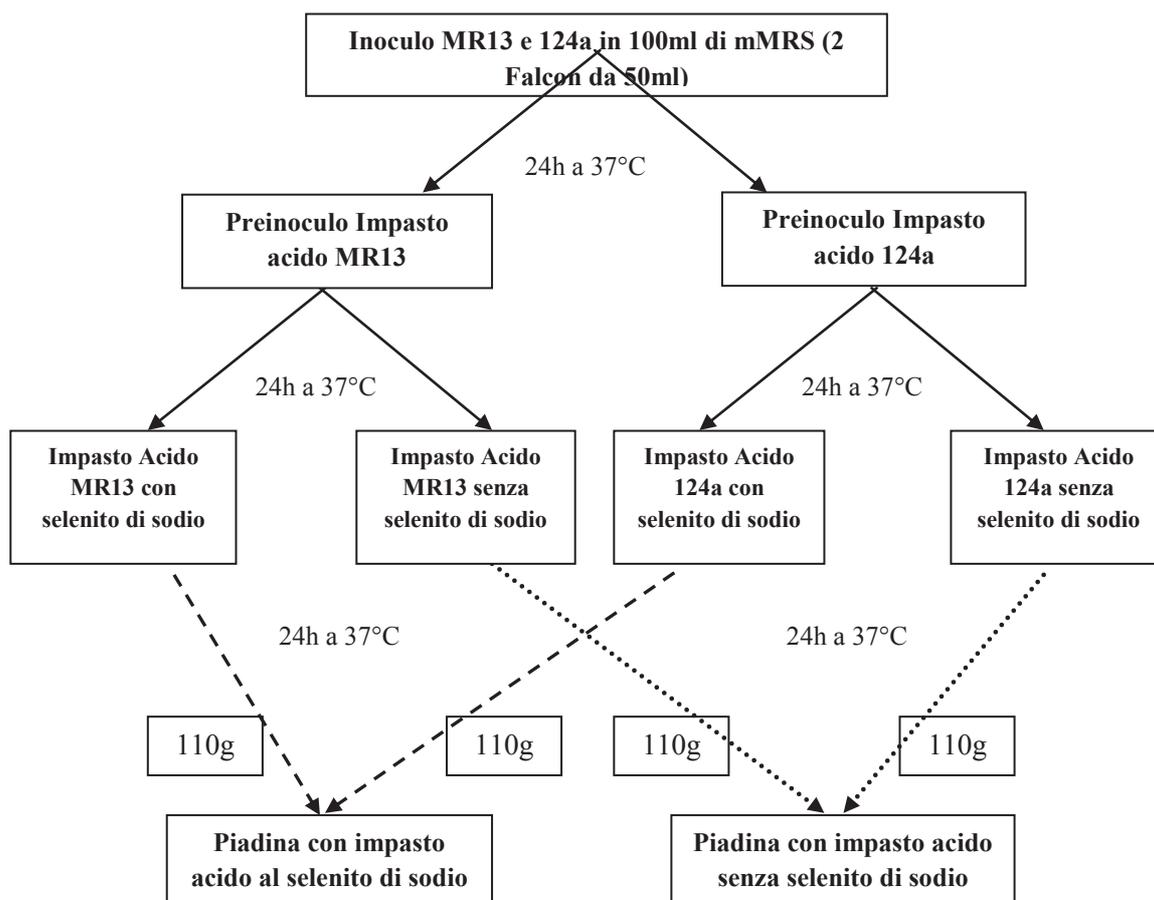


Grafico 1: Le diverse fasi della produzione dell'impasto acido e piadine.

La concentrazione di selenito di sodio applicate nelle due beute da 500ml, una per MR13 e una per 124a, sono state rispettivamente di 3,44 mg/kg Na₂SeO₃e di 1,89 mg/kg Na₂SeO₃.

6.5 Preparazione piadine

I campioni analizzati in tesi presentavano le seguenti caratteristiche:

- Piadina controllo, **CTq**
- Piadina con selenito di sodio, **CSe**
- Piadina con impasto acido, **CTqSD**
- Piadina con impasto acido e selenito di sodio, **CSeSD**

Per la preparazioni dei campioni in tesi sono state utilizzate le seguenti ricette in proporzione alla farina:

Ingredienti	Percentuali ricetta	Piadina senza impasto acido	Ingredienti	Percentuali ricetta	Piadina con impasto acido
Farina	100%	318,62g	Farina	100%	250g
Madre Acida			Madre Acida	88%	220g
Strutto Raffinato	10%	31,86g	Strutto Raffinato	10%	25g
Acqua	45%	143,38g	Acqua	0,063%	2,3g
Sale	2,07%	6,59g	Sale	2,07%	5,175g
Amido	2,93%	9,33g	Amido	2,93%	7,325g
	Totale	509,8g		Totale	509,8g

La preparazione delle piadine presenta diversi aspetti in formulazione. La condizione A è stata prodotta seguendo precisamente la ricetta “Piadina **senza** impasto acido”. Per la condizione **CSe**, è stata utilizzata la stessa ricetta della **CTq** ma con l’aggiunta del selenito di sodio ottenendo una concentrazione di 4,46 mg /kg Na₂SeO₃. Nella condizione **CTqSD**, invece, come da ricetta “Piadina **con** impasto acido” sono stati utilizzati, per i 220g indicati, 110g dell’ impasto acido

MR13 senza selenito di sodio e 110g dell'impasto acido 124a senza selenito di sodio. Infine, Nella condizione **CSeSD**, utilizzando sempre la ricetta "Piadina con impasto acido" sono stati utilizzati, per i 220g indicati, 110g dell' impasto acido MR13 con selenito di sodio e 110 dell'impasto acido 124a con selenito di sodio (grafico 1).

Durante la preparazione delle diverse condizioni sperimentali sono state applicate le seguenti condizione di lavorazione:

- Tempo di impastamento dell'impasto con planetaria di 11 minuti,
- Tempo di riposo dell'impasto 20min,
- Tempo di cottura media 90 secondi per lato di piadina,
- Temperatura di cottura 180/200°C,
- Raffreddamento a T° amb

In tutte le condizioni sperimentali è stata condotta l'analisi della sostanza secca della matrice con il metodo AACC 44-15A (Feliciano *et al.*, 2004). Il metodo consisteva nella triturazione di 10g di campione per poi porlo in stufa a 130°C per 1,5 ore, utilizzando per il dato finale la seguente equazione:

$$\text{Contenuto di umidità} = 100 * (1 - (\text{peso matrice essiccata} / \text{peso matrice iniziale}))$$

Sono state effettuate tre repliche per ottenere dati statisticamente rilevanti, le vaschette sono state essiccate a 130°C previo utilizzo per almeno 2 ore, e mantenute in essiccatore fino l'utilizzo. Ogni condizione sperimentale è stata prodotta in triplo biologico.

Le piadine in forma cruda (impasto) e cotta sono state analizzate in doppio biologico, per il pH (pH-meter basic 20 Crison, Spain) e misurazione della carica cellulare al momento per i batteri lattici sia per impasto crudo che per la piadina cotta.

6.6 Digestione gastrica *in vitro*

Il processo di digestione gastrica è stato svolto all'interno del laboratorio di nutrizione umana della Dott.ssa Alessandra Bordoni attraverso le indicazioni e il supporto del Dott.re Mattia di Nunzio.

Il protocollo digestivo utilizzato ha comportato l'utilizzo dei seguenti componenti:

- Soluzioni: Buffer digestivo, composto da 120 mM di NaCl , 5 mM di KCl e 6mM di CaCl₂ in 500ml di H₂O distillata portando la soluzione a pH 6.9 utilizzando KOH 0,5 M. Bicarbonato di sodio, soluzione 1,5 M di NaHCO₃ su 1L H₂O distillata. Acido cloridrico, HCl al 37%.
- Enzimi: concentrazioni rapportate al volume totale nelle rispettive fasi di utilizzo della digestione *in vitro*. α -amilasi (*Aspergillus oryza*, Sigma Life Science, U.S.A.), concentrazione finale di utilizzo 90U/ml nella digestione orale. Pepsina (Sigma Life Science, U.S.A.), concentrazione finale di 3 mg/ml nella digestione gastrica. Pancreatina (Sigma Life Science, U.S.A.), concentrazione finale di 0,4 mg/ml nella digestione duodenale e Bile (Sigma Life Science, U.S.A.), concentrazione finale di 2,4 mg/ml, nella digestione duodenale.
- Campioni: sulla base della sostanza secca, per ogni condizione sperimentale sono stati prelevati 29,7g di prodotto (9,9g da ogni replica), inducendo la masticazione meccanica (triturazione) attraverso un sistema multilame ("chopper") azionato per 10 secondi per ogni replica.

La digestione è stata simulata *in vitro* in modo statico attraverso l'uso di una beuta da 250ml mantenuta a 37°C tramite un bagno d'acqua posto su di un agitatore magnetico con piastra riscaldante (IKAMAG® C-MAG HS, equipaggiata con termometro sonda). Il pH dell'intero processo è stato valutato utilizzando un pHenomenal pH 1000L.

Per 1 g di sostanza secca dei campioni in analisi sono stati aggiunti i diversi volumi di buffer digestivo in rapporto 2:4:4 ml rispettivamente per la digestione salivare, gastrica e duodenale.

Per la digestione salivare i 29,7 g di campione triturati sono stati inseriti all'interno della beuta con 44 ml di buffer digestivo termostatato a 37°C con l'enzima α -amilasi. Il composto è stato agitato per 5 minuti. Successivamente sono stati aggiunti 88 ml del buffer gastrico termostatato a 37°C riducendo il pH 2.0 con HCl al 37%.

La digestione gastrica è stata avviata con l'aggiunta della pepsina, mantenendo il composto in agitazione per 60 minuti a 37°C Al termine, sono stati aggiunti 88 ml di buffer gastrico a 37°C portando poi il pH a 5 con 1,5 M di NaHCO₃.

L'ultima fase di digestione è iniziata con l'aggiunta della pancreaticina e della bile, portando in seguito il pH a 6 con 1,5 M di NaHCO₃, la digestione è proseguita in agitazione a 37° C per 180 minuti.

Al termine, i digeriti sono stati centrifugati a 4000 giri per 5 min a 4°C. I supernatanti sono stati filtrati con filtri trottola da 0,2 μ m ed conservati a -18°C.

6.7 Determinazione dell'attività antiossidante totale (TAA)

Questo metodo utilizza il catione radicale *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid* (ABTS). La metodica utilizzata proviene dal lavoro di Re. R *et al.*,(1999). Il protocollo ha comportato l'utilizzo delle seguenti componenti:

- Reagenti: PBS (Phosphate Buffer Solution) 5mM, ottenuto sciogliendo 0,815g di Na₂HPO₄·7H₂O e 0,271g di NaH₂PO₄·4H₂O portando a volume di un litro in matraccio con soluzione di NaCl 0,9%. Il pH della soluzione di PBS è stato portato a 7,4 con soluzioni diluite di H₃PO₄ (se alcalino) o NaOH (se acido). ABTS 2 mM, ottenuta sciogliendo 0,0110g di ABTS in H₂O distillata portando a volume di 10 ml su matraccio. K₂S₂O₈ 70 mM, ottenuto solubilizzando in 5ml di H₂O distillata 0,0946g di K₂S₂O₈. ABTS radicalizzato (ABTS^{•+}) prodotto dall'unione di 100 μ l di K₂S₂O₈ nella soluzione di ABTS 2 mM. La soluzione è stata agitata e posta al buio a

temperatura ambiente per almeno 6 ore così da permettere la completa generazione del radicale ABTS. Trolox 5mM, ottenuto per solubilizzazione di 0,0250g di Trolox in 20ml di etanolo 100% (conservato a -20°C).

- Curva di calibrazione: dalla soluzione 5mM di Trolox sono state preparate tre distinte soluzioni a 0,5, 1,0, 1,5 mM di Trolox in un volume finale di 1ml etanolo 100%. Bianco, 10µl e 990µl ABTS^{•+}.
- Campioni: sono state analizzate aliquote di 100µl dei digeriti. Bianco, 10µl e 990µl ABTS^{•+}
- Bianco in analisi: nessuna soluzione, aria.

Al momento dell'analisi l'ABTS^{•+} è stato diluito in rapporto 1:25 con PBS fino a ottenere una densità ottica (DO) a 734nm di $0,700 \pm 0,020$. Per la determinazione dell'attività antiossidante i campioni e le diverse soluzioni preparate (ABTS^{•+}, Trolox, Etanolo Assoluto e PBS) sono state termostatate a 30°C in bagnetto. Per la curva di calibrazione sono stati utilizzati, 10µl per ogni standard di Trolox (0,5, 1,0, 1,5 mM) con 990µl di ABTS^{•+}. Ogni standard è stato svolto in triplo. Invece per i campioni, sempre in triplo, 100µl del digerito tal quale con 900µl di ABTS^{•+}. Nella valutazione dell'assorbanza a 734nm per la curva di calibrazione e dei campioni, la preparazione di tutte le soluzioni è avvenuta all'interno della cuvetta alloggiata nello spettrofotometro, che, una volta aggiunto l'ABTS^{•+}, la lettura è stata avviata. Successivamente la soluzione è stata agitata con un apposita spatola per cuvetta, uniformando la reazione e leggendo l'assorbanza dopo 1 minuto dall'avvio.

Per la curva di calibrazione, il dato di inibizione percentuale degli standard di Trolox con l'ABTS^{•+} si ottiene con la seguente equazione:

$$\text{Inibizione percentuale Standard} = \frac{(\text{DO Bianco} - \text{DO Standard})}{\text{DO Bianco}} \times 100$$

Per il calcolo dell'attività antiossidante del campione con il reagente ABTS l'equazione utilizzata è la stessa utilizzata per lo Standard, moltiplicando per 10 in quanto i 100µl di campione sono da rapportare ad 1ml della soluzione totale.

Infine, per ottenere la TAA del campione si interpola l'assorbanza del campione con la curva di taratura, così da ottenere un concentrazione equivalente in mM TE (Trolox Equivalenti).

6.8 Quantificazione delle proteine totali con metodo Bradford

Il metodo rileva la presenza delle proteine attraverso il colorante (Coomassie Brilliant Blu) che si lega a residui di aminoacidi basici presenti nelle proteine.

Nella determinazione del contenuto proteico è stata inizialmente preparata una curva di calibrazione preparando 5 concentrazioni note di BSA (Albumina Bovina Sierica) con 2, 5, 10, 15, 20 µg/ml, partendo da una stock solution di BSA di 1mg/ml H₂O. Nelle diverse concentrazioni di BSA (rispettivamente: 2, 5, 10, 15, 20µl), è stata aggiunta H₂O distillata e 200µl del Comassie Brilliant Blue (G-250, Biorad) portando a volume totale di 1ml. Per la valutazione della retta di taratura, le concentrazioni, una volta preparate, sono state agitate e poste a riposo per 10 minuti. Per la quantificazione delle proteine dei digeriti gastrici sono state analizzate aliquote di 10 µL per ogni condizione sperimentale. Le soluzioni, come per la curva di calibrazione, sono state ottenute in sequenza unendo l'aliquota del campione, H₂O distillata e 200µl del comassie brilliant blue, ottenendo 1ml di volume finale. Le soluzioni sono state agitate e poste a riposo per 10 minuti.

La lettura della densità ottica, per curva di calibrazione e campioni, è avvenuta a 595nm tarando lo strumento con una soluzione di 800 µl di H₂O distillata e 200 µl di comassie brilliant blue. Il valore del contenuto proteico è stato ottenuto interpolando l'assorbanza del campione nella curva di taratura.

6.9 Elettroforesi SDS-PAGE

Nell'elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) sono stati analizzati i diversi

digeriti gastrici delle piadine tal quali, utilizzando aliquote di 10 μ L per ogni campione.

Nell'analisi è stato utilizzato un gel Mini-PROTEAN TGX Macchia-Fee™ Gel (Biorad, Milano) al 10%.

Come marker dell'analisi è stato utilizzato il Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards # (161-0375), preparato con una diluizione 1:10 ed utilizzato nella corsa con un volume di 5 μ L.

Il buffer utilizzato era composto da Tris 25mM, Glicina 192mM e SDS (Sodio Dodecil Solfato) 0,1% p/v. L'elettroforesi è stata condotta a 200mV per 20 min.

Dopo elettroforesi le proteine del gel sono state attivate con una esposizione a raggi UV per 5 min, il tutto poi trasferito su di una membrana di nitrocellulosa utilizzando un sistema Turbo Trans-Blot (Biorad, Milano). Per la fluorescenza delle proteine con metodo densitometrico è stato utilizzato uno Chemi Doc MP (Biorad, Milano) utilizzando il software dell'acquisizione dell'immagine Image Lab Rev 4.0.

6.10 Spettrometria al Plasma su HPLC-ICP-MS

Con la collaborazione del Dott. Francesco Cubadda dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) in Roma e del suo staff, sono state effettuate le analisi di speciazione del selenio attraverso l'utilizzo della strumentazione HPLC-ICP-MS (cromatografia liquida ad alta prestazione abbinata a spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente).

Le Separazioni cromatografiche sono state effettuate utilizzando un HPLC Perkin-Elmer Serie 200 LC con pompa binaria, auto campionatore e colonna termostata. L'uscita della HPLC, collegato direttamente tramite tubi capillari in PEEK per la nebulizzatore nell'Elan DRC II ICP - MS (Perkin-Elmer-Sciex, USA), permette al rilevatore specifico del selenio di svolgere una quantificazione totale o di effettuare un'analisi di speciazione. Le impostazioni strumentali sono in tabella 16.

ICP-MS settings	
RF power	1.4 kW
Nebulizer gas flow rate, Ar	1.04 L min ⁻¹
Lens voltage	9.0 V
DRC gas flow rate, CH ₄	0.7 mL min ⁻¹
Rejection parameter q (RPq)	0.45
Analytical masses	⁸⁰ Se (total Se/DRC mode), ⁷⁷ Se, ⁸² Se (Se speciation/standard mode)
Chromatographic conditions	
<i>Size exclusion chromatography</i>	
Column	Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare)
Mobile phase	Ammonium acetate 100 mM, pH 7.5
Flow rate	0.5 mL min ⁻¹
Injection volume	75 µL
Isocratic elution	0–60 min
Temperature	23 °C
<i>Anion exchange chromatography</i>	
Column	Hamilton PRP-X100 (250 mm × 4.1 mm, 5 µm) equipped with guard column
Mobile phase	(A) Acetic acid 20 mM, triethylamine 10 mM; (B) acetic acid 200 mM, triethylamine 100 mM
Flow rate	1 mL min ⁻¹
Injection volume	100 µL
Gradient elution	0–5 min: 100% A; 5–30 min: 0–100% B; 30–40 min: 100% B; 40–41 min: 0–100% A; 41–45 min: 100% A
Temperature	23 °C

Tabella 16: Parametri analisi HPLC-ICP-MS (Poonam Bhatia *et al.*, 2013)

Per la calibrazione della colonna di esclusione cromatografia è stato collegato un Perkin- Elmer DAD (Diod Array Detector) operativo a 280 nm. Per lo svolgimento dell'analisi sono stati utilizzati i seguenti reagenti e standard:

- acqua deionizzata ottenuta da un sistema Milli-Q Element (Millipore, Francia) utilizzato in tutte le fasi del lavoro,
- acido nitrico 68 % v/v (Carlo Erba Reagenti, Italia),
- perossido di idrogeno al 31 % v/v (Merck KGaA, Germania).

Le soluzioni di standard interno (rodio) utilizzati per le misurazioni totali di selenio sono state ottenuti da soluzioni stock certificate con un contenuto di 1 mg / ml (High Purity Standard, USA), diluiti con acidificanti (HNO₃) e acqua deionizzata se necessario.

Per l'analisi di speciazione, dalle soluzioni stock di 1 mg / ml, espressi in selenio, sono state preparate sciogliendo in acqua sufficienti quantità di acido di selenio Se (IV), acido selenico Se (VI) e Seleno-L- metionina (Sigma - Aldrich , USA). Le soluzioni madre degli standard sono state conservati a 4°C e diverse concentrazioni delle stesse sono state accertate mediante analisi ICP -MS. La purezza degli standard è stata controllata mediante HPLC - ICP –MS senza trovare delle interconversioni nelle diverse specie.

Le fasi mobili cromatografiche sono state preparate sciogliendo adeguate quantità analitiche di trietilammina (TEA-Sigma-Aldrich, USA) , acido acetico al 99 % (Baker Instra Analyzed, Avantor Material, Paesi Bassi) e di ammonio acetato (Merck KGaA , Germania) in acqua. Le diverse fasi mobili sono stati filtrati attraverso un Millipore Express Plus con membrana da 0.22 µm. Per la cromatografia di esclusione sono stati usati come calibratori, sulla base del peso molecolare decrescente, Blu destrano (200 kDa), albumina (66 kDa), anidrasi carbonica (29 kDa), citocromo c (12,4 kDa), aprotinin (6,5 kDa), vitamina B12 (1,3 kDa) e seleniometionina (0,2 kDa) (tutti della Sigma-Aldrich, USA).

L'analisi totale del selenio è stata misurata utilizzando, inizialmente, un Ethos Milestone Pro LabStation (FKV, Italia), microonde di digestione, effettuata per mezzo di serbatoi chiusi di quarzo, dotati di un sistema di controllo di temperatura a infrarossi. Circa 0,3 g dei campioni, in triplo tecnico, sono stati sottoposti ad 1 ora di pre-mineralizzazione con 3 ml di HNO₃ per poi aggiungere 1,5 mL di H₂O₂. Le irradiazioni del forno a microonde sono state effettuate con controllo di temperatura a regolazione automatica continua della potenza, con l'utilizzo del seguente programma: 37 min a raggiungimento di 180°C e 15 min a 180 C.

La misurazione totale del Se è stata effettuata nella Dynamic Reaction Cell (cella di reazione dinamica) utilizzando Rh come standard interno, il metodo ha visto l'aggiunta degli standard interni per la quantificazione, (condizioni operative in Tabella 16). La precisione della quantificazione del selenio è stata valutata attraverso il NIST 8436 ottenendo risultati soddisfacenti, il valore certificato era di $1.1 \pm 0.2 \mu\text{g Se / g}$ di peso secco, con una correttezza del dato del 91% . Il certificato di riferimento del materiale NIST “Semola Farina di frumento 8436” è stato incluso in ogni batch analitico per controllarne la qualità.

Le specie di Se liberate dalle simulazione di digestione gastrointestinale sono state caratterizzate dall'esclusione su HPLC-ICP-MS a scambio anionico. Le specie di selenio negli estratti sono stati identificati dal tempo di ritenzione in corrispondenza con le sostanze standard fuoriuscite assieme agli estratti del campione. I calcoli dei quantitativi sono stati basati sulle aree dei picchi. Misure sono state eseguite modalità seriale con le condizioni operative elencate in Tabella 2. I dati ottenuti sono stati trattati con il software della Perkin-Elmer Chromera.

6.11 Analisi Elettroforetica 2-DE

6.11.1 Preparazione della biomassa (pellet) dei batteri lattici

La preparazione del pellet cellulare per l'analisi 2-DE dei ceppi MR13 e 124a ha richiesto diversi stadi lavorativi suddivisi in:

- 1.** Inoculo di entrambi i ceppi in mMRS e incubazione per 24h a 37°C (1ml di un precedente inoculo già sviluppato in 9ml di terreno mMRS)
- 2.** Inoculo di 500µl della diluizione -1 (1ml in 9ml) dei ceppi cresciuti nello stadio 1 in 500ml di mMRS nelle condizioni di 90,02 mg/L di Na₂SeO₃ e Controllo senza Na₂SeO₃. L'inoculo è avvenuto in beute suddivise per il singolo ceppo ed è stato svolto in triplo biologico. Il tutto incubato a 37°C per 12 ore.
- 3.** Centrifugazione di 400-420ml a 4000 giri per 10 minuti a temperatura di 4°C (Beckman Coulter, AvantiTM J-25, rotore JA-10). Il pellet è stato successivamente risospeso con NaCl 0,85% nello stesso volume iniziale e centrifugato come in precedenza per ottenere il suo lavaggio. Eliminato il surnatante la biomassa ottenuta è stata conservata in sterilità a -40°C.

6.11.2 Preparazione dei campioni nell'analisi 2-DE

Per l'analisi elettroforetica bidimensionale, su indicazione dirette del gruppo di ricerca della Dott.sa Pessione, la preparazione dei campioni ha richiesto le procedure indicate nei seguenti paragrafi:

<< La biomassa del ceppo 124a è stato raccolta per centrifugazione e successivo lavaggio con 400mL di fisiologica allo 0,85 % di NaCl. Il pellet ottenuto è stato risospeso in 3 ml di una soluzione contenente 50 mM Tris-HCl a pH di 7,3 e EDTA 1 mM (maggiori dettagli vedere: Pessione *et al.*,2005, Pessione *et al.*,2009). I campioni sono stati supplementari con 15 microlitri/ml di nucleasi Mix (GE Healthcare) il tutto poi centrifugato (100000 giri per 1 ora a 4°C) utilizzando una centrifuga Beckman Ultracentrifuge L8-60M (Rotore di tipo 60). I surnatanti sono stati sottoposti a dialisi contro quattro volumi di acqua bidistillata . Gli estratti proteici sono stati precipitati con metanolo/cloroformio secondo Wessels e Flugge (1984) e disciolti in una soluzione reidratante composta da urea 6.5M, tiourea 2.2M, CHAPS 4% p/v, Tris-HCl 5 mM, tampone IPG 0,5% a pH 8.8 (GE Healthcare) e 100mm DTT 100mm . Le concentrazioni di proteine sono state valutate dal kit 2-D Quant (GE Healthcare). >>

6.11.3 Elettroforesi 2-DE

<< Le proteine sono state separate su strisce di 13 cm di IPG (GE Healthcare) caricando le stesse sulla base di un gradiente lineare dai 4 ai 7,35 µg di proteine. L'IEF (Integrated Isoelectric Focusing o focalizzazione isoelettrica integrata) è stata eseguita utilizzando IPGphor (GE Healthcare) ad una temperatura di 20°C, con 60000 Vh, dopo 10 ore di reidratazione degli estratti . Dopo l'IEF, le strisce sono state incubate a temperatura ambiente in urea 6M, glicerolo 30 % v/v, SDS 2% w/v, Tris-HCl 50 mM a pH 8.6 e arricchita dapprima con DTT 2 % p/v per 15 min e poi con il 4.5% p/v di iodoacetamide per 15 min . I campioni sono stati sigillati con un secondo gel misura verticali come descritto da: Pessione *et al.*,2005; e. Giuffrida *et al.*,2001). Per ogni campione, l'elettroforesi stata condotta

su gel omogenei di acrilamide con 11,5% T e 3,3% C (Acrilammide Biorad). Il tampone della corsa elettroforetica era composto da Tris 25 mM di, glicina 192 mM, SDS 0.1%. Le condizioni della corsa sono avvenute in sequenza a 11° C con tensione costante a 600 Volt, 20 mA/gel, successivamente a 60W per 15 min a 11°C poi 600 V a tensione costante, 40 mA /gel e infine 80W per circa 2,5 ore. I marcatori del peso molecolare utilizzati derivano dal Low Mr Electroforesisi Calibration Kit (GE Healthcare). I gel sono stati colorati automaticamente utilizzando un Processor Plus (Amersham Biosciences) con preparato fresco di Neuhoff (Comassie Blu colloidale) (Neuhoff *et al.*,1988) e sono stati essiccati in un essiccatore sottovuoto (GD 2000 Vacuum Gel Drier System, GE Healthcare).

>>

Capitolo 7: Analisi e discussione dei risultati

7.1 Screening dei batteri lattici per la selezione di ceppi ad elevata resistenza al selenio

Lo scopo di questa prima fase della sperimentazione è stato quindi quello di selezionare ceppi che avessero i requisiti tecnologici necessari per la realizzazione di un processo fermentativo in un ambiente fortemente condizionato dalla presenza di Selenio.

L'attività di selezione ha riguardato 15 ceppi appartenenti alla collezione del DISTAL ed isolati da prodotti fermentati per la maggior parte a base di cereali. In particolare i ceppi appartenevano alle seguenti specie:

- *Lb. plantarum* (ceppi: 133, 206, 124a, 5bhi, 98b, 98a, 189a e 8bhi)
- *Lb. fermentum* (ceppo: MR13)
- *Lb. sanfranciscensis* (ceppo: BB12)
- *Lb. rhamnosus* (ceppo: L-RH C1122)
- *Lb. casei e paracasei* (ceppi: 105, 91, 39, 25)

Sebbene sia stato da tempo riconosciuta l'importanza che il selenio possiede nella vita dei microrganismi (Sawers *et al.*, 1991; Kiffney e Knight, 1990), solo nell'ultimo decennio sono state approfondite le conoscenze dei diversi biochimismi del selenio nelle cellule batteriche.

Oggi giorno è ampiamente riconosciuto che tra i batteri lattici, se si trovano in ambienti con elevate concentrazioni di selenio, possiedono un importante meccanismo di disintossicazione che, riducendo il selenio da SeIV a selenio elementare atossico (Se0), osserva anche una sintesi di selenioproteine come seleniocisteina o seleniometionina, permettendo, in questo modo di attenuare l'effetto tossico del metallo verso i batteri e l'ambiente (Lamberti *et al.*, 2011,

Jasna Mrvčić *et al.*, 2012). In laboratorio, il meccanismo della disintossicazione del selenio nei batteri lattici da luogo ad un viraggio del colore della biomassa cellulare, dove il selenio elementare (Se⁰) si deposita a livello della membrana cellulare dei LAB.

Diversi lavori scientifici sulle connessioni tra batteri lattici e selenio, osservano questo cambiamento nella biomassa (Lamberti *et al.*, 2011; Shu Kai Xia *et al.*, 2007; Andreoni, V *et al.*, 2000; Doran J.W, 1982) convenendo che questo fenomeno prende luogo solo negli eccessi di selenio nel terreno di coltura, raggiungendo il picco massimo di detossificazione durante la fase stazionaria (Lamberti *et al.*, 2011).

Anche se in letteratura non esistono metodiche specifiche per la valutazione dell'influenza del Se sulla vitalità dei batteri lattici, è stato utilizzato un substrato sintetico ottimale (MRS) in presenza di diverse concentrazioni di selenio. In specifico sono stati utilizzati i parametri sia che stimano sia la capacità di moltiplicazione (attraverso la valutazione della Densità ottica –DO-) che l'attività metabolica (utilizzando la capacità di abbassare il pH del substrato). Al substrato è stato aggiunto selenio a diverse concentrazioni nel range: 2.19 a 175.20 mg/l Na₂SeO₃, confrontando i dati con una condizione di controllo senza selenio di sodio.

Si riporta un'immagine dimostrativa del processo fermentativo dei lattici in presenza di selenio di sodio che permetta il viraggio del colore del mezzo di coltura:



Esempio di organizzazione del selenio di sodio da parte del ceppo 124a su coltura liquida mMRS dopo 24 ore di fermentazione.

7.1.1 1° Screening

Su tutti i 15 ceppi considerati è stato realizzato un primo screening su due diverse concentrazioni di selenito di sodio (A: 2,19 mg/l Na_2SeO_3 e B: 4,38 mg/l Na_2SeO_3).

Nei risultati del 1° screening (grafici 2, 3 e 4) si possono osservare le curve dello sviluppo batterico in fase 1° e 2° dei 15 batteri lattici alle due diverse concentrazioni di selenito di sodio e alla condizione di controllo (senza selenito di sodio). Mentre nei grafici 5, 6 e 7 sono presenti i valori di pH nelle fasi 1° e 2° suddivisi nelle concentrazioni A, B e Controllo.

Una prima analisi delle curve di crescita nella fase 1 e 2 (grafico 2, 3 e 4) evidenzia le diverse performance dei 15 batteri lattici nelle prime fasi dello sviluppo. Le differenze si attribuiscono sostanzialmente alle diverse caratteristiche fisiologiche di crescita dei ceppi lattici che, come previsto, evidenziano in generale una minore velocità di moltiplicazione all'aumentare della concentrazione di selenito di sodio nel mezzo. Inoltre sono state osservate due condizioni, in cui, determinate concentrazioni di selenito di sodio miglioravano la dinamica di sviluppo, nella fattispecie per i ceppi 105, BB12 e MR13. Per i ceppi 98b e 5bhi,, in entrambe le concentrazioni A e B si è osservata la minore performance di crescita tra i 15 ceppi.

Nei grafici 5, 6 e 7 si possono osservare le variazioni del pH nelle due distinte fasi dei 15 ceppi lattici alle due concentrazioni ed il controllo. Nei dati del pH si osservano lievi differenze nelle performance di sviluppo dei lattici. Aspetto che sembra essere collegato principalmente alle diverse caratteristiche fisiologiche delle specie di batteri lattici coinvolte. Inoltre, analogamente a quanto osservato per la stima della crescita le due concentrazioni di selenito di sodio miglioravano la dinamica di diminuzione del pH, aspetto osservato a 18 ore nelle condizioni A e B soli per il BB12 e condizione A per 133.

A fine fase di incubazione cioè dopo 18 ore, per ogni condizione dei 15 ceppi è stato realizzato anche un conteggio in piastra delle cellule in grado di moltiplicarsi (Tab. 17). Si può osservare come le due concentrazioni di selenito di sodio utilizzate riducano, rispetto al controllo, il carico massimo di biomassa raggiunto.

Questo andamento si osserva per il ceppo 133, MR13, L-RH C1122, 91, 39, 189a e 8bhi e 206. Per i ceppi BB12 ,25, 124a, 105 e 98a (anche se statisticamente non significativo) si osserva invece un andamento opposto, in cui le conte cellulari delle due condizioni addittivate di selenito di sodio hanno una carica maggiore rispetto al controllo. Per i restanti ceppi, 98b, 5bhi, si osservano conte cellulari che per il 98b la concentrazione minore influenza positivamente la carica microbica finale al controllo, mentre al contrario avviene per la concentrazione maggiore. Un comportamento strano è invece stato osservato per il ceppo 5bhi in cui la concentrazione maggiore di selenio sembra influenzare positivamente il carico raggiunto alla fine delle 18 ore di incubazione.

La valutazione congiunta dello sviluppo alle due concentrazioni di selenito di sodio, sia tramite densità ottica che considerando le conte cellulari (Tab. 17) ha permesso di selezionare, nella valutazione delle performance di crescita e sviluppo su piastra i ceppi per il 2° Screening, ovvero: 133, MR13, BB12, L-RH C1122, 206, 124a, 105 e 98b. Nel conteggio i ceppi selezionati, a seconda delle concentrazioni A e B, possedevano valori di conta cellulare superiori rispetto al controllo.

7.1.2 2° Screening

Utilizzando la stessa metodica applicata nel primo screening, sugli 8 ceppi selezionati è stato realizzato un secondo screening su un più ampio range di concentrazioni di selenito di sodio che andavano da 2,19 a 175.20 mg/l Na_2SeO_3 . In particolare le concentrazioni di selenito di sodio adottate erano: A= 2,19 mg/l, B=4.38 mg/l, C=8.76 mg/l, D=17.52 mg/l, E=21.90 mg/l, F=43.80 mg/l, G=87.60 mg/l e 175.20 mg/l di selenito di sodio. Dal grafico 8 al grafico 25 si possono osservare le curve di crescita degli 8 ceppi selezionati raggruppati per ognuna delle otto diverse concentrazioni di selenito di sodio utilizzate, inclusa, ovviamente, la condizione di controllo senza selenito di sodio.

Sommariamente, il secondo screening ha permesso di evidenziare come le maggiori concentrazioni di selenito di sodio influenzino lo sviluppo. Se

consideriamo le prime 5,5 ore, si può notare che i ceppi 124a, MR13, 98b e il 133 possiedono le migliori performance di crescita iniziale.

In particolare, il ceppo 124a presenta valori di DO, nelle prime 5,5 ore, superiori ai rimanenti ceppi, tuttavia, i suoi valori rimangono al di sotto dello stesso controllo. Nello specifico presenta valori inferiori al suo controllo del: 9.04%, 8.59%, 12.40%, 22.42%, 22.64%, 23.39% 25.71% e 48.97% delle rispettive concentrazioni A, B, C, D, E, F, G, H. Risulta quindi chiaro l'effetto inibente del selenio all'aumentare della sua concentrazione. Mentre, per il ceppo MR13 l'andamento, rispetto al controllo, nelle rispettive concentrazioni risulta essere inferiore del 14.17%, 3.73%, 9.80%, 7.25%, 6.57%, 2.30%, 6.72% e 50.39% delle rispettive concentrazioni A, B, C, D, E, F, G, H. Per i restanti ceppi non si apprezzano variazioni di rilievo rispetto ai controlli.

All'aumentare del tempo di incubazione (dalle 16 alle 18 ore) le performance di crescita dei batteri lattici presentano andamenti diversi rispetto alla fase iniziale. I ceppi BB12 e 206, mostrano, ridotte performance di sviluppo tra gli 8 ceppi in confronto. Il ceppo 124a nelle concentrazioni A, B, C e D (Grafici: 8, 9, 10, 11) presenta una DO superiore rispetto ai restanti ceppi, eccezion fatta per la lettura a 18 ore nella concentrazione D superato dal ceppo 105. Proseguendo, il ceppo 105 presenta, nella crescita a 87,60 mg/L (Grafico 14), un valore di DO superiore rispetto ai ceppi restanti. Come risulta dal grafico 15, alla massima concentrazione di selenito di sodio utilizzata (175.20 mg/L) si sono evidenziate differenze molto più marcate tra i ceppi utilizzati. Si osserva come l'elevata concentrazione di selenito di sodio abbia notevolmente influenzato l'attività metabolica dei batteri lattici ad eccezione del ceppo MR13. Questa concentrazione ha indotto un aumento nelle divergenze di sviluppo tra i batteri lattici in studio, aspetto non osservato in modo rilevante condizioni a minore concentrazione.

Per quello che riguarda la dinamica di diminuzione del pH si è osservato solo un lieve calo nell'acidificazione del mezzo mMRS da parte dei batteri lattici all'aumentare della concentrazione di selenito di sodio, osservabile in entrambe le fasi (dal grafico 17 al 25). Più specificamente l'aggiunta del selenito di sodio al substrato ha influenzato negativamente l'attività metabolica in maniera abbastanza

evidente solo alla maggior concentrazione di selenio utilizzata (175.20 mg/L) come risulta dal grafico 24.

La valutazione delle diverse performance di crescita nell'ultimo screening ha permesso la selezione dei ceppi 124a e MR13 appartenenti rispettivamente alle specie *Lb. plantarum* e *Lb. fermentum*. Tali ceppi sono stati utilizzati successivamente per la produzione di un alimento funzionale a base di cereali ottenuto tramite l'utilizzo di un impasto acido addizionato di selenio.

7.1.3 Elettroforesi bidimensionale

Al fine di verificare la capacità dei ceppi selezionati di rispondere all'aggiunta di concentrazioni non tossiche di selenio sono state realizzate delle elettroforesi 2D per evidenziare la eventuale presenza di specifiche proteine da stress legate alla presenza del selenio. Nelle figure 32 e 33 sono riportati due esempi di gel in cui appaiono chiaramente degli spot nel campione (ceppo 124a) cresciuto in terreno sintetico addizionato di selenio di sodio.

7.2 Formulazione delle piadine

Lo studio dell'implementazione dell'impasto acido funzionale al selenio è stato condotto sul modello piadina. Tale prodotto che potrebbe apparire locale e di nicchia rappresenta una delle tipologie di pane più diffuse nel mondo "flat bread". Infatti a livello mondiale, si stima che circa 1.8 miliardi di persone consumino pani piatti, di diverse tipologie. La loro semplicità e versatilità d'utilizzo e ne hanno garantito la sopravvivenza da migliaia di anni.

Le tendenze del mercato moderno, spingono le industrie del bakery a sviluppare prodotti da forno con nuovi valori aggiunti come elevate proprietà nutrizionali o shelf-life prolungate, il tutto sviluppato sulla filosofia dell' "additive-free" e della naturalità. La ricerca e sviluppo rispondendo alle necessità del mercato ha incrementato nei prodotti da forno le proprietà nutrizionali, elevando i contenuti di fibre o antiossidanti oppure riducendo i contenuti di grassi e colesterolo. Altri approcci innovativi sono stati l'uso di oli essenziali o antimicrobici naturali di

origine batterica che permetto, naturalmente, di aumentare la shelf-life dei prodotti riducendo i metodi chimici di conservazione.

Nel grafico 1 (capitolo 6, Materiali e metodi) è riportato lo schema di preparazione e la formulazione delle piadine sperimentali. Nel grafico 26 è riportato il pH misurato dopo l'aggiunta del preinoculo alla farina, all'inizio cioè della fermentazione dell'impasto acido (T0). Al T0, quindi gli impasti acidi MR13 e 124a mostrano un valore che si attesta, rispettivamente, al pH di 5,47 e 5,39 che risultano valori simili se si considera la deviazione standard. A fine fermentazione (T24), il valore si riduce al pH di 3,29 per MR13 e 3,33 per 124a, evidenziando rispettivamente una diminuzione di più di due unità, che rappresenta un effetto consueto in queste matrici. Per il conteggio microbiologico (Tab. 18, A), la carica risultante osservata per il T0 risulta essere simile in MR13 e 124a se si considerano le rispettive deviazioni standard e si attesta su 8,582 e 8,737 Log CFU/g. Dopo le 24 ore a 37°C la carica risultate al T24 mostra un lieve aumento nei due impasti acidi con valori simili se si considerano le deviazioni standard.

Nella fase di fermentazione dell'impasto acido (con e senza selenito di sodio) dopo l'aggiunta del preinoculo di impasto acido è stata valutata la diminuzione del pH al T0 e T24 (Grafico 27). Infatti, l'impasto acido senza selenio, contenente MR13 e 124a, mostra al T0 valori di 4,27 e 4,30 rispettivamente, mentre per le condizioni con selenito di sodio, MR13+Na₂SeO₃ e 124a+Na₂SeO₃, i valori al T0 si attestano, per entrambi a 4,26. A fine fermentazione (T24) i valori delle quattro condizioni si attestano su pH di 3.32, 3.34, 3,34, 3,39 rispettivamente per MR13, MR13+Na₂SeO₃, 124a, 124a+Na₂SeO₃. Tale risultato evidenzia un andamento simile a quello osservato nel preinoculo nonostante nell'impasto della piadina fosse presente selenito di sodio. Questa osservazione conferma che i ceppi selezionati nella fase precedente condotta "in vitro" sulla base della loro capacità di crescere in un mezzo di coltura addizionato di selenio, non hanno subito nessun effetto inibente dalla presenza di selenito di sodio neanche nell'impasto, mantenendo così la loro capacità metabolica anche nel substrato farina. Nel conteggio microbiologico (Tab.18) le cariche cellulari al T0 presentano andamenti disomogenei dovuti sia alla diversa capacità di crescita dei preinoculi che alla difficoltà di standardizzare alcune fasi operative di preparazione delle piadine.

Negli impasti acidi ottenuti dall'attività fermentativa del preinoculo (Tab. 18, A) l'MR13 sembra avere una maggiore capacità di moltiplicarsi rispetto al ceppo 124a ma entrambi raggiungono carichi molto elevati (intorno agli 8 Log CFU/g). Quando il preinoculo di impasto acido si aggiunge all'impasto acido utilizzato nella formulazione delle piadine (Tab. 18, A) l'elevato carico presente già al T0 non aumenta durante le 24 ore di fermentazione anche in assenza di selenito di sodio. Ciononostante il pH diminuisce in seguito a fermentazione di 24 ore da livelli tra 4.2 e 4.3 a livelli di pH tra 3.3 e 3.4 (Grafico 27). Le piadine cotte, per gli stessi campioni (Grafico 28), evidenziano un pH di 6,11, 6,19, 4,10 e 4,18 rispettivamente per i campioni MR13, 124a, MR13+Na₂SeO₃ e 124a + Na₂SeO₃. I rispettivi conteggi cellulari (Tab. 18, C) presentano andamenti che evidenziano come l'intenso processo di cottura abbia abbassato drasticamente, in tutte le condizioni, la vitalità cellulare dal campione crudo al cotto anche se non l'abbia completamente annullata. Nel confronto fra gli impasti crudi le condizioni con impasto acido in formulazione presentano, comprensibilmente, elevati carichi cellulari se comparati con le rispettive condizioni senza selenio. Nel prodotto cotto, si osserva come l'uso degli impasti acidi, per entrambi i ceppi, permetta dopo il processo di cottura di avere carichi cellulari superiori rispetto ai controlli. Il valore della sostanza secca delle piadine (Grafico 29) si attesta, per entrambe le 4 condizioni sperimentali di piadina, in un range che va dal 72,08% dell'Ctq al 75,72% del CSe. In media, tra le quattro condizioni, il valore si attesta al 74,23%

7.3 Studio dell'influenza del processo fermentativo su alcune caratteristiche funzionali delle piadine arricchite di selenio

Al fine di capire l'effetto delle variabili studiate sono state analizzate le piadine sperimentali dopo un processo di digestione *in vitro* di tipo statico che includeva sia la fase gastrica che quella intestinale. Le simulazioni in laboratorio del processo digestivo *in vitro* permettono di ricalcare attendibilmente ciò che avviene all'interno dell'apparato digerente umano. Questo processo, nelle sue diverse fasi: salivare, gastrica e duodenale, permette la disgregazione dei macro e micro nutrienti dell'alimento, ciò, nelle analisi su linee cellulari e non, consente una

comprensione più realistica delle risposte fisiologiche per le componenti nutritive del digerito. Inoltre, tale approccio, amplia le conoscenze delle diverse interazioni che avvengono tra l'alimento e il tratto digerente umano a differenza delle consuete analisi sui prodotti finiti che possono, in molti casi, conseguire a risultati senza tenere conto delle diverse trasformazioni digestive che potrebbero alterare le proprietà dell'alimento inducendo una diversa risposta fisiologica. Abbiamo infatti voluto studiare l'interazione del processo fermentativo con il selenio aggiunto su vari aspetti: liberazione di peptidi, solubilità delle proteine, capacità antiossidante e modificazione delle specie chimiche del selenio. La digestione in vitro dei campioni di piadina è stata condotta dal gruppo di Nutrizione Umana della dott.ssa Bordoni.

7.3.1 Elettroforesi SDS-PAGE e analisi densitometrica su digeriti gastrici di piadina

Nella figura 31 si riporta l'elettroforesi SDS-PAGE per la separazione delle differenti frazioni proteiche dei campioni studiati che sono stati confrontati sulla base delle rispettive bande e del marker, Precision Plus Protein™ (Capitolo 6, paragrafo 6.9). L'analisi riscontra, per tutte le condizioni, una rilevante presenza di peptidi solubili a basso peso molecolare (tra i 5/10 KDa).

Nel grafico 31 si riporta l'analisi densitometrica della SDS-PAGE, confrontando la fluorescenza relativa delle proteine in confronto percentuale con il campione CTq. I dati sono stati elaborati attraverso l'analisi statistica su programma R (edizione 3.0.1), utilizzando il test statistico ANOVA con post-test dei contrasti di Dunnet. La valutazione della significatività statistica è stata ricercata nel confronto fra la condizione CTq con le restanti.

I campioni CTqSD e CSeSD presentano entrambi una significativa statistica ($P < 0.001$) rispetto al campione CTq. Si osservano aumenti percentuali del 32,33% per CTqSD e 27,45% per CSeSD rispetto al campione CTq. Nel confronto fra CTqSD e CSeSD si osserva, per il secondo, una riduzione percentuale del 3,68%. Dall'analisi statistica non si osserva nessuna differenza significativa tra il campione CSe e CTq.

E' noto che una fermentazione lunga ad opera di batteri lattici, in questo caso, presenti addirittura livelli superiori a 8 cicli logaritmici determinando un'idrolisi delle proteine tale da giustificare l'aumento della loro solubilità. Oltre che migliorare la digeribilità e il valore nutrizionale, tale processo proteolitico libera peptidi e aminoacidi che aumentano le caratteristiche aromatiche favorendo la formazione di composti della reazione di Maillard che avviene durante la cottura. Nel nostro caso è importante evidenziare che la presenza di selenio non ha determinato una riduzione apprezzabile di tale attività enzimatica.

7.3.2 Contenuto proteico con metodo Bradford

Nel grafico 32 si riporta il contenuto proteico ottenuto con metodo Bradford espresso in µg di proteine su ml di soluzione. I dati sono stati elaborati con lo stesso metodo attuato nell'analisi densitometrica.

L'analisi statistica indica che le condizioni sperimentali con impasto acido, CTqSD e CSeSD, possiedono un contenuto proteico significativamente superiore ($p < 0.001$) rispettivamente del 106,09% e 94,84% rispetto al campione CTq. Tra CTqSD e CSeSD la variazione è del 5,14%. Tra le due condizioni senza uso di impasto acido, CTq e CSe, non è stata rilevata alcuna differenza significativa confermando quanto detto prima rispetto alla capacità proteolitica dei microrganismi indipendentemente dalla presenza di selenio.

7.3.3 Capacità antiossidante totale sul digerito gastrico (TAA)

Nel grafico 30 si riporta la capacità antiossidante totale dei digeriti gastrici espressa come mM di Trolox equivalenti. I dati sono stati elaborati con lo stesso metodo utilizzato nell'analisi densitometrica.

Nella valutazione statistica solamente il CSeSd mostra una TAA con differenza significativa ($p < 0.05$). Per i restanti campioni non si riscontrano differenze significative con il campione CTq. Questo dato rappresenta un'indicazione molto interessante in quanto ci permette di ipotizzare che possa esserci un'azione sinergica tra selenio e prodotti della fermentazione lattica che determina un

aumento della capacità antiossidante del campione. Se, sulla base di questi risultati, consideriamo che il selenio non abbia influenzato nè positivamente nè negativamente l'entità dello sviluppo microbico, diventa interessante invece sapere se ci sia stata una sua influenza nel metabolismo microbico in termini di selezione delle specie chimiche del selenio presenti ed in particolare di quelle organiche che potrebbero dipendere dalla specificità dei batteri lattici coinvolti.

7.3.4 Studio dell'influenza del processo fermentativo del pattern di speciazione del selenio tramite spettrometria al plasma in HPLC-ICP-MS

Per meglio comprendere i biochimismi del selenio nei batteri lattici in studio, *Lb. fermentum* (MR13) e *Lb. plantarum* (124a), durante un processo fermentativo, sono state condotte delle analisi di speciazione del selenio in HPLC-ICP-MS. Tale approccio analitico consente di realizzare una discriminazione quali-quantitativa dei diversi composti del selenio presenti, nel nostro caso, nei digeriti gastrici delle diverse condizioni sperimentali di piadina. Quest'aspetto, nella specificità dei risultati, permette di osservare le performance di organizzazione dei batteri lattici nella comparazione dei diversi composti organici ed inorganici presenti nel mezzo.

Nelle tabelle 19 e 20 sono riportati i risultati dell'analisi di speciazione condotta tramite HPLC-ICP-MS. L'analisi è stata realizzata sui campioni di piadina finiti sottoposti a digestione in vitro come sopra descritta. Inoltre i digeriti sono stati microfiltrati con cut-off <3KDa al fine di studiare il contenuto di selenio nella componente a più basso peso molecolare. Tale componente infatti rappresenta la parte con maggiori probabilità di essere assorbita a livello intestinale quindi rappresenta la componente più bioaccessibile del digerito. Tale tecnica ha permesso di identificare le 4 specie di selenio principali:

- selenio-metil cisteina (MeSeCys)
- selenio metionina (SeMet)
- diossido di selenio (SeIV)
- triossido di selenio (SeVI)

Dai risultati ottenuti si può osservare che (Tab.19, Somma specie e TOT ICP-MS) nei digeriti totali sono state rilevate concentrazioni molto superiori di selenio rispetto alle frazioni a basso peso molecolare indipendentemente dal fatto che fosse selenio naturalmente presente (Tab.19, campioni: CTq <3KDa, CTq, CTqSD <3KDa e CTqSD) o campioni in cui il selenio era stato aggiunto (Tab.19, campioni : CSe <3KDa, CSe, CSeSD <3KDa e CSeSD). Tale caratteristica è stata osservata anche nei campioni fermentati con batteri lattici evidenziando che apparentemente non c'è un effetto del processo fermentativo sulla ripartizione delle specie di selenio nelle frazioni di digerito considerate (<3KDa) in confronto a tutto il digerito. Se invece consideriamo la ripartizione tra le 4 diverse forme di selenio nella frazione a basso peso molecolare rispetto al totale del digerito si possono osservare alcune differenze importanti. Nei campioni CTq e CTqSD il selenio è costituito solo da quello naturalmente presente, rappresentato circa per il 25-30% della forma inorganica SeVI ed il 55-65% di quella organica. Il processo fermentativo tramite impasto acido aumenta la quantità di SeMet (selenio metionina), nella piadina mentre la MeSeCys, seppur presente nel campione CTq, sparisce completamente quando viene utilizzato un impasto acido (CTqSD) ad opera di possibili biotrasformazioni che avvengono nel processo fermentativo. Quando alla farina viene aggiunto selenito di sodio, la maggior parte del selenio è presente nella forma inorganica (SeIV) nei campioni dei digeriti totali e della frazione <3KDa (rispettivamente l'84% e 85% del selenio totale). Quando si realizza una fermentazione tramite impasto acido arricchito durante la sua maturazione di selenio inorganico (selenito di sodio), la componente inorganica diminuisce drasticamente sia nel digerito totale che nella frazione <3KDa che risultano rispettivamente il 35 ed il 40% del totale. Contemporaneamente è risultato un evidente incremento della componente organica rappresentata per la maggior parte dalla SeMet che assieme alla MeSeCys rappresentano il 51% e il 53% del selenio totale rispettivamente nel digerito totale (CSeSD) e nella frazione <3KDa (CSe<3KDa).

In termini assoluti l'aggiunta di selenio alla farina attraverso un impasto acido arricchito non modifica la quantità di selenio organico presente nel digerito, tuttavia la quantità di selenio inorganico rilevato nei digeriti di piadina ottenuta

con impasto acido è risultata essere drasticamente ridotta. Non avendo rilevato un analogo incremento della forma inorganica si possono fare due ipotesi: 1) i processi di digestione in vitro e le fasi preparative dell'analisi HPLC-ICP-MS portano a perdere la maggior parte della frazione inorganica del selenio; 2) le specie organiche derivanti dalla fermentazione tramite impasti acidi non sono state identificate perché non conosciute e quindi non confrontabili con specie presenti nel data bank disponibile.

Capitolo 8: Conclusioni

Recentemente è stato riscontrato un crescente interesse nello studio dell'interazione tra batteri lattici e ioni metallici e i microelementi presenti in tracce. La loro riscontrata capacità di bioassorbire, bioaccumulare e biotrasformare tali elementi ne ha reso molto interessante l'applicazione nel settore alimentare sia per la possibilità di rimuovere metalli da acqua o alimenti liquidi che per la possibilità di produrre alimenti arricchiti e sia per l'alimentazione animale che per quella umana. Infatti l'incorporazione di selenio in ceppi probiotici ha dimostrato di aumentare la loro attività contro *E.coli*. I *Lb. casei* e *Lb. rhamnosus* arricchiti di selenio hanno dimostrato un efficace riduzione nella tossicità del Cadmio. *Lb reuteri* e *Lb rhamnosus*, come altri probiotici, si sono rivelati in grado di migliorare lo stato ossidativo grazie all'arricchimento con selenio.

Dalla mia sperimentazione ho ottenuto molteplici indicazioni che riguardano la possibilità di produrre un alimento fermentato a base di cereali ed elevato contenuto di selenio bioattivo.

In particolare, ho riscontrato che la capacità di crescere in presenza di elevate concentrazioni di selenio (come selenito di sodio) è un carattere abbastanza comune nei ceppi del genere *Lactobacillus* studiati. Questo rappresenta un importante aspetto applicativo in quanto precedentemente è stato riscontrato che in altri prodotti fermentati la scarsa resistenza degli starter appartenenti al genere *Lactobacillus* rappresentava un fattore limitante per la realizzazione del processo fermentativo contestualmente alla biorganicazione del selenio. Inoltre l'aggiunta di selenio alla farina attraverso un impasto acido arricchito non ha aumentato la quantità di selenio organico presente nel digerito, ma ha drasticamente ridotto la componente inorganica rispetto ad una aggiunta diretta sulla farina. Questo rappresenta un aspetto molto interessante in quanto a parità di selenio aggiunto la componente bioattiva rappresenta la maggior parte.

E' importante sottolineare che tali considerazioni, anche se vanno confermate con prove *in vivo*, rappresentano indicazioni importanti perché ottenute non

sull'alimento tal quale ma dopo la sua digestione, che, seppure effettuata *in vitro*, ha un certo valore predittivo. Ulteriori aspetti da chiarire vanno cercati sia nel miglioramento delle performances analitiche che nell'identificazione delle specie di selenio presenti.

Dal punto di vista applicativo questo lavoro costituisce una base sia per la comprensione del ruolo dei processi fermentativi nell'individuazione di alimenti o ingredienti innovativi di tipo funzionale ma anche per la produzione di nuovi microrganismi probiotici in grado di migliorare lo stato ossidativo o prodotti nutraceutici ricchi di selenio bioattivo .

Bibliografia

- **A.C. Nielsen - Nucci S. (2009)**. “L’industria alimentare italiana e gli alimenti funzionali” presentazione al convegno: “L’industria alimentare italiana e gli alimenti funzionali: la tradizione presenta il benessere”, 11 Giugno 2009, Federalimentare, Milano.
- **Aidepi (2013)**: Sito web: <http://www.foodweb.it/2012/07/aidepi-bilancio-2011-positivo-per-pasta-e-dolci/>.
- **Alina Kabata-Pendias, Arun B. Mukherjee, (2007)**. Trace Elements From Soil to Human, Springer; 1 edition.
- **Alwazeer, D., Cachon, R., Divies C. (2002)**. Behavior of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* in fresh and thermally processed orange juice. *Journal of food protection*, **65** (10) : 1586-1589.
- **Alzate A., Pérez-Conde M.C., Gutiérrez A.M. , Cámara C. (2010)**. Selenium-enriched fermented milk: A suitable dairy product to improve selenium intake in humans. *International Dairy Journal*, **20** : 761-769.
- **Alzate, A., Fernandez-Fernandez, A., Perez-Conde, M. C., Gutierrez, A. M. et al., (2008)**. Comparison of biotransformation of inorganic selenium by *Lactobacillus* and *Saccharomyces* in lactic fermentation process of yogurt and kefir. *J. Agric. Food Chem*, **56** : 8728–8736.
- **Antonelli G. (1996)**. Il mercato dei prodotti dell’agricoltura biologica: un’indagine in un’ottica di marketing. *Economia Agro-Alimentare*, n. 1.
- **Arienti Giuseppe, (2010)**. Le basi molecolari della nutrizione, edizione 3, Piccin-Nuova Libreria.
- **Arthur, J. R., (2003)**. Selenium supplementation: does soil supplementation help and why? *Proc. Nutr. Soc.* **62** : 393–397.
- **Ashour MN, Salem SI, El-Gadban HM, Elwan NM & Basu TK, (1999)**. Antioxidant status in children with protein - calorie malnutrition

- (PEM) living in Cairo, Egypt. *European Journal of Clinical Nutrition*, **52** : 669-673.
- **ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), (2002b)**. Draft toxicological profile for selenium. *U.S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA*.
 - **Barclay Margaret N.I. , MacPherson Allan , Dixon James, (1995)**. Selenium Content of a Range of UK Foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, Volume **8**, Issue **4** : 307–318.
 - **Barrington JW, Lindsay P, James D, Smith S & Roberts A (1996)**. Selenium deficiency and miscarriage: a possible link. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. **103** : 130-132.
 - **Beck MA (1997)**. Rapid genomic evolution of a non-virulent Coxsackievirus B3 in selenium-deficient mice. *Biomedical and Environmental Science*, **10** : 307-315.
 - **Beck MA, Kolbeck PC, Rohr LH, Morris VC & Levander OA (1994a)**. Benign human enterovirus becomes virulent in selenium-deficient mice. *Journal of Medical Virology*, **43** : 166-170.
 - **Beck MA, Kolbeck PC, Shi Q, Rohr LH, Morris VC & Levander OA (1994b)**. Increased virulence of a human enterovirus (Coxsackievirus B3) in selenium-deficient mice. *Journal of Infectious Diseases*, **170** : 351-357.
 - **Beck MA, Shi Q, Morris VC & Levander OA (1995)**. Rapid genomic evolution of a non-virulent Coxsackievirus B3 in selenium-deficient mice results in selection of identical virulent isolates. *Nature Medicine* **1**, 433-436.
 - **Belletti G. – Marescotti A. (1996)**. Le nuove tendenze nei consumi alimentari. *Quaderni della Rivista di Economia Agraria*, n. 21, Bologna, Il Mulino.
 - **Beneduce, L., Spano, G., Vernile, A., Tarantino, D., Massa S. (2004)**. Molecular characterization of lactic acid populations associated with wine spoilage. *Journal of Food protection*, **44** (1) : 10-16.
-

Bibliografia

- **Bierla K, Dernovics M, Vacchina V, Szpunar J, Bertin G, and Lobinski R, (2008).** Determination of selenocysteine and selenomethionine in edible animal tissues by 2D size-exclusion reversed-phase HPLC-ICP MS following carbamidomethylation and proteolytic extraction. *Anal Bioanal Chem* 390: 1789–1798.
- **Böcker, G., Stolz, P., & Hammes, W. P. (1995).** Neue Erkenntnisse zum Ökosystem Sauerteig und zur Physiologie des Sauerteig-Typischen Stämme *Lactobacillus sanfrancisco* und *Lactobacillus pontis*. *Getreide Mehl und Brot*, 49 : 370-374.
- **Bopp BA (1982).** Metabolic fate of selected selenium compounds in laboratory animals and man RC Sonders. *Drug Metab Rev*, 13 : 271–318.
- **Borcha, E., Kant-Muermansh, M.L., Blixta, Y. (1997).** Bacterial spoilage of meat and cured meat productions. *International Journal of Food Microbiology*, 33 (1) : 103-120.
- **Brandt, M.J., Roth, K., Hammes, W.P., (2003).** Effect of an exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH 729 on dough and bread quality. In: de Vuyst, L. (Ed.), *Sourdough from Fundamentals to Application*. Vrije Universiteit Brussels (VUB),IMDO, p. 80.
- **Brandt,M.J.,(2001).** Mikrobiologische Wechselwirkungen von technologischer Bedeutung in Sauerteigen. Dissertation, Universität Hohenheim, Stuttgart, Germany.
- **British Nutrition Foundation, (2001).** Briefing Papers: Selenium in Health. *British Nutrition Foundation*, London, p.5.
- **Brown KM, Pickard K, Nicol F, Beckett GJ, Duthie GG, Arthur JR (2000)** Effects of organic and inorganic selenium supplementation on selenoenzyme activity in blood lymphocytes, granulocytes, platelets and erythrocytes. *Clin Sci*, 98 : 593–599.
- **Bryszewska M. A., Ambroziak W., Diowksz A., Baxter M. J., Langford N. J. e Lewis D. J. (2005).** Changes in the chemical form of

selenium observed during the manufacture of a selenium-enriched sourdough bread for use in a human nutrition study, *Food Additives and Contaminants*, **22(2)** : 135–140.

- **Burk RF, Pearson WN, Wood RP & Viteri F (1967)**. Blood selenium levels and in vitro red blood cell uptake of ⁷⁵Se in kwashiorkor. *American Journal of Clinical Nutrition*, **20** : 723-733.
- **Calderon M, Loiseau G, Guyot JP. (2003)**. Fermentation by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 of different combinations of carbohydrates occurring naturally in cereals: consequences on growth energetics and α -amylase production. *Inter J Food Microbiol*, **80** : 161–69.
- **Calomme M, Hu J, van den Branden K & van den Berghe DA (1995a)**. Seleno-Lactobaccillus. An organic selenium source. *Biological Trace Elements Research* **47**: 379-383.
- **Calomme M, van den Branden K & Van den Berghe DA (1995b)**. Selenium and Lactobaccillus species. *Journal of Applied Bacteriology* **79**, 331-340.
- **Calomme, M.; Hu, J.; Van den Branden, K.; Vanden Berghe, D. A (1995)**. Seleno-lactobacillus. An organic selenium source. *Biol. Trace Elem. Res*, **47** : 379-383.
- **Carnevali P., Ciati R., Leporati A., Paese M, (2007)**. Liquid sourdough fermentation: Industrial application perspectives. *Food Microbiology*, **24**: 150–154.
- **Chasteen, T. G.; Bentley, R (2003)**. Biomethylation of selenium and tellurium: Microorganisms and plants. *Chem. Rev*, **103** : 1-25.
- **Chavan RS, Jana A. (2008)**. Frozen dough for bread making – a review. *Intern J Food Sci, Technol Nut*, **2** : 9–27.
- **Christensen, J.F., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L. (1999)**. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, **76** : 217-246.
- **Clark LC, Combs GF Jr, Turnbull BW, Slate E, Alberts D, Abele D, Allison R, Bradshaw J, Chalker D, Chow J, Curtis D, Dalen J, Davis L, Deal R & Dellasega M, et al. (1996)**. The nutritional prevention of

cancer with selenium: a randomized clinical trial. *Journal of the American Medical Association*, **276** : 1957-1963.

- **Clark LC, Dalkin B, Krongrad A, Combs GF Jr, Turnbull BW, Slate EH, Witherington R, Herlong JH, Janosko E, Carpenter D, Borosso C, Falk S & Rounder J (1998)**. Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: Results of a double-blind cancer prevention trial. *British Journal of Urology*, **81** : 730-734.
- **Collar, C., Benedito de Barber, C., Martí'nez-Anaya, M.A., (1994a)**. Microbial sourdoughs influence acidification properties and breadmaking potential of wheat dough. *J. Food Sci.* **59** : 629–633.
- **Collar, C., Mascaros, A. F., & Benedito de Barber, C. (1992)**. Aminoacid metabolism by yeasts and lactic acid bacteria during bread dough fermentation. *Journal of Food Science*, **57**: 1423-1427.
- **Combs G.F. Jr., (2001)**. Selenium in global food systems. *British Journal of Nutrition*, **85**: 517-547.
- **Combs GF Jr & Combs SB (1986a)**. Selenium in the environment. In *The Role of Selenium in Nutrition*, pp. 15-40, New York, NY Academic Press.
- **Conor, R. (2006)**. Selenium in Food and Health. Second Edition, Springer.
- **Consumer Confidence Survey (2011)**. Citato da Nielsen (2012). Il benessere e la salute in tavola. Presentazione al Cibus di Parma del 07 Maggio 2012.
- **Corsetti, A., and Settanni., L. (2007)**. Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Res. Int*, **40** : 539–558.
- **Corsetti, A., Gobbetti, m., De Marco, B., Balestrieri, F., Paoletti, F., Russi, L., Rossi, J. (2000)**. Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48** : 3044-3051.
- **Corsetti, A., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N., & Gobbetti, M. (2001)**. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum*

durum and *Triticum aestivum*) sourdoughs of southern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, **64** : 95–104.

- **Cristina Lamberti, Erika Mangiapane, Alessandro Pessione, Roberto Mazzoli, Carlo Giunta and Enrica Pessione (2011)**. Proteomic characterization of a selenium-metabolizing probiotic *Lactobacillus reuteri* Lb2 BM for nutraceutical applications. *Proteomics*, **11** : 2212–2221.
- **Crowley, P., Tilman, J.S., Clarke, C.I., Arendt, E.K. (2002)**. The effect of storage time on textural and crumb grain characteristics of sourdough wheat bread. *European Food Research and Technology*, **214** : 489-496.
- **Crystal, R.G., (1973)**. Elemental selenium: structure and properties, in: Klayman, D.L. and Gunther, W.H.H. (eds), *Organic Selenium Compounds: their Chemistry and Biology*, Wiley, New York, pp. 107-167.
- **Czerny, M., Schieberle, P. (2002)**. Important aroma compounds in freshly ground wholemeal and white wheat flour-identification and quantitative changes during sourdough fermentation, *J.Agric. Food Chem*, **50** : 6835-6840.
- **D.J. Hart, S.J. Fairweather-Tait , Broadley M.R., Dickinson S.J., Foot I., Knott P., McGrath S.P., Mowat H., Norman K., Scott P.R., Stroud J.L, Tucker M., White P.J., Zhao F.J., Hurst R. (2011)**. Selenium concentration and speciation in biofortified flour and bread: Retention of selenium during grain biofortification, processing and production of Se-enriched food. *Food Chemistry*, **126** : 1771–1778.
- **D.T. Juniper, et al., (2009)**. Effects of dietary supplementation with selenium eriche yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in lambs. *Animal Feed Science and Technology*, **149** : 228–239.
- **Dal Bello F, Walter J, Hertel C, Hammes WP. (2001)**. In vitro study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from *lactobacilli* and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *Syst Appl Microbiol*, **24** : 232–37.

- **Damiani Flagella, Z. (2006).** Qualita nutrizionale e tecnologica del frumento duro. *Ital. J. Agron. / Riv. Agron.*, **1** : 203-239.
- **Damiani, P., Gobbetti, M., Cossignani, L., Corsetti, A., Simonetti, M.S. e Rossi, J. (1996).** The sourdough microflora. Characterization of het ero- and homofermentative lactic acid bacteria, yeast and their interactions on the basis of the volatile compounds produces. *Z. Lebensm. Wiss. Technol.*, **29** : 63-70.
- **Danielle R Ellis and David E Salt., (2003).** Plants, selenium and human health, *Current Opinion in Plant Biology*, **6** : 273–279.
- **De Angelis, M., Bini, L., Pallini, V., Coconcelli, P. S., & Gobbetti, M. (2001).** The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Microbiology*, **147** : 1863–1873
- **de Souza, M. P., Lytle, C. M., Mulholland, M. M., Otte, M. L. et al., (2000).** Selenium assimilation and volatilization from Dimethylselenoniopropionate by Indian mustard. *Plant Physiol*, **122** : 1281–1288.
- **De Vries, M.C., Vaughan, E.E., Kleerebezem, M and de Vos, W.M. (2005)** *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, **16** : 1018-1028.
- **De Vuyst L, de Vin F, Vaningelgem F, Degeest B. (2001).** Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Intern Dairy J* , **11** : 687–707.
- **De Vuyst, L. e Neysens, P. (2005),** The Sourdough microflora, interaction of lactic acid bacteria and yeasts, *Trends Food Sci. Technol*, **9** : 267-274.
- **De Vuyst, L., Degeest, B., (1999).** Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **23** : 153–177.
- **De Vuyst, L., Neysens, P. (2005).** The sourdough microflora: « biodiversity and metabolic interaction », *Trends Food Sci. Technol*, **16** : 43-56.

- **De Vuyst, L., Scherijvers, V., Paramithiotis, S., Hoste, B., Vancanneyt, M., Swings, J., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. e Messens, W. (2002).** The biodiversity of lactic acid bacteria in greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation, *Appl. Environ. Microbiol*, **68** : 6059-6069.
- **Decock, P. e Cappelle, S. (2005),** Bread technology and sourdough technology, *Trends Food Sci. Technol*, **16** : 113-120.
- **Desgrez, R., (1994).** Les ingrédients spécifiques: panification fine, viennoiserie, R. and Gordon B., *La panificazione Française*, pp. 132-151, Lavoisier, Paris,.
- **Di Cagno R, de Angelis M, Lavermicocca P, De Vincenzi M, Giovannini C, Faccia M, Gobbetti M. (2002).** Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effect on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Appl Environ Microbiol*, **68** : 623–633.
- **Di Cagno, R., De Angelis, M., Lavermicocca, P., De Vincenti, M., Giovannini, C., Faccia, M., and Gobbetti, M. (2002).** Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: Effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Appl. Environ. Microbiol*, **68** : 623–633.
- **Diowski A, Peczkowska B, Włodarczyk M, Ambroziak W (2000).** Bacteria/yeast and plant biomass enriched in Se via bioconversion process as a source of selenium supplementation in food. In: Bielecki S, Tramper J, Polak J. editors. *Food biotechnology*. Amsterdam: Elsevier; p 295–300.
- **Djujic, I.S., Jozanov-Stankov, O.N., Milovac, M., Jankovic, V., and Djermanovic, V. (2000).** Bioavailability and possible benefits of wheat intake naturally enriched with selenium and its products. *Biological Trace Element Research*, **77** : 273–285.
- **Doran JW, (1982).** Microorganisms and the biological cycling of selenium. *Adv Microbiol Ecol*, **6** : 1–32.
- **Elke K. Arendt, Liam A.M. Ryan, Fabio Dal Bello (2007).** Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*, **24** : 165–174.

- **Elkin, E.M., (1980).** Selenium and selenium compounds. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 3rd edn., Wiley, New York, pp. 575-601.
- **Fairweather-Tait SJ, Collings R, and Hurst R, (2010).** Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *Am J Clin Nutr*, **91** : 1484S–1491S
- **Fairweather-Tait, S.J. (1997).** Bioavailability of selenium, *European Journal of Clinical Nutrition*, **51** : S20–S23.
- **Fairweather-Tait, S.J. Yongping Bao, Martin R. Broadley, Rachel Collings, Dianne Ford, John E. Hesketh and Rachel Hurst (2011).** Selenium in Human Health and Disease, Volume **14**, Number 7.
- **Feliciano P. Bejosano, Suman Joseph, Rita Miranda Lopez, Nurettin N. Kelekci, and Ralph D. Waniska (2005).** Rheological and Sensory Evaluation of Wheat Flour Tortillas During Storage. *Cereal Chem.* **82** (3) :256–263.
- **Ferain, T., Schanck, A.N. e Delcour, J. (1996),** ¹³C nuclear magnetic resonance analysis of glucose and citrate and products in an *ldhL-ldhD* double-knockout strain of *Lactobacillus plantarum*. *J.Bacteriol*, **178** : 7311-7315.
- **Finley JW (2005).** Selenium accumulation in plant foods. *Nutr Rev*, **63** : 196–202.
- **Fisinin V.I., Papazyan T.T., and Surai P.F. (2009).** Producing selenium-enriched eggs and meat to improve the selenium status of the general population. *Crit Rev Biotechnol* **29** : 18–28.
- **Fleming, G.A., (1962).** Selenium in Irish soils and plants, *Soil Sci.* **94** : 28-35.
- **Flohe, L., Gunzler, W.A., and Schock, H.H. (1973).** Glutathione peroxidase: a selenoenzyme, *FEBS Letters*, **32** : 132–134.
- **Flynn A, Hirvonen T, Mensink GB, Ocke MC, Serra-Majem L, Stos K, Szponar L, Tetens I, Turrini A, Fletcher R, and Ildemann T (2009).** Intake of selected nutrients from foods, from fortification and from supplements in various European countries. *Food Nutr Res*, **53**.

- **Food Standards Agency, (2006).** Survey on measurement of the concentrations of metals and other elements from the UK total diet study. Food Survey Information Sheet 01=09, 2009: pp. 16–17, 33, 37–45. Food Standards Agency, London. Publication: January 28, 2009.
- **Food Standards Agency. (2009).** Survey on measurement of the concentrations of metals and other elements from the 2006 UK total diet study. Food survey Information Sheet 01/09. London, UK: Food Standards Agency. URL for document download:
- **Fordyce F. (2005).** Selenium deficiency and toxicity in the environment. In: *Essentials of Medical Geology*, edited by Selinus O, Alloway B, Centeno J, Finkelman R, Fuge R, Lindh U, and Smedley P. London: Elsevier, pp. 373–415.
- **Foster, L.H. and Sumar, S. (1997).** Selenium in health and disease: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **37** : 211–228.
- **Frost, D.V., (1972).** Two faces of selenium-can selenophobia be cured? In: Hemphill, D. (ed) *CRC Critical Reviews in Toxicology*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 467-514.
- **Galli Volonterio, A. (2005).** “Microbiologia degli alimenti”. Casa Editrice Ambrosiana.
- **Galli, A., Franzetti, L., & Fortina, M. G. (1987).** Isolation and identification of yeasts and lactic bacteria in wheat flour. *Microbiologie Aliments Nutrition*, **5** : 3–9.
- **Gan Z, Ellis PR, Schofield JD. (1995).** Mini review: Gas cell stabilisation and gas retention in wheat bread dough. *J Cereal Sci*, **21** : 215–30.
- **Gänzle Michael G, Vermeulen Noline, Vogel Rudi F. Carbohydrate (2007).** Peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiology*, **24** :128–138.
- **Gänzle Michael G., Loponen Jussi and Gobbetti Marco (2008).** Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality, *Trends in Food Science & Technology*, **19** : 513-521.
- **Gea (2011).** Osservatorio Gea: Cresce chi diversifica.

- **Giannou V, Kessoglou V, Tzia C. (2003).** Quality and safety characteristics of bread made from frozen dough. *Trends Food Sci Technol*, **14** : 99–108.
- **Gios G. – Boatto V. (1990).** Prospettive di mercato dei prodotti dell'agricoltura biologica, *Rivista di Economia Agraria*, n. 4.
- **Gios G. – Clauser O. (1996).** La qualità nel sistema agroalimentare: aspetti economici. *Quaderni della Rivista di Economia Agraria* , n. 21, Bologna, Il Mulino.
- **Gissel-Nielsen G (1998).** Effects of selenium supplementation of field crops. In *Environmental Chemistry of Selenium*, New York, NY: Marcel Dekker, pp. 99-112.
- **Giuffrida M. G., Pessione E., Mazzoli R., Dellavalle G., Barello C., Conti A., Giunta C (2001).** Media containing aromatic compounds induce peculiar proteins in *Acinetobacter radioresistens*, as revealed by proteome analysis. *Electrophoresis* **22** : 1705–1711.
- **Gobbetti M, De Angelis M, A. Corsetti, Di Bagno R (2005).** Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology* Volume **16**, Issues **1–3** : 57–69.
- **Gobbetti, M. & Corsetti, A. (1996)** Co-metabolism of citrate and maltose by *Lactobacillus brevis* subsp. *Lindneri* CB1 citrate-negative strain: effect on growth, end products and sourdough fermentation. *Z. Lebensm. Uters. Forsch*, **203** : 82-7.
- **Gobbetti, M. (1998),** The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeast, *Trend Food Sci. Technol*, **9**, pp. 267-274.
- **Gobbetti, M. (1998),** The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeast, *Trend Food Sci. Technol*, **9**, pp. 267-274.
- **Gobbetti, M., Corsetti, A. (2010).** *Biotechnologie dei prodotti lievitati da forno.*, Casa editrice Ambrosiana.
- **Gobbetti, M., Corsetti, A., Rossi, J., La Rosa, F. e De Vincenzi, S. (1994a),** « Identification and clustering of lactic acid bacteria and yeast from wheat sourdoughs of central Italy», *Ital. J. Food Sci*, **1** : 85.

- **Gobbetti, M., De Angelis, M., Arnault, P., Tossut, P., Corsetti, A. e Lavermicocca, P. (1999)**, « Added pentosano in breadmaking: fermentations of derived pentoses by sourdough lactic acid bacteria», *Food Microbiol*, **16** : 409-418.
- **Gobbetti, M., Lavermicocca, P. e Corsetti, A., Microbiologia degli alimenti**, in **De Felip, G., (2001)**. *Recenti sviluppi di igiene e microbiologia degli alimenti*, cap.10, Tecniche nuove, Milano.
- **Gobbetti, M., Lavermicocca, P., Minervini, F., De Angelis, M. e Corsetti, A. (2000)**, « Arabonose fermentation by *Lactobacillus plantarum* in sourdough with added pentosan and α -L-arabinofunariosidase: a tool to increase the production of acetic acid », *J.Appl.Microbiol.*, **88** : 317-324.
- **Gobbetti, M., Simonetti, M. S., Corsetti, A., Santinelli, F., Rossi, J., & Damiani, P. (1995)**. Volatile compound and organic acid productions by mixed wheat sour dough starters: Influence of fermentation parameters and dynamics during baking. *Food Microbiology*, **12** : 497–507.
- **Gobbetti, M., Simonetti, M. S., Rossi, J., Cossignani, L., Corsetti, A., & Damiani, P. (1994)**. Free D- and L-amino acid evolution during sourdough fermentation and baking. *Journal of Food Science*, **59** : 881-884.
- **Gray, J.A. and Bemiller, J.N. (2003)**. Bread staling: molecular basis and control, *Comp. Rev. Food Sci. F*, **2** : 1-21
- **Grosch, W., Wieser, H., (1999)**. Redox reactions in wheat dough as affected by ascorbic acid. *J. Cereal Sci.* **29** : 1–16.
- **Guèdon E., Renault, P., Ehrich, S.D. e Delerme, C. (2001)**. Transcription pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply, *J. Bacteriol*, **183** : 3614-3622.
- **Gullo, M., Romano, A.D., Pulvirenti, A., Giudici, P. (2002)**. *Candida humilis* – dominant species in sourdoughs for the production of durum wheat bran flour bread. *International Journal of Food Microbiology*, **80** : 55-59.

- **Guo P, Xu JH, Chang SY, Xu SJ & Wang K (1997)**. Hydrogen peroxide production in chondrocytes induced by fulvic acid and inhibited by selenium. *Shengwu Huaxue Zazhi*, **13** : 103-107.
- Gupta, Umesh C., . Gupta, Subhas C (2000). Selenium in soils and crops, its deficiencies in livestock and humans: Implications for management. *Commun. Soil Sci. Plant anal.*, Taylor & Francis 31(11-14), 1791-1807.
- **Hammes, W. P., & Gänzle, M. G. (1998)**. Sourdough breads and related products. In B. J. B. Wood , 2nd ed. *Microbiology offermented foods (Vol. 1)* (pp. 199–216). London: Blackie Academic and Professional.
- **Hammes, W.P & Vogel, R.F. (1997)** Sauerteig in G. Müller, in *Mikrobiologie der Lebensmittel, Lebensmittel pflanzlicher Herkunft* (eds W.Holzappel &H. Weber), Behr's Verlag, Hamburg, pp. 201-85.
- **Hammes, W.P e Gänzle, M.G (1998)**. Sourdough breads and related products, in Wood, B.J.B, *Microbiology of fermented Foods*, **volume 1**, cap. 8, Blackie Academic and Professional, London,.
- **Hammes, W.P. (1991)**, Fermentation of non-dairy food, *Food Biotechnol*, **5** : 293-303.
- **Hammes, W.P., Brandt, M.J., Francio, K.L., Rosenheim, J., Setter, M.F.H., Vogelmann, S.T. (2005)**. Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science and Technology*, **16** : 4-11.
- **Hammes, W.P., Brandt, M.J., Francis, K.L., Rosenheim, J., Seitter,M.F.H., Vogelmann, S.A., (2005)**. Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends Food Sci. Technol.* **16** : 4–11.
- **Hammes, W.P., Stolz, P. & Gänzle, M.G. (1996)** Metabolism of lactobacilli in traditional sourdough. *Advances in Foof Science*, **18**: 176-84.
- **Hansen A, Hansen B. (1996)**. Flavour of sourdough wheat bread crumb. *Z Lebensm Unters Forsch*, **202** : 244–49.
- **Hansen A, Lund B, Lewis MJ. (1989)**. Flavor of sourdough rye bread crumb. *Lebensm Wiss Technol*, **22** : 141–4.

- **Hansen, Å. E Schieberle, P. (2005).** Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects, *Trends Food Sci. Technol*, **16** : 85-94.
- **Hansen, A., & Hansen, B. (1996).** Flavour of sourdough wheat bread crumb. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, **202(3)** : 244–249.
- **Heskeyh J (2008).** Nutrigenomics and selenium: gene expression patterns, physiological targets, and genetics. *Annu Rev Nutr*, **28** : 157-77.
- **Himeno Seiichiro and Imura Nobumasa, (2002).** Heavy Metals in the Environment, edited by Bibudhendra Sarkar, Marcel Dekker, Inc. New York.
- **Hoferm F., (1842).** Historie del la Chimie, Vol. 1, p. 389, Cited in Mellor, J.W., 1934, A Comprehensive Treatise on Inorganic and Theoretical Chemistry, Vol. X, Longmans Green, London, pp. 693-696.
- **Hoseney, C., (1994).** Principles of Cereals Science and Technology, *second ed. American Association of Cereal Chemists*, St. Paul, MN, USA.
- **Hurd, D.L, and Kipling, J.J., (1964).** Origins and Growth of Physical Science, Part 2. Penguin Books, Harmondsworth.
- **Hurst, R., Armah, C. N. A., Dainty, J. R., Hart, D. J., Teucher, B., Goldson, A. J., et al. (2010).** Establishing optimal selenium status: Results of a randomized, doubleblind, placebo-controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, **91** : 923–931.
- **I Chambers, J Frampton, P Goldfarb, N Affara, W McBain, PR Harrison (1986).** *EMBO J*, **5** :1221–1227
- **INRAN (aggiornamento 2000),** *Tabella di composizione degli alimenti*, Roma.
- **INSOR - Istituto Nazionale di Sociologia Rurale (2000).** *AGRA/RAI-ERI*, ISBN: 88-397-1090-6.
- **Ip C & Ganther H (1990b)** Activity of methylated forms of selenium in cancer prevention. *Cancer Research*, **50** : 1206-1211.

- **Ip C & Ganther H (1993).** Novel strategies in selenium cancer chemoprevention research. *In Selenium in Biology and Human Health*, pp. 170-180.
- **Ismea (2012).** L'impatto Della Crisi Sull'industria Alimentare, un'analisi delle performance e del sentiment delle imprese.
- **J.M.Jay. (2005).** M.J. Loessner, D.A Golden, *Modern Food Microbiology* 7th.
- **Jasna Mrvčić, Damir Stanzer, Ema Šolić, Vesna Stehlik-Tomas (2012).** Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: opportunities for improving food safety and quality. *World J Microbiol Biotechnol*, **28** : 2771–2782.
- **Jay, J. M (1996).** *Modern Food Microbiology*, 5th ed.; Chapman and Hall: New York.
- **JT Rotruck, (1973).** Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione peroxidase. *Science*, **179** : 588–590.
- **Juniper DT, Phipps RH, Ramos-Morales E, and Bertin G (2008).** Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in beef cattle. *J Anim Sci*, **86** : 3100–3109.
- **K Schwarz, CM Foltz (1957).** Selenium as an integral part of Factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J Am Chem Soc*, **79** : 3292–3293.
- **Kasaikina, M. V., Kravtsova, M. A., Lee, B. C., Seravalli, J., Peterson, D. A., Walter, J., Legge, R., Benson, A. K., Hatfield, D. L., & Gladyshev, V. N. (2011).** Dietary selenium affects host selenoproteome expression by influencing the gut microbiota. *The FASEB Journal*, **25** : 2492-2499.
- **Kieronczyk, A., Skeie, S., Olsen, K. e Langsrud, T. (2001).** Metabolism of amino acids by resting cells of non-starter lactobacilli in relation to flavor development in cheese, *Int. Dairy J*, **11** : 217-224.
- **Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers O. P., Leer R. (2003).** Complete genome sequence of

- Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National academy of sciences of the United States of America*, **100** (4) : 1990-1995.
- **Korakli M, Rossmann A, Ganzle MG, Volgel RF. (2001).** Sucrose metabolism and exopoly-sachrides production in wheat and rye sourdoughs by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J Agric Food Chem*, **49** : 5194–200.
 - **Korakli, M. Vogel, R.F. (2003),** Purification and characterization of mannitol dehydrogenase from *Lactobacillus sanfranciscensis*. *FEMS Microbiol. Lett*, **220** : 281-286.
 - **Korakli, M., Schwarz, E., Wolf, G., Hammes, W.P., (2000).** Production of mannitol by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Adv. Food Sci.* **22** : 1–4.
 - **Kotrebai M, Birringer M, Tyson JF, Block E, and Uden PC (2000).** Selenium speciation in enriched and natural samples by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS with perfluorinated carboxylic acid ion-pairing agents. *Analyst*, **125** : 71–78.
 - **Koutnik, V. e Ingr, I., (1998).** Meat as a source of selenium in human nutrition. *Fleischwirtschaft*, **78** : 534-536.
 - **Kulp, K., (2003).** Baker's yeast and sourdough technologies in the production of U.S. Bread products, in Kulp, K. e Klaus L. Handbook of dough fermentation, **cap. 5**, Marcel Dekker, New York.
 - **Kunji, E. R., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., & Konings, W. N. (1996).** The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **70** : 187-221.
 - **L Flohe', WA Gunzler, HH Schock (1973).** A glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett*, **32** : 132–134,.
 - **Lacourciere, G. M., Stadtman, T. C (1998).** The NIFS protein can function as a selenide delivery protein in the biosynthesis of selenophosphate. *J. Biol. Chem.*, **273** : 30921–30926.
 - **Laignelet, B. e Dumas, C. (1984).** Oxydation des lipide set distribution des lipides oxydés au cours du pétrissage de la pate de farine de blé tendre. *Lebensm. Wiss. Technol*, **17** : 226-230.
-

- **Larsson M, Sandberg AS. (1991).** Phytate reduction in bread containing oat flour, oat bran or rye bran. *J Cereal Sci*, **14** : 141–9.
- **Laws A, Marshall VM. (2001).** The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with rropy strains of lactic acid bacteria. *Intern Dairy J*, **11** : 709–21.
- **Lee, B.J., Park, S.I., Chittum, H.S., and Hatfield, D.L. (1996).** Molecular biology ofelenium and its role in human health. *Molecules and Cells*, **6** : 509–520.
- **Lipiec E, Siara G, Bierla K, Ouerdane L, and Szpunar J (2010).** Determination of selenomethionine, selenocysteine, and inorganic selenium in eggs by HPLC-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, **397** : 731–741.
- **Liu, R.H. (2003).** Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*, **78** : 517S–520S.
- **Lombardi, A., Spolador, D. (1996).** “Microbiologia dei prodotti di origine vegetale”. Chiriotti Editori.
- **Lopez HW, Duclos V, Coudray C, Krespine V, Feillet-Coudary C, Messenger A, Demigne C, Remesy C. (2003).** Making bread with sourdough improve mineral bioavailability from reconstituted whole wheat flour in rats. *Nutrition*, **19** : 524–30.
- **Lubos E, Sinning CR, Schnabel RB, Wild PS, Zeller T, Rupprecht HJ, Bickel C, Lackner KJ, Peetz D, Loscalzo J, Munzel T, and Blankenberg S (2010).** Serum selenium and prognosis in cardiovascular disease: results from the AtheroGene study. *Atherosclerosis*, **209** : 271–7,
- **LuÈ JZ, Zhang BZ & Milner JA (1994).** Dietary selenite modifies glutathione metabolism and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene conjugation in rats. *Journal of Nutrition*, **124** : 172-180.
- **MacPherson A, Barclay MNI, Scott R & Yates RWS (1997).** Loss of Canadian wheat imports lowers selenium intake and status of the Scottish population. *In Trace Elements in Man and Animals*, **9** : 203-205.

- **MacRithie, F., (1992).** Physicochemical properties of wheat proteins in relation to functionality, *Adv. Food Nutr. Res.* **36** : 1-87.
- **Maher Galal, A., Varriano-Marston, E., Johnson, J.A., (1978).** Rheological dough properties as affected by organic acids and salt. *Cereal Chem.* **55** : 683–691.
- **Mäkelä AL, Nanto V & Mäkelä Wang W (1993).** The effect of nationwide selenium-enrichment of fertilizers on selenium status of healthy Finnish medical students living in southwestern Finland. *Biological Trace Elements Research*, **36** : 121- 157.
- **Malassis L., Gherzi G. (1995).** Introduzione all'Economia Agroalimentare, Il Mulino, Bologna.
- **Malgorzata A. Bryszewska & Wojciech Ambroziak & Nicola J. Langford & Malcolm J. Baxter & Alison Colyer & D. John Lewis (2007).** The Effect of Consumption of Selenium Enriched Rye/Wheat Sourdough Bread on the Body's Selenium Status. *Plant Foods Hum Nutr*, **62** : 121–126.
- **Marth, E.H. (1974)** Fermentations. In: Webb BH, Johnson AH, Alford JA (eds) *Fundamentals of Dairy Chemistry*. AVI, Westport, CT.
- **Martinez-Anaya, M., Collar, C., & de Barber, C. (1995).** Comparison on wheat flour from different European countries in microbiologically started bread making processes. *Cereal Foods World*, **40(9)** : 605–610.
- **McConnell KP, Hoffman JL (1972).** *FEBS Lett*, **24** : 60–62.
- **Meignen, B., Onno, B., Gelinas, P., Infantes, M., Guilos, S., & Cahagnier, B. (2001).** Optimisation of sourdough fermentation with *Lactobacillus brevis* and baker's yeast. *Food Microbiology*, **18** : 239–245.
- **Messens, W., De Vuyst, L. (2002).** Inhibitory substances produced by lactobacilli isolated from sourdoughs- a review. *International Journal of Food Microbiology*, **72** : 31-43.
- **Messens, W., Neysens, P., Vansieleghem, W., Vanderhoeven, J., De Vuyst, L. (2002).** Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in response to temperature and pH

values used for sourdough fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, **68** : 1431-1435.

- **Mihara, H., Maeda, M., Fujii, T., Kurihara, T. et al. (1999).** A nifS-like gene, csdB, encodes an *Escherichia coli* counterpart of mammalian selenocysteine lyase. *J. Biol. Chem.*, **274** : 14768–14772.
- **Miller, R.A. and Hoseney, R.C. (2008).** Effect of non chaotropic salts on flour bread-making properties, *Cereal Chem.*, **69** : 366-371.
- **Mintel International - Jago D. (2009).** “Functional foods, market trends”, *Functional Foods Symposium*, Amsterdam.
- **Mizutani T, Kurata H, Yamada K, Totsuka T, (1992).** *Biochem J*, **284** : 827–834.
- **Muniz-Naveiro O, Dominguez-Gonzalez R, Bermejo-Barrera A, Bermejo-Barrera P, Cocho JA, and Fraga JM (2007).** Selenium speciation in cow milk obtained after supplementation with different selenium forms to the cow feed using liquid chromatography coupled with hydride generation atomic fluorescence spectrometry. **71** : 1587–1593.
- **Murphy J, Cashman KD (2002).** Selenium status of Irish adults: evidence of insufficiency. *Irish Journal of Medical Science April–June 2002*, Volume **171**, Issue **2** : 81-84
- **Neubauer, H., Glaasker, E., Hammes, W.P., Poolman, B. & Konings, W.N. (1994)** Mechanism of maltose uptake and glucose excretion in *Lactobacillus sanfrancisco*. *Jornal f Bacteriology*, **176** : 3007-12.
- **Neuhoff V., Arold N., Taube D., Ehrhardt W (1988).** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, **9** : 255–262.
- **Neve J (1995).** Human selenium supplementation as assessed by changes in blood selenium concentration and glutathione peroxidase activity. *J Trace Elem Med Biol*, **9** : 65–73.
- **Niefind, K., Muller, J., Riebel, B., Hummel, W., Schomburg, D., (2003).** The crystal structure of R-specific alcohol dehydrogenase from

Lactobacillus brevis suggests the structural basis of its metal dependency. *J. Mol. Biol.* **327** : 317–328.

- **Nielsen (2012)**. Il benessere e la salute in tavola. Presentazione al cibus di Parma del 07 Maggio 2012.
- **Onno ,B. e Roussel, P. (1994)**. Technologie et microbiologie de la panification au levain, in De Roissart, H. e Luquet, F.M, Bactéries Lactiques, **volume 11**, cap. V-5, Lorica, Uriage, France.
- **Ornsrud, R. and Lorentzen, M. (2002)**. Bioavailability of selenium from raw or cured selenomethionine- enriched fillets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) assessed in seleniumdeficient rats. *British Journal of Nutrition*, **87** : 13–20.
- **Ottagalli, G., Galli, A. e Foschino, R. (1996)**. Italian bakery products obtained with sour dough: characterization of the typical microflora, *Adv Food Sci.*, **18** : 131-144.
- **P Tormay, R Wilting, F Lottspeich, PK Mehta, P Christen, A Böck (1998)**. *Eur J Biochem*, **254** : 655–661.
- **Papp, L. V., Lu, J., Holmgren, A., Khanna, K. K (2007)**. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid. Redox. Signal.* **9** : 775–806.
- **Peng A, Wang WH, Wang CX, Wang ZJ, Rui HF, Wang WZ & Yang ZW (1999)**. The role of humic substances in drinking water in Kaschin-Beck disease in China. *Environmental*
- **Peng A, Xu Y, Lu JH & Wang ZJ (2000)**. Study on the dose effect relationship of selenite with the growth of wheat. *Biological Trace Elements Research*, **76** : 175-181.
- **Pessione E., Mazzoli R., Giuffrida M. G., Lamberti C., Garcia-Moruno E., Barello C., Conti A., Giunta C (2005)**. A proteomic approach to studying biogenic amine producing lactic acid bacteria. *Proteomics*, **5** : 687–698.
- **Pessione E., Pessione A., Lamberti C., Coisson J.D., Riedel K., Mazzoli R., Bonetta S., Eberl L., Giunta C (2009)**. First evidence of a membrane-bound, tyramine and β -phenylethylamine producing, tyrosine

decarboxylase in *Enterococcus faecalis*: A two-dimensional electrophoresis proteomic study. *Proteomics*, 9 : 2695-2710.

- **Poonam Bhatia, Federica Aureli, Marilena D’Amato, Ranjana Prakash, Swaranjit Singh Cameotra, Tejo Prakash Nagaraja, Francesco Cubadda (2013)**. Selenium bioaccessibility and speciation in biofortified Pleurotus mushrooms grown on selenium-rich agricultural residues. *Food Chemistry*, 140 : 225–230.
- **Poulain J. P. (2002)**. Sociologies de l’alimentation, Puf, Paris.
- **Pyler, E.J., (1988)**. Baking Science and Technology Volume I & II, third ed. Sosland Pub. Co., Kansas, MO, USA. pp. 1–1369.
- **Pyler, E.J., (1998)**. Fundamental of baking technology. *Baking Science and Technology. Part three, Vol. II*, Sosland Publishing Company, Merriam.
- **R. Foschino, A. Galli, (1997)**. Italian style of life: pane, amore e ...lievito naturale! /. - In: Rivista delle tecnologie alimentari. Sistemi per produrre. - ISSN 1120-5334, 8 : 42-59.
- **Rayman M. P, (2008)**., Br. J. Nutr, 100, 254–268.
- **Rayman MP (1997)** Dietary selenium: time to act. British Medical Journal (Clinical Research Edition) 314 : 387-388.
- **Rayman MP, Abou-Shakra FA, Ward NI & Redman CWG (1996)** Comparison of selenium levels in pre eclamptic and normal pregnancies. *Biological Trace Elements Research*, 55 : 9-20.
- **Rayman MP, Infante HG, and Sargent M (2008)**. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. *Br J Nutr*, 100 : 238–253.
- **Reilly C (1998)**. Selenium: a new entrant into the functional food arena. *Trends in Food Science and Technology*, 9 : 114-118.
- **Reilly, C. (1996)** Selenium in Food and Health, London: Blackie Academic & Professional.
- **Reimann, C. & de Caritat P., (1998)**. Chemical elements in the environment - Factsheets for the geochemist and environmental scientist. *Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg*, 398 pp.

- **Roberta Re, Nicoletta Pellegrini, Anna Proteggente, Ananth Pannala, Min Yang, Catherine Rice-Evans (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 26, Issues 9–10 : 1231–1237.
- **Rupesh S., Chavan and Shraddha R. Chavan (2011).** *Sourdough Technology—A Traditional Way for Wholesome Foods: A Review*, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, **Vol. 10**.
- **Salovaara, H. (1998).** Lactic acid bacteria in cereal-based products. In S. Salminen, & A. von Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria—microbiology and functional aspects*, (2nd ed) (pp. 115–137). New York: Marcel Dekker.
- **Salovaara, H. (1998).** «Lactic acid bacteria in cereal-based products», in Salminen, S. e von Wright, A. *Lactic acid bacteria microbiology and functional aspects*, 115-138.
- **Saxelin, M.; Tynkkynen, S.; Mattila-Sandholm, T.; de Vos, W. M (2005).** Probiotic and other functional microbes: From markets to mechanisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16** : 204-211.
- **Schieberle P. (1996).** Intense aroma compounds—useful tools to monitor the influence of processing and storage on bread aroma. *Adv Food Sci*, **18** : 237–44.
- **Schrauzer GN and Surai PF (2009).** Selenium in human and animal nutrition: resolved and unresolved issues. A partly historical treatise in commemoration of the fiftieth anniversary of the discovery of the biological essentiality of selenium, dedicated to the memory of Klaus Schwarz (1914–1978) on the occasion of the thirtieth anniversary of his death. *Crit Rev Biotechnol*, **29** : 2–9.
- **Schwarz K, Bieri JG, Briggs GM & Scott ML (1957).** Prevention of exudative diathesis in chicks by factor 3 and selenium. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **95** : 621-626.
- **Shewry, P.R., (2003).** Improving wheat quality: the role of biotechnology, in Cauvain, S.P. *Bread making. Improving quality*, pp. 168-186, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, GB.

- **Shu Kai Xia, Long Chen, and Jun Qing Liang (2007).** Enriched Selenium and Its Effects on Growth and Biochemical Composition in *Lactobacillus bulgaricus*, *J. Agric. Food Chem*, **55** : 2413-2417 .
- **Singh, S., Goswami, P., Singh, R., Heller, K. J. (2008).** Application of molecular identification tools for lactobacillus, with a focus on discrimination between closely related species: a review. *LWT-Food Science and Technology*, 1-10.
- **Spallholz, J.E. (1994).** On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity, *Free Radical Biology & Medicine*, **17** : 45–64.
- **Spicher G. (1983).** Baked goods. In: Rehm JH, Reed G, editors. *Biotechnology*. Weinheim, Germany: Verlag Chemie. 1–80.
- **Spicher, G., & Nierle, W. (1988).** Proteolytic activity of sourdough bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **28** : 487-492.
- **Squali H, Arnaud J, Richard MJ, Renversez JC & Favier A (1997).** Evaluation of oxidative stress and antioxidant defenses in malnourished Moroccan children. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **41** : 149-159.
- **Stadtman TC (1996).** Selenocysteine. *Annual Review of Biochemistry*, **65** : 83-100.
- **Stahl, W., van den Berg, H., Arthur, J., Bast, A., Dainty, J., Faulks, R.M., Gartner, C., Haenen, G., Hollman, P., Holst, B., Kelly, F.J., Polidori, M.C., Rice-Evans, C., Southon, S., van Vliet, T., Vina-Ribes, J., Williamson, G., and Astley, S.B. (2002).** Bioavailability and metabolism, *Molecular Aspects of Medicine*, **23** : 39–100.
- **Stiles Michael E, Holzapfe Wilhelm H., (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, **36** : 1-29.
- **Stolz, P. (1999).** Mikrobiologie des Sauerteiges. In G. Spicher, & H. Stephan (Eds.), *Handbuch Sauerteig: Biologie, Biochemie, Technologie* 5th ed. (pp. 35–60). Hamburg: Behr's Verlag.
- **Stolz, P., Böcker, G., Hammes, W.P., Vogel, R.F., (1995a).** Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough I. *Lactobacillus sanfrancisco*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **201** : 91–96

- **Stolz, P., Bö cker, G., Hammes , W.P. e Vogel, R.F. (1995)**, Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough I. *Lactobacillus sanfrancisco.*, *Z.Lebensm. Unters. Forsh*, **201** : 91-96.
- **Stolz, P., Bö cker, G., Vogel, R.F. e Hammes, W.P. (1993)** «Utilization of maltose and glucose by lactobacilli isolated from sourdough». *FEMS Microbiol. Lett*, **109** : 237-242.
- **Stolz, P., Vogel, R.F., Hammes, W.P., (1995b)**. Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough II. *Lactobacillus pontis*, *L. reuteri*, *L. amylovorus*, and *L. fermentum*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **201**: 402–410.
- **Streit, B., Stumm, W. (1993)**. Plants as Biomonitors. Indicators for Heavy Metals in the Terrestrial Environment: Markert, B. (ed.) Weinheim: VCH; pp. 167-168.
- **Suhajda, A.; Hegoczki, J.; Janzso, B.; Pais, I.; Vereczkey, G (2000)**. Preparation of selenium yeasts I. Preparation of seleniumenriched *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Trace Elem. Med. Biol*, **14** : 43-47.
- **Sunde, R. A., Paterson, E., Evenson, J. K., Barnes, K. M., & Lovegrove, J. A. (2008)**. Longitudinal selenium status in healthy British adults: Assessment using biochemical and molecular biomarkers. *British Journal of Nutrition*, **99** : 37–47.
- **Suzuki, K.T. and Ogra, Y. (2002)**. Metabolic pathway for selenium in the body: speciation by HPLC-ICP MS with enriched Se. *Food Additives and Contaminants*, **19** : 974–983.
- **Tagg, J.R., Dajani, A.D., Wannamaker, L.W. (1976)**. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriological Review*, **40** : 722-756.
- **Takeda, K., Matsumura, Y., Shimizu, M., (2001)**. Emulsifying and surface properties of wheat gluten under acidic conditions. *J. Food Sci.* **66** : 393–399.
- **Tan JA, Zheng DZ, Hou SF, Zhu WY, Li RB, Zhu ZY & WangWY (1987)**. Selenium in ecological and chemicoecography and endemic Keshan and Kaschin-Beck disease in China. In *Selenium in Biology and Medicine*, vol. B, pp. 859-876.

- **Tanaka, K., Furukawa, K., Matsumoto, H., (1967).** The effect of acid and salt on the farinogram and extensigram of dough. *Cereal Chem.* **44** : 675–680.
- **TC Stadtman, (1996).** *Annu Rev Biochem* **65** : 83–100.
- **Terry N, Zayed AM, de Souza MP & Tarum AS, (2000).** Selenium in higher plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 51, 401-432.
- **Terry, N. and Zayed, A.M. (1994).** Selenium volatilization by plants, in W.T.J. Frankenberger and S.Beson, Eds., Selenium in the Environment, New York: Marcel Dekker, 343-367.
- **Thiele C, Gänzle MG, Vogel RF. (2002).** Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavor. *Cereal Chem*, **79** : 45–51.
- **Thilly CH, Swennen B, Bourdoux P, Ntambue K, Moreno-Reyes R, Gillies J & Vanderpas JB (1993).** The epidemiology of iodine-deficiency disorders in relation to goitrogenic factors and thyroid-stimulating hormone regulation. *American Journal of Clinical Nutrition*, **57** : 267-270.
- **Tiekink, M., Ganzle, M.G., (2005).** Exopolysaccharides from cereal associated lactobacilli. *Trends Food Sci. Technol.* **16** : 79–84.
- **Tsen, C.C., (1966).** A note on effects of pH on sulfhydryl groups and rheological properties of dough and its implication with the sulfhydryl–disulfide interchange. *Cereal Chem.* **43** : 456–460.
- **Ujang Tinggi, (2005).** Selenium Toxicity and Its Adverse Health Effects. *Reviews In Food And Nutritional Toxicity*, Volume 4. Taylor & Francis Group, LLC
- **Ujang Tinggi. (2003).** Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicology Letters*, **137** : 103–110.
- **Ursini, F. and Bindoli, A. (1987).** The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, **44** : 255–276.
- **Van Hijum, S.A.F.T., Kralj, S., Ozimek, L.K., Dijkhuizen, L., van Geel-Schutten, I.G.H., (2006).** Structure-function relationships of

glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70** : 157–176.

- **Vanderpas JB, Contrempre B, Duale N, Deckx H, Bebe N, Longombe AO, Thilly CH, Diplock AT & Dumont JE (1993).** Selenium deficiency mitigates hypothyroxinemia in iodine-deficient subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, **57** : 271-275.
- **Vermeulen, N., Czerny, M., Ganzle, M.G., Schieberle, P. e Vogel, R.F. (2007b).** Reduction of (E)-2-nonenal and (E, E)-2,4-decadienal during sourdough fermentation. *J. Cereal Sci.*, **45** : 78-87.
- **Vermeulen, N., Kretzer, J., Machalitz, H., Vogel, R.F., Ganzle, M.G., (2006a).** Influence of redox-reactions catalysed by homo- and heterofermentative lactobacilli on gluten in wheat sourdoughs. *J. Cereal Sci.* **43** : 137–143.
- **Vernocchi p., M. Gaggiano, M. Vallicelli, M. Ndagijimana, Gianotti A. Gobbetti, M.e. Guerzoni. (2004).** Effects of dough chemico-physical factors on aroma compounds production and their retention. in: new tools for improving microbial food safety and quality. Portoroz (Slovenia), 12-16 settembre 2004, s.l: s.n, p. 205.
- **Vézina D, Mauffette F, Roberts KD & Bleau B (1996).** Selenium-vitamin E, supplementation in infertile men. Effects on semen parameters and micronutrient levels and distribution. *Biological Trace Elements Research*, **53** : 65-83.
- **von Weymarn, N., Hujanen, M., Leisola, M., (2002).** Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. *Process Biochem.* **37** : 1207–1213.
- **Von Wright A.W., Axelsson L. (2012).** *Lactic Acid Bacteria, microbial and functional aspects*. Fourth Edition. CRC Press, Taylor & Francis Group.
- **Walker, G.M. (1998).** Yeast physiology and biotechnology. Edited by G.M. Walker, John Wiley and Sons.

- **Walsh, M.C., Smits, H.P., Scholte, M., K., Van Dam, (1994).** Affinity of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated during growth on glucose. *Journal of Bacteriology*, **176** : 953-958.
- **Wang J, Chen C (2009)** Biosorbent of heavy metals removal and their future. *Biotechnol Adv* **27** : 195–226.
- **Wehrle, K., Grau, H., Arendt, E.K., (1997).** Effects of lactic acid, acetic acid, and table salt on fundamental rheological properties of wheat dough. *Cereal Chem.* **74** : 739–744.
- **Wessels D., Flugge U.I (1984).** A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem*, **138** : 141–143.
- **Whanger PD (2002).** Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *J Am Coll Nutr* **21**: 223–232.
- **WHO (World Health Organization) (1987).** Environmental Health Criteria 58: Selenium, WHO, Geneva.
- **Wood J.M. (1975).** Biological Cycles for Elements in the Environment, *Naturwissenschaften*, **62** : 357-364.
- **Xiong. Y, Feng J, Zhang L & Yang J (1998).** Effect of selenium on lesion of articular cartilage fed on T-2 toxin in Chinese mini-pigs with experimental Kaschin-Beck disease. *Xi'an Yike Daxue Xuebao* **19** : 523-525.
- **Zambonelli, Tini, Giudici, Grazia. (2001)** Microbiologia degli alimenti fermentati, Calderini Edagricole.**Zhou MH (1990)** Influence of selenium on growth, root vigor and seed morphology of rice. Guizhou. *Journal of Agricultural Science (China)*, **15** : 57-59.
- **Zimmleri B, Haldimann M, Siber R, (1998)** Selenium status of the Swiss population. Part 3. Changes and its causes. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygie.*

Allegati

Allegati: Grafici della parte sperimentale

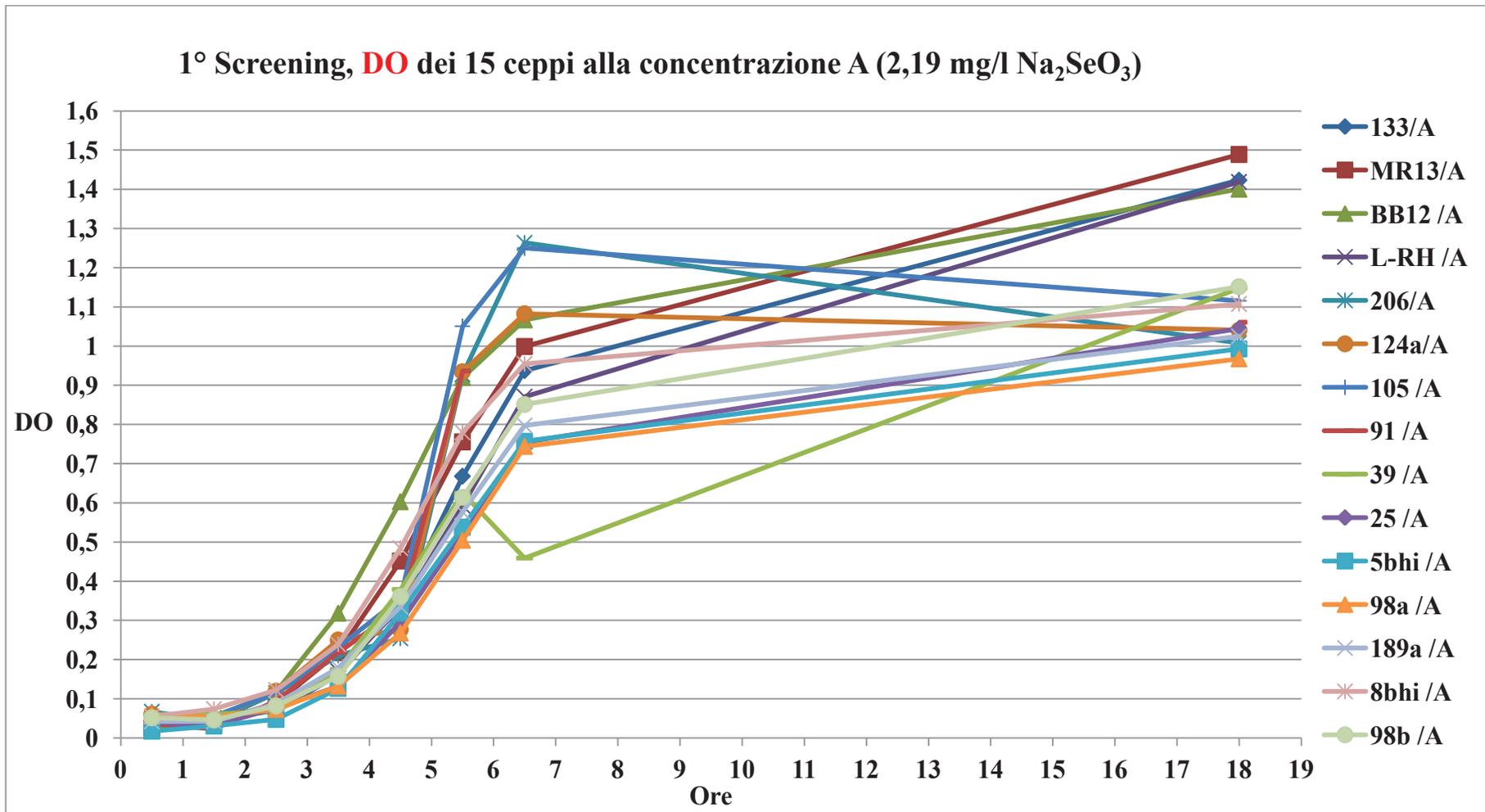


Grafico 2: Valutazione dello sviluppo microbico per densità ottica in fase 1 e 2 dei 15 ceppi di batteri lattici, su terreno mMRS alla concentrazione di 2,19 mg/l di Na₂SeO₃.

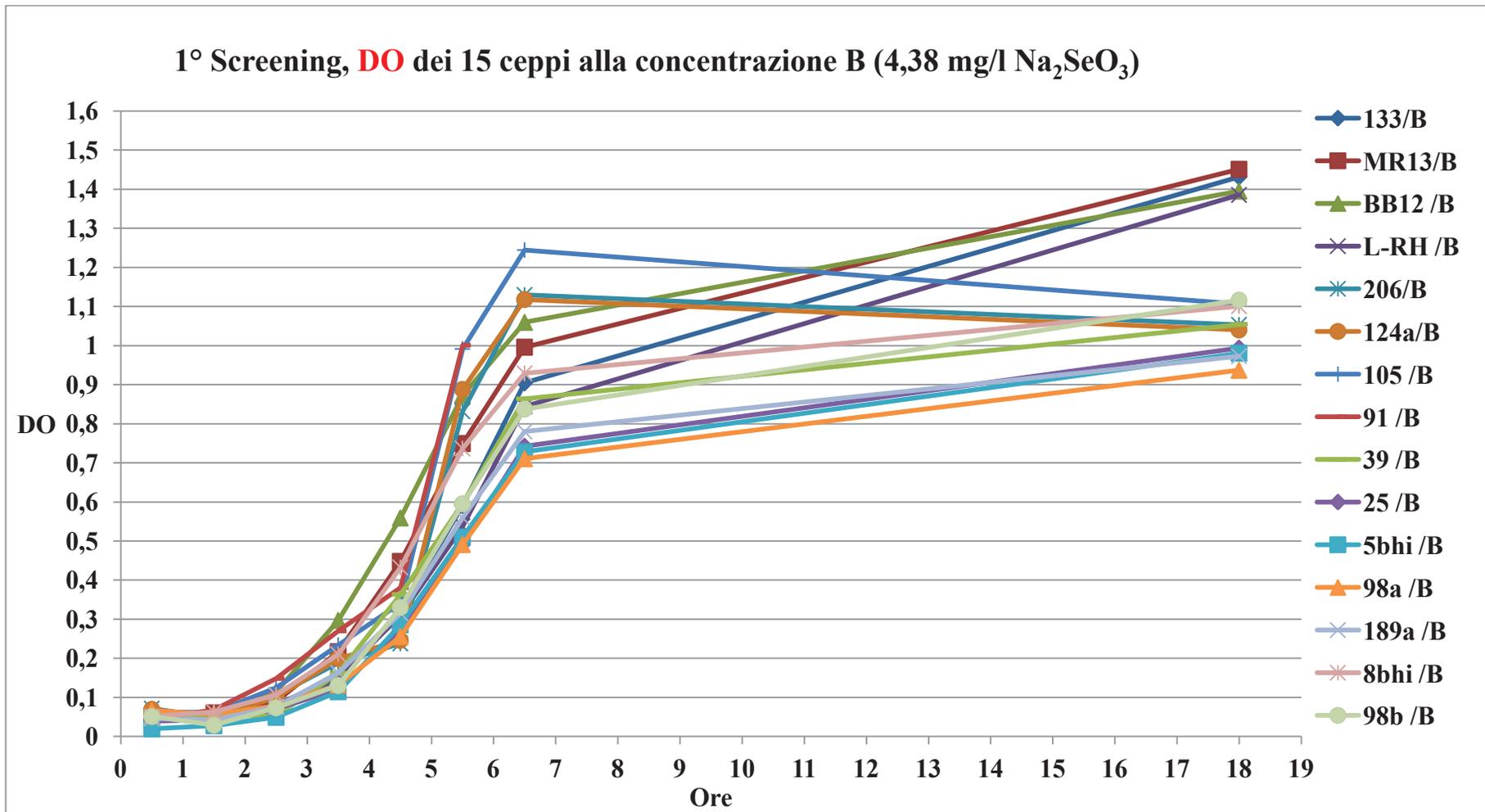


Grafico 3: Valutazione dello sviluppo microbico per densità ottica in fase 1 e 2 dei 15 ceppi di batteri lattici, su terreno mMRS alla concentrazione di 4.38mg/l di Na₂SeO₃.

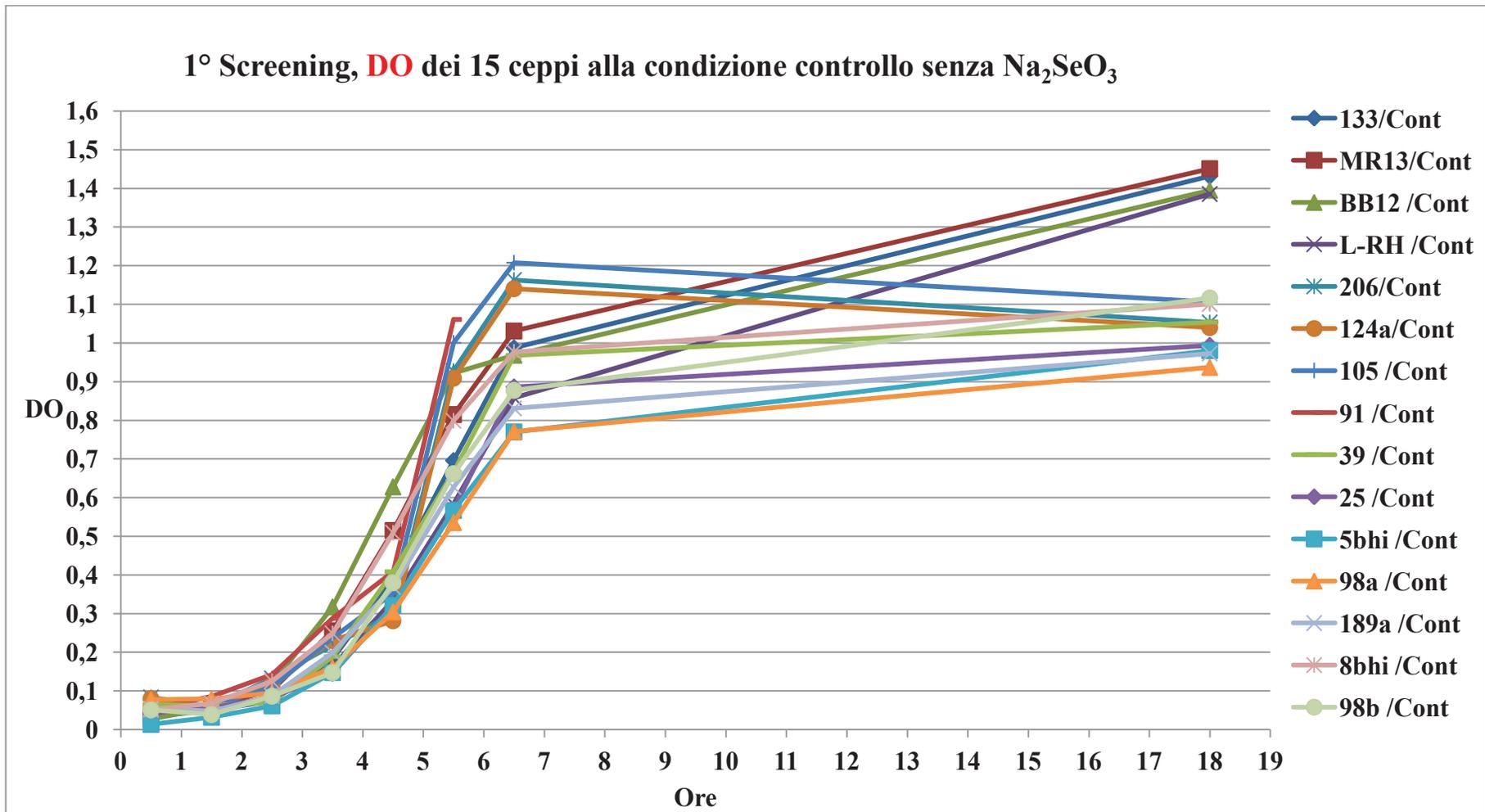


Grafico 4: Valutazione dello sviluppo microbico per densità ottica in fase 1 e 2 dei 15 ceppi di batteri lattici, su terreno mMRS senza Na₂SeO₃.

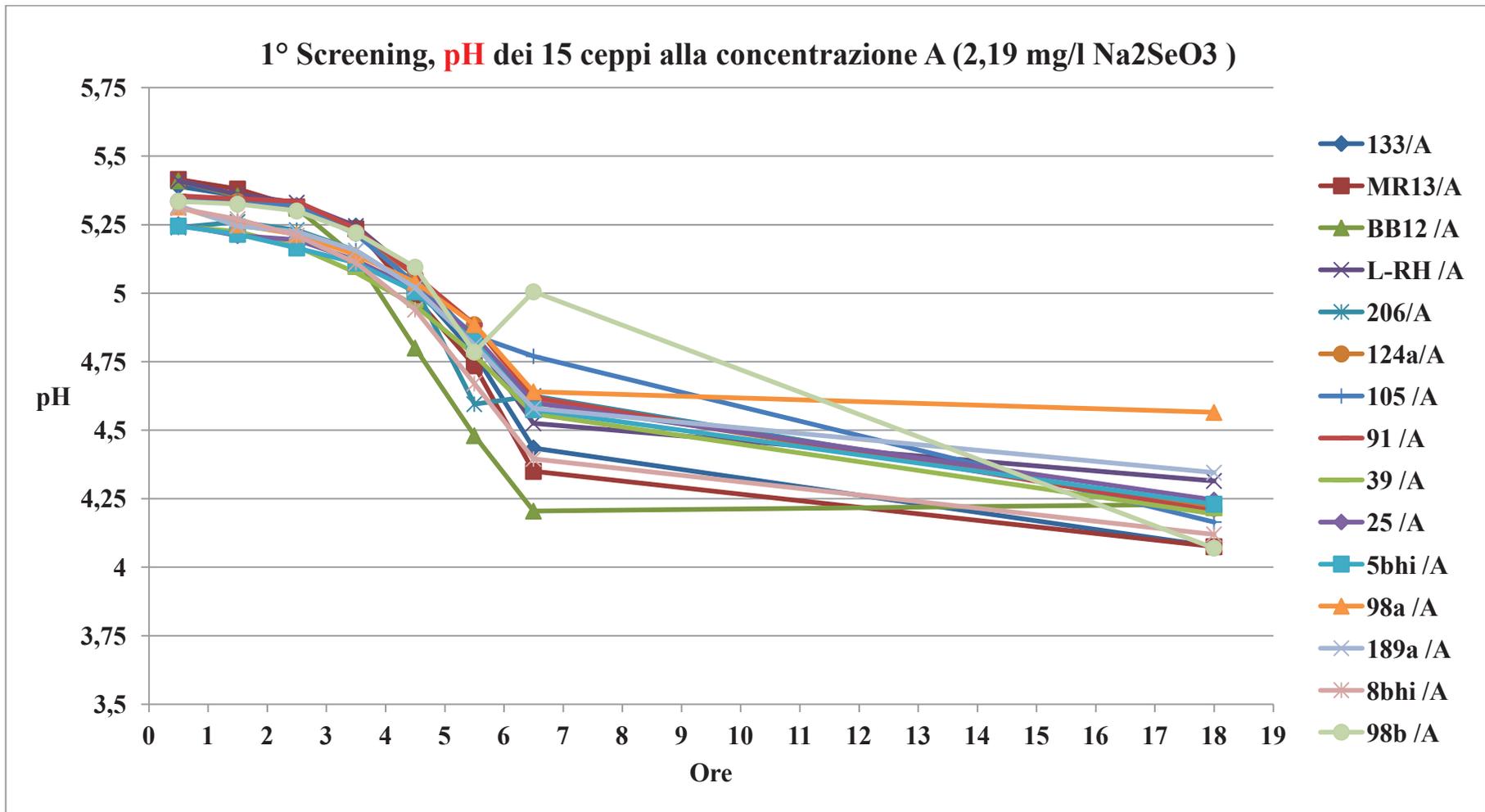


Grafico 5: Valutazione dello sviluppo microbico per pH in fase 1 e 2 dei 15 ceppi di batteri lattici, su terreno mMRS alla concentrazione di 2,19 mg/l di Na₂SeO₃.

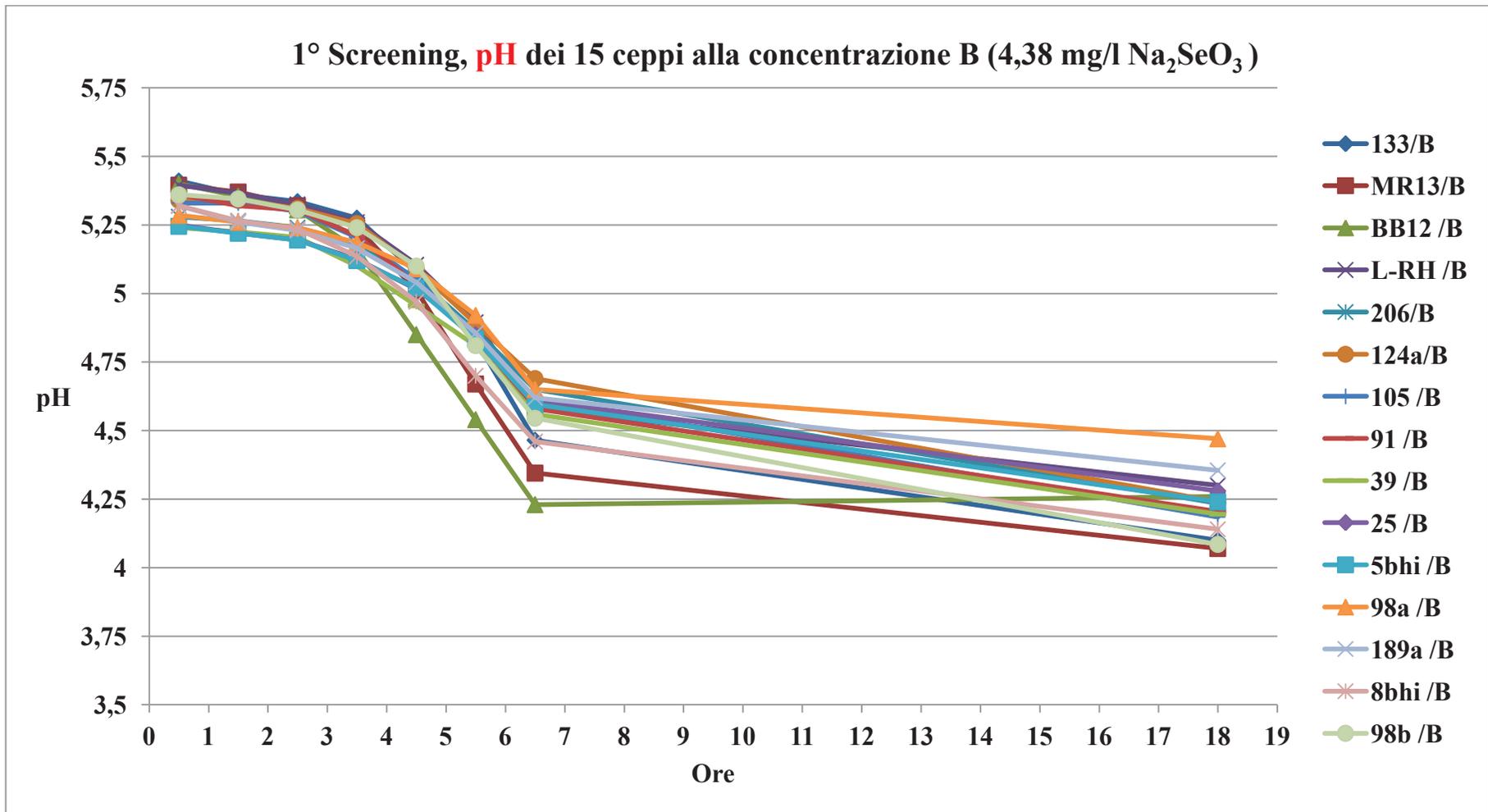


Grafico 6: Valutazione dello sviluppo microbico per pH in fase 1 e 2 dei 15 ceppi di batteri lattici, su terreno mMRS alla concentrazione di 4.38 mg/l di Na₂SeO₃.

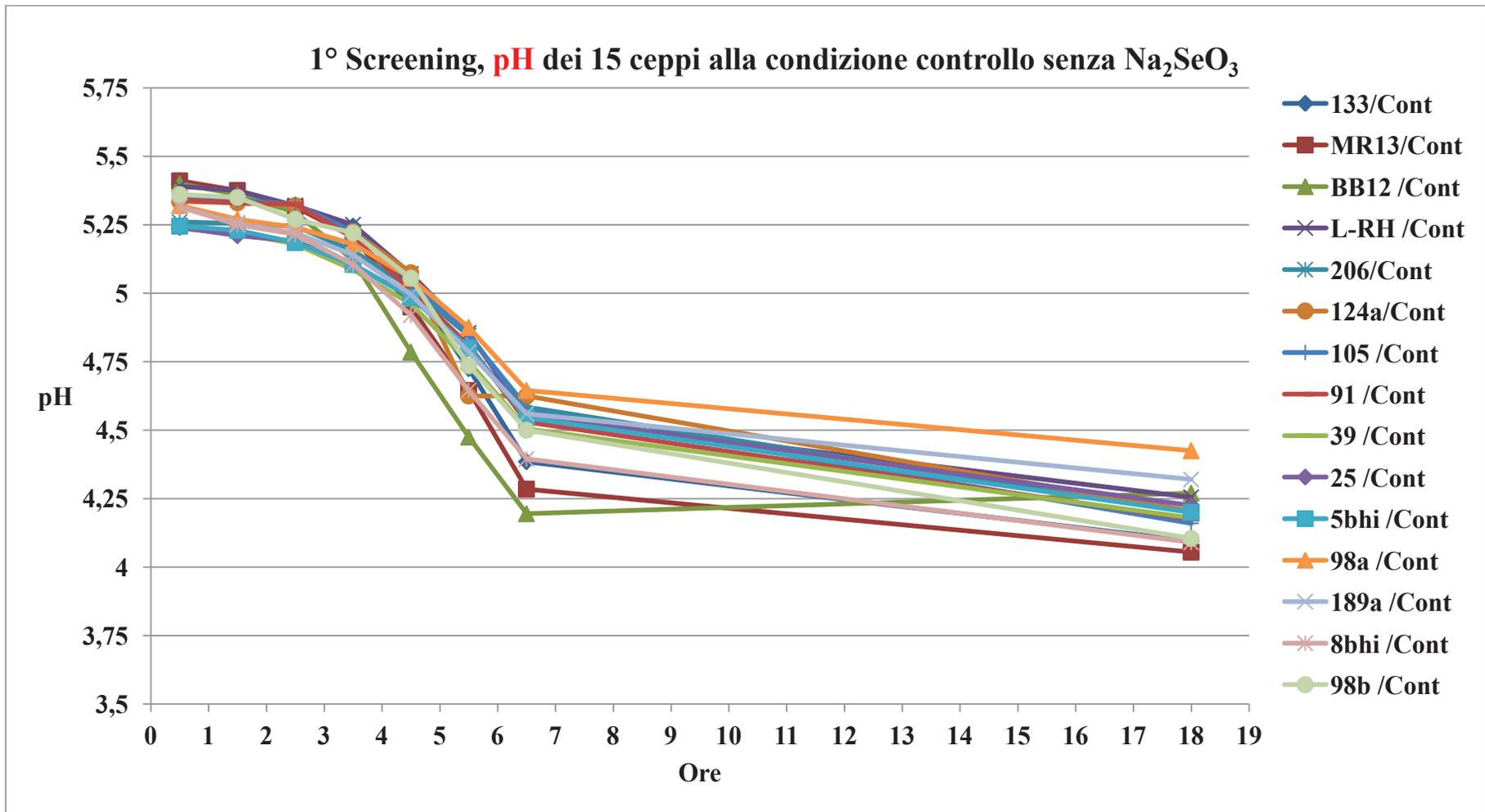


Grafico 7: Valutazione dello sviluppo microbico per pH in fase 1 e 2 dei 15 ceppi di batteri lattici, su terreno mMRS senza Na₂SeO₃.

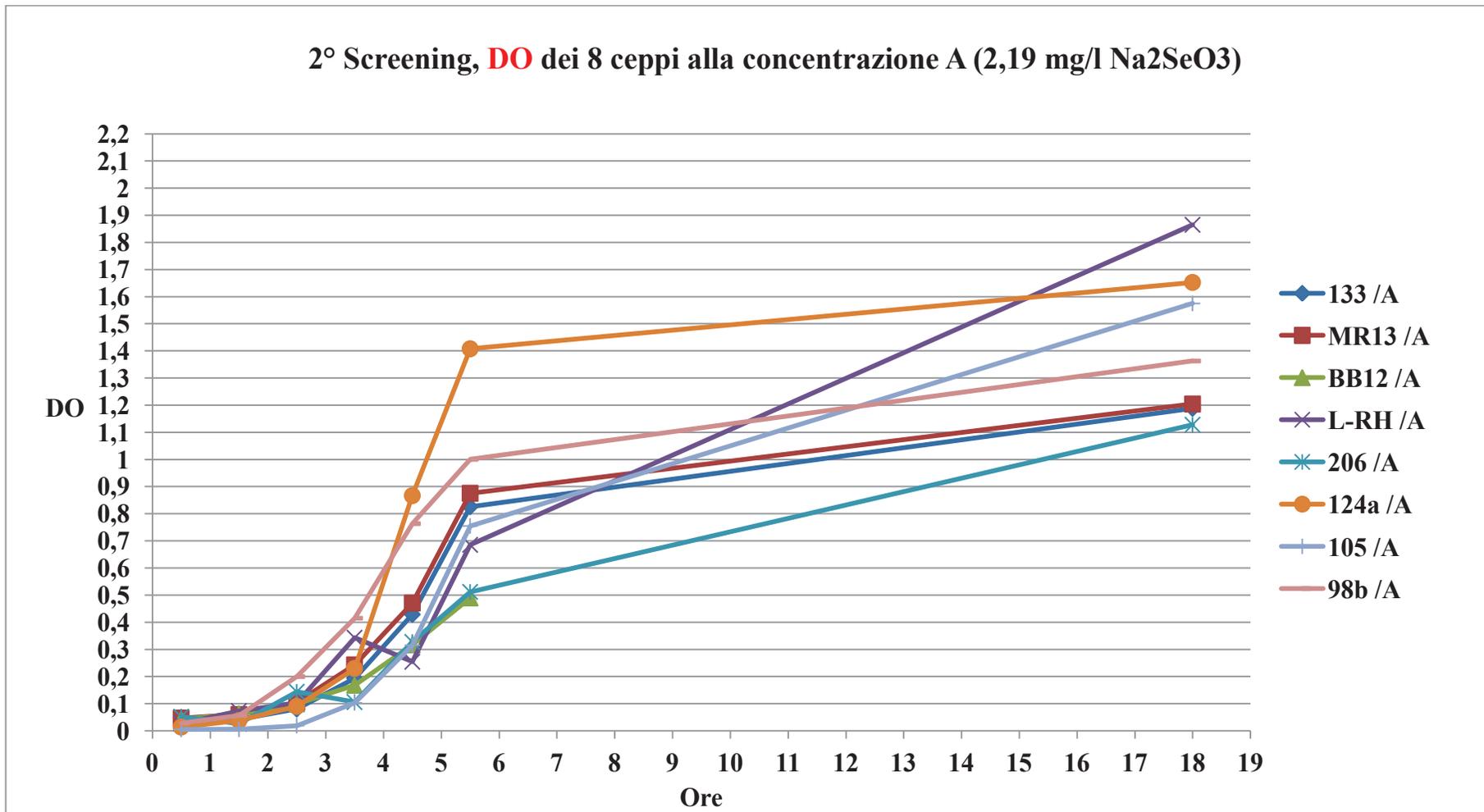


Grafico 8: Valutazione dello sviluppo microbico per densità ottica in fase 1 e 2 degli 8 ceppi di batteri lattici selezionati nel primo screening, crescita su terreno mMRS alla concentrazione di 2.19 mg/l di Na₂SeO₃.

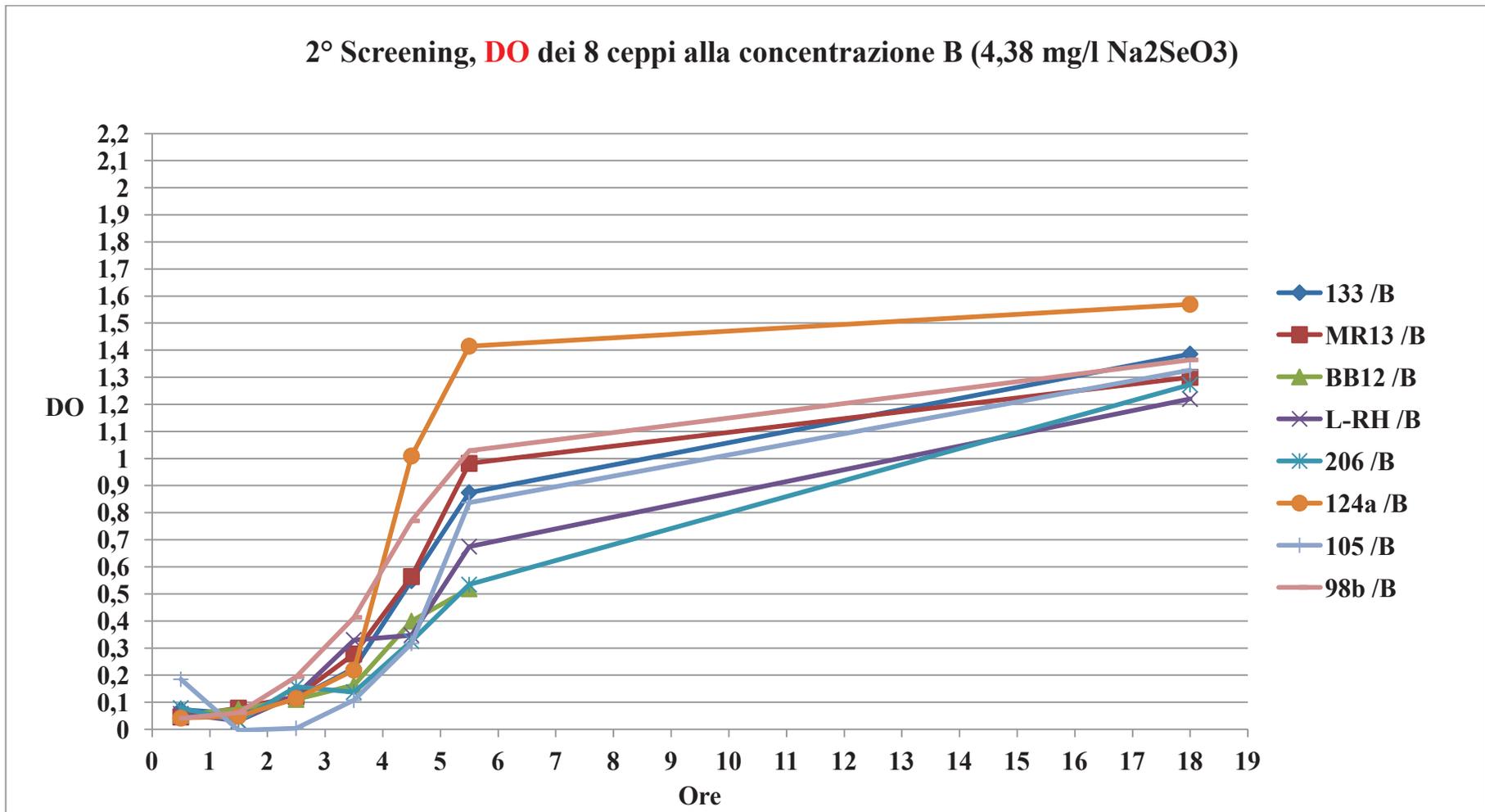


Grafico 9: Valutazione dello sviluppo microbico per densità ottica in fase 1 e 2 degli 8 ceppi di batteri lattici selezionati nel primo screening, crescita su terreno mMRS alla concentrazione di 4.38 mg/l di Na₂SeO₃.

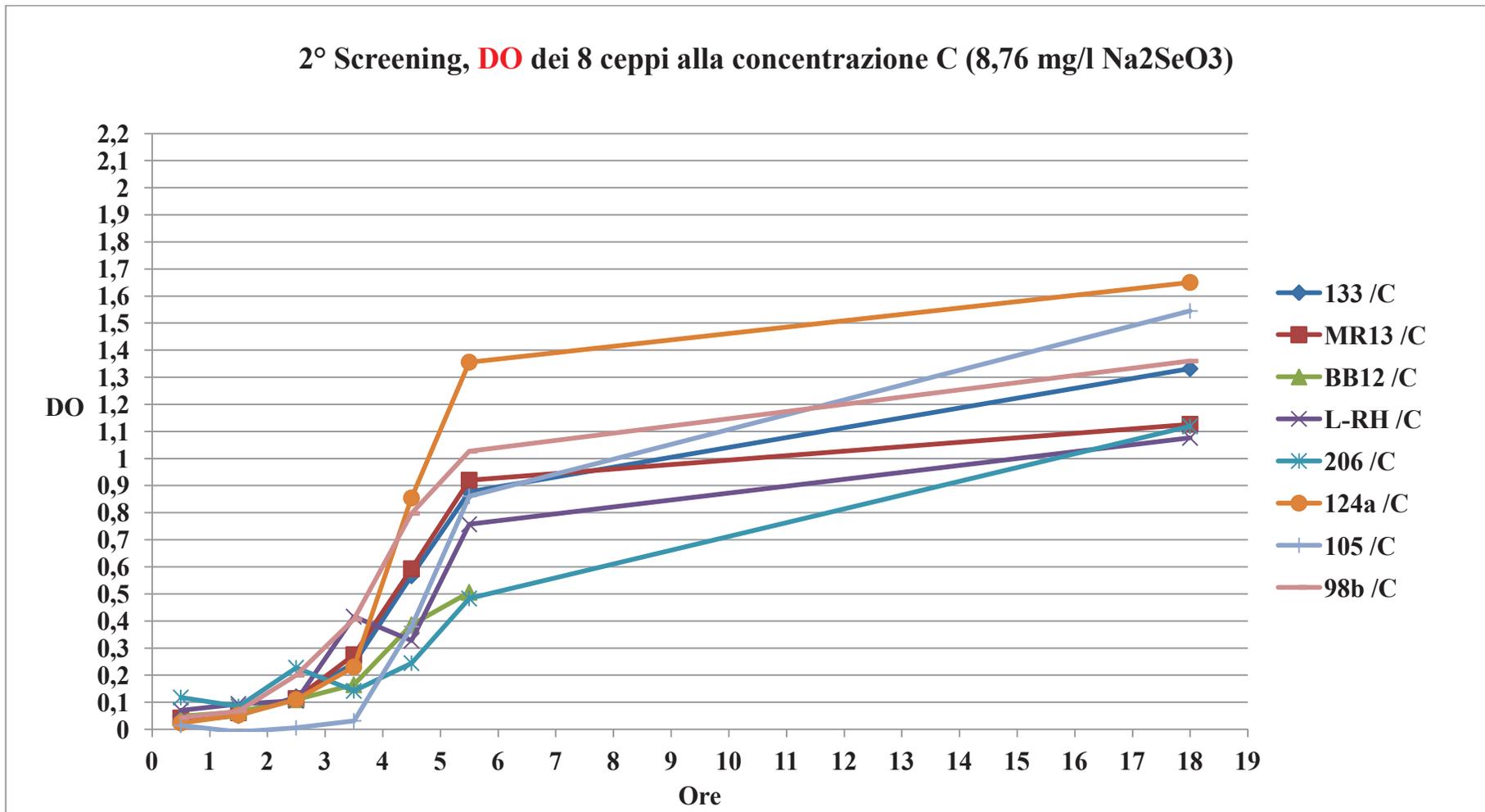


Grafico 10: Valutazione dello sviluppo microbico per densità ottica in fase 1 e 2 degli 8 ceppi di batteri lattici selezionati nel primo screening, crescita su terreno mMRS alla concentrazione di 8.76 mg/l di Na₂SeO₃.

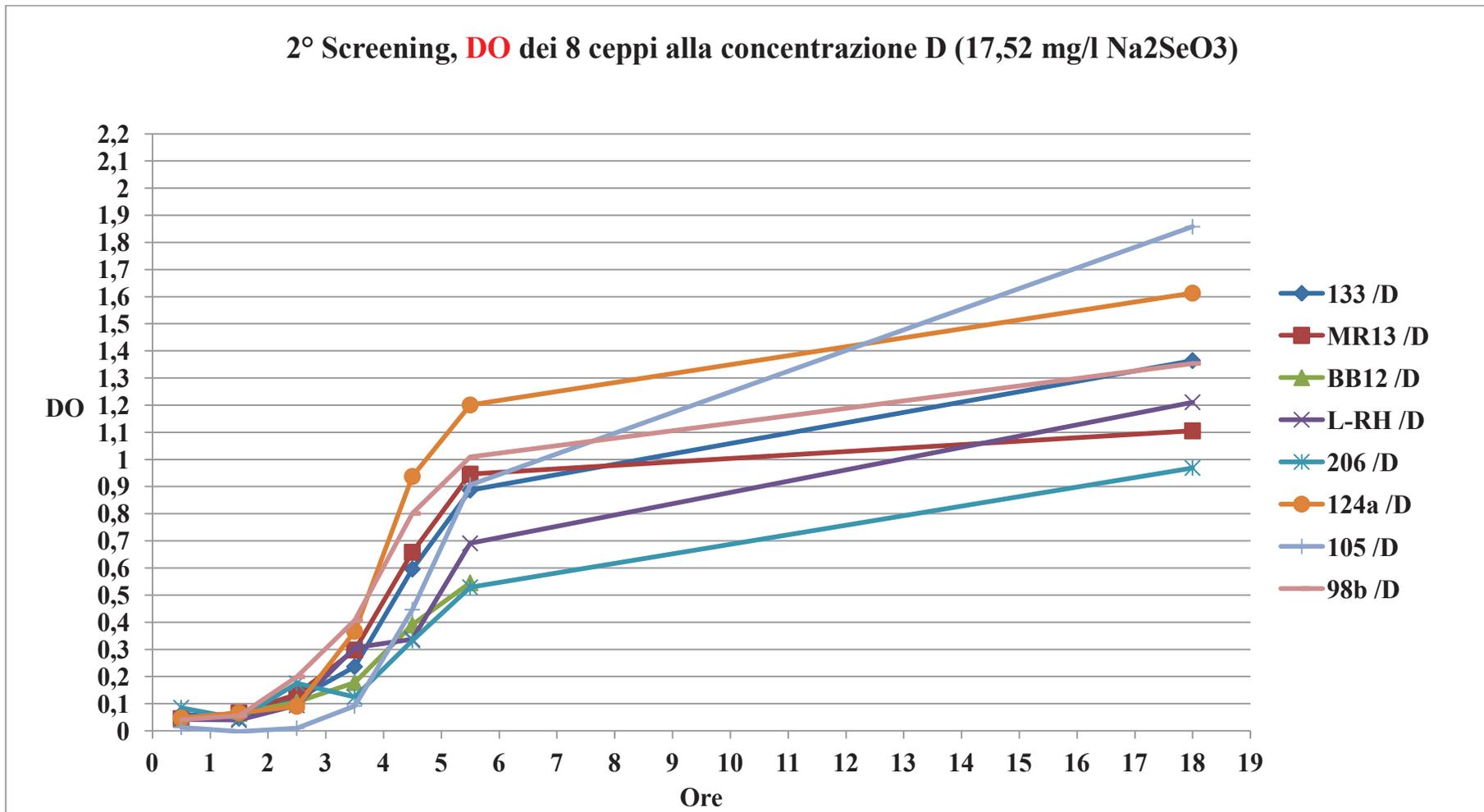


Grafico 11: Valutazione dello sviluppo microbico per densità ottica in fase 1 e 2 degli 8 ceppi di batteri lattici selezionati nel primo screening, crescita su terreno mMRS alla concentrazione di 17.52 mg/l di Na₂SeO₃.

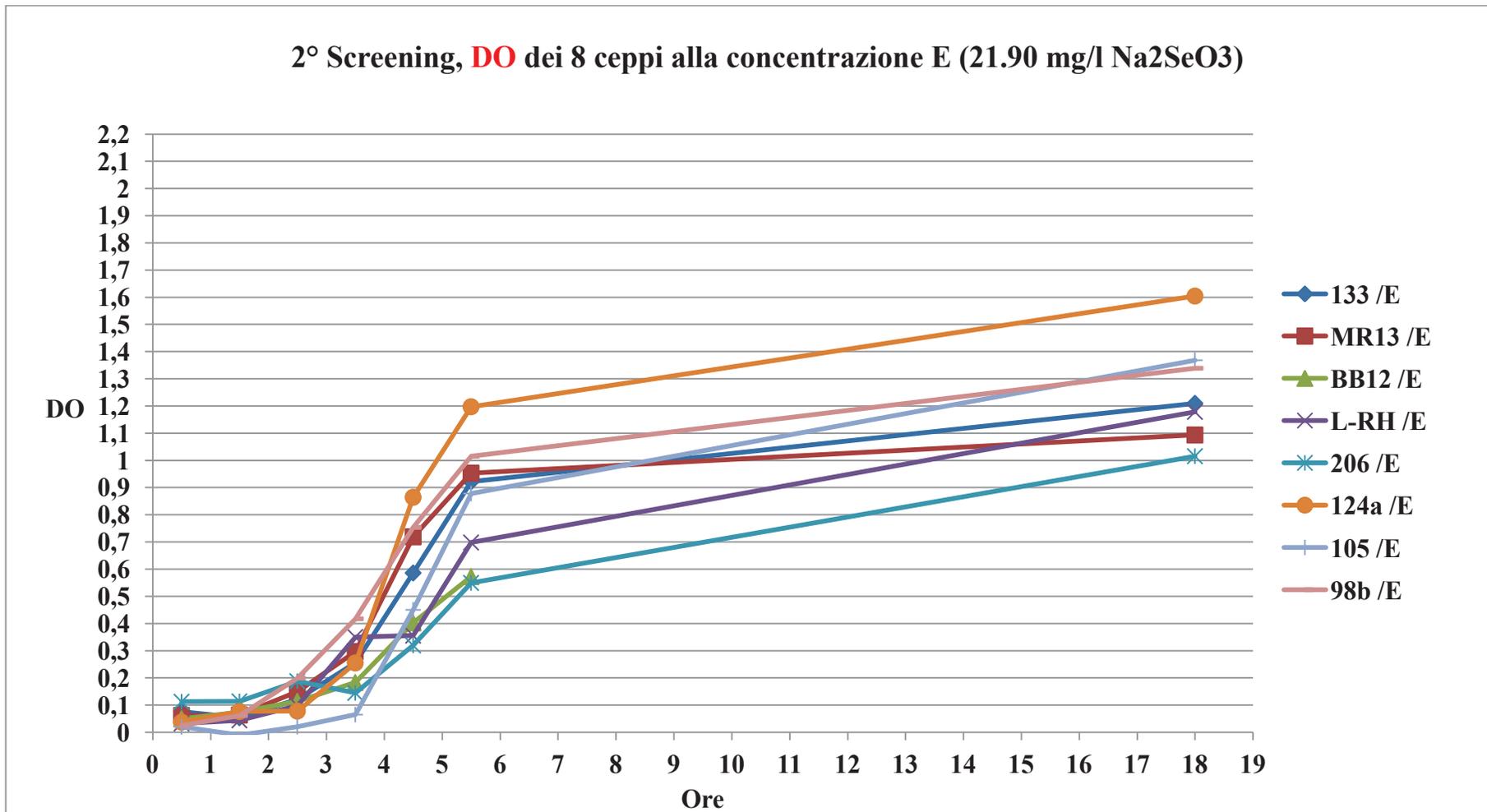


Grafico 12: Valutazione dello sviluppo microbico per densità ottica in fase 1e 2 degli 8 ceppi di batteri lattici selezionati nel primo screening, crescita su terreno mMRS alla concentrazione di 21.90 mg/l di Na₂SeO₃.

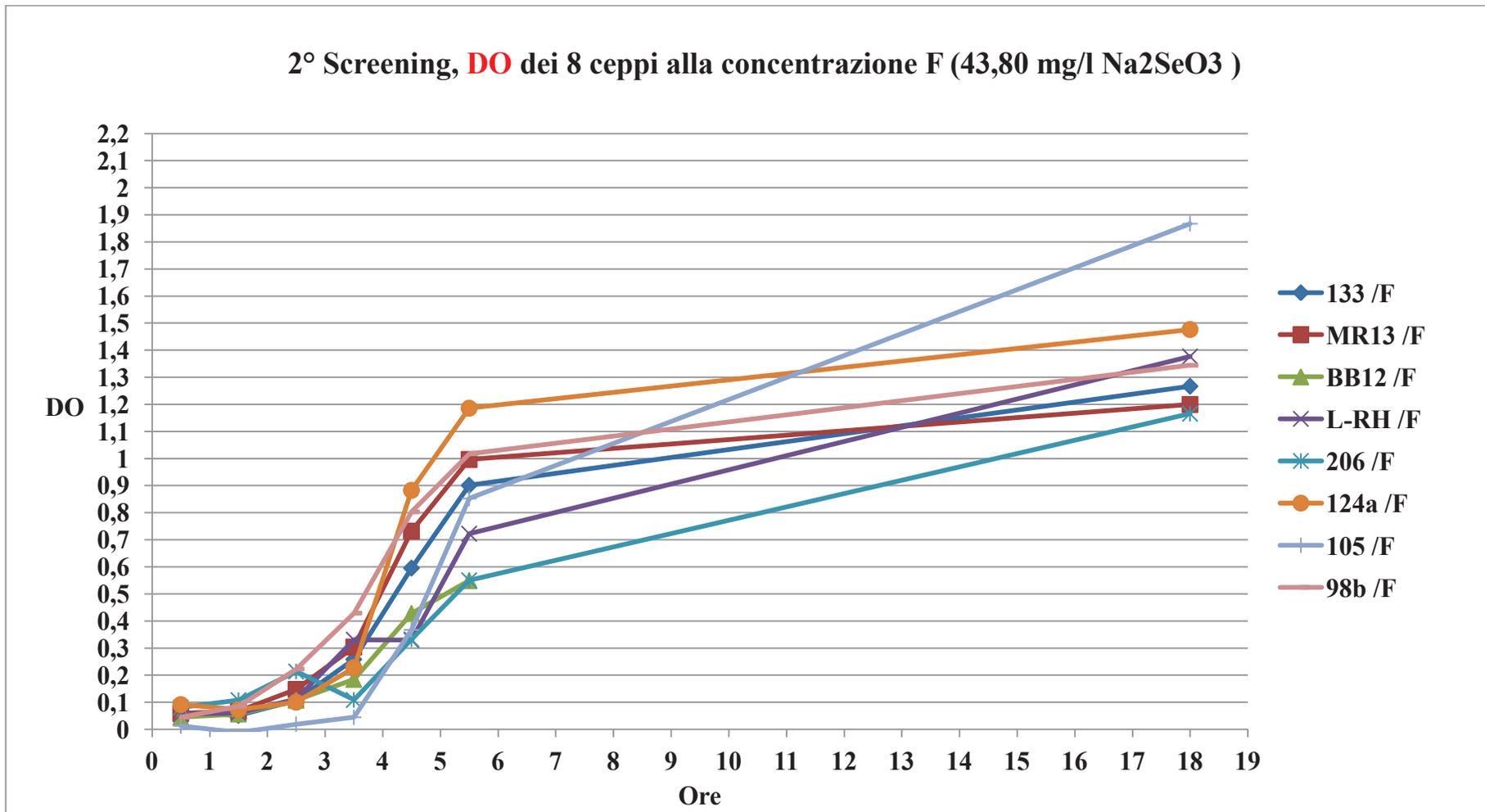


Grafico 13: Valutazione dello sviluppo microbico per densità ottica in fase 1 e 2 degli 8 ceppi di batteri lattici selezionati nel primo screening, crescita su terreno mMRS alla concentrazione di 43.80 mg/l di Na₂SeO₃.

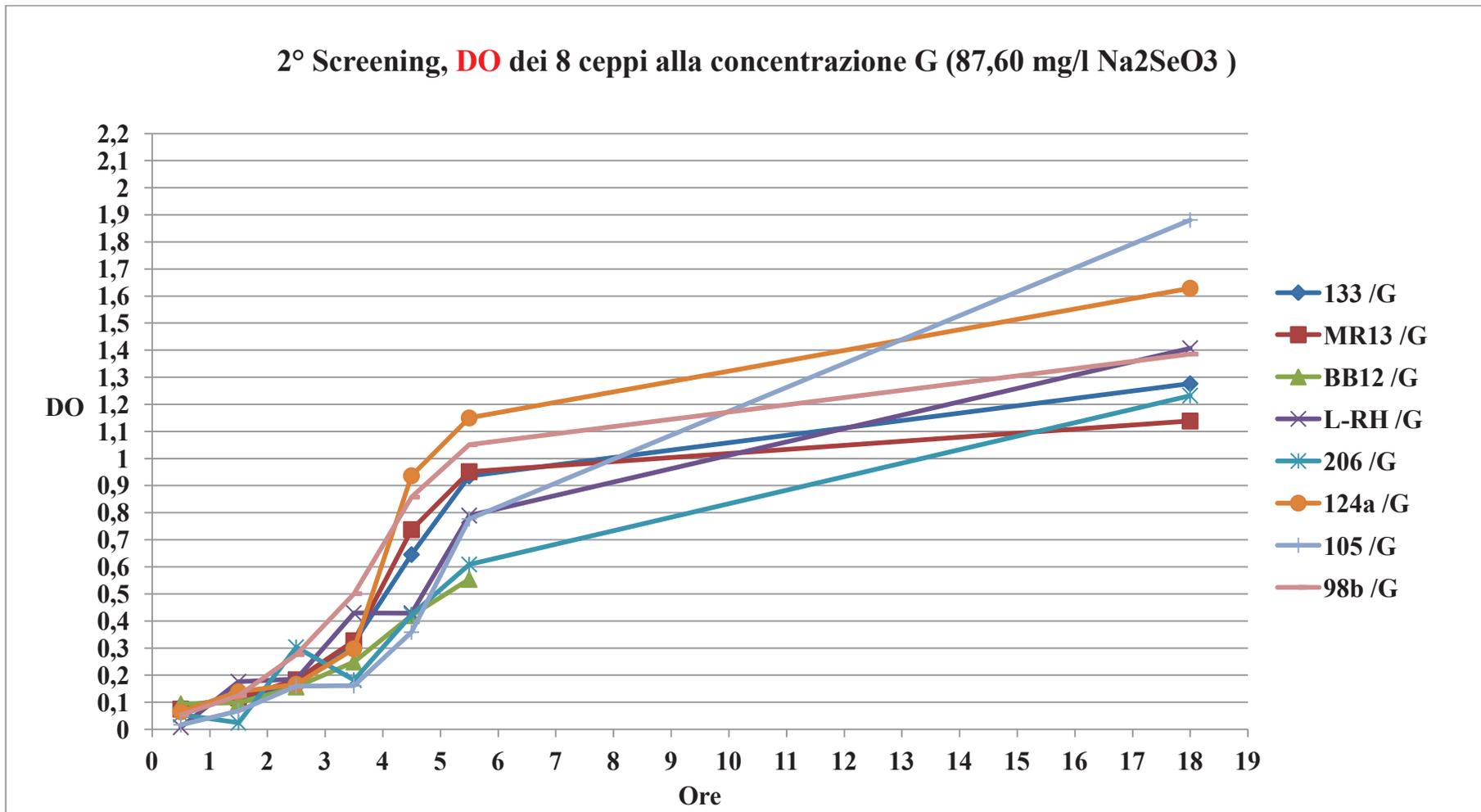


Grafico 14: Valutazione dello sviluppo microbico per densità ottica in fase 1 e 2 degli 8 ceppi di batteri lattici selezionati nel primo screening, crescita su terreno mMRS alla concentrazione di 87.60 mg/l di Na₂SeO₃.

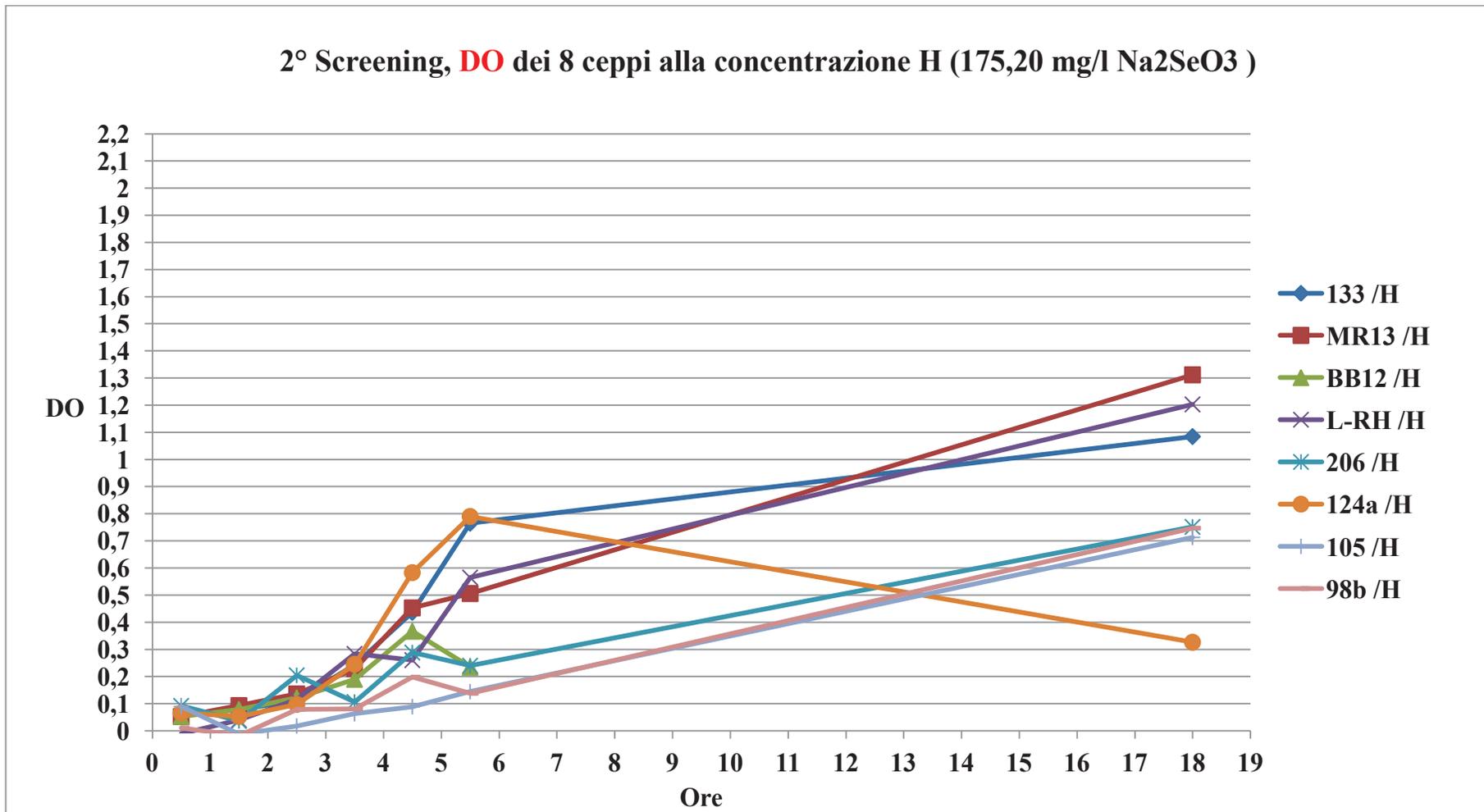


Grafico 15: Valutazione dello sviluppo microbico per densità ottica in fase 1 e 2 degli 8 ceppi di batteri lattici selezionati nel primo screening, crescita su terreno mMRS alla concentrazione di 175.20 mg/l di Na₂SeO₃.

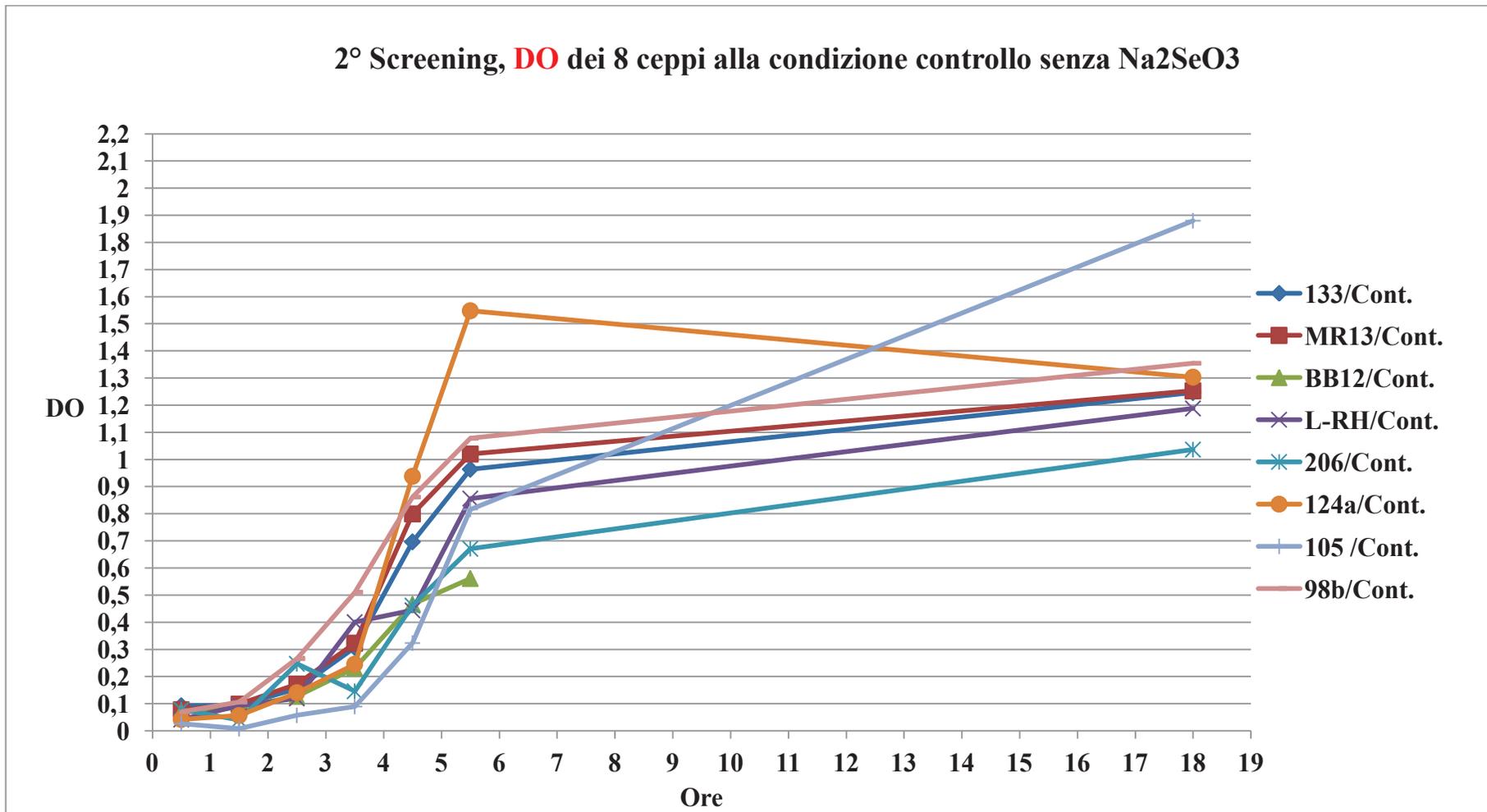


Grafico 16: Valutazione dello sviluppo microbico per densità ottica in fase 1 e 2 degli 8 ceppi di batteri lattici selezionati nel primo screening, crescita su terreno mMRS senza Na₂SeO₃.

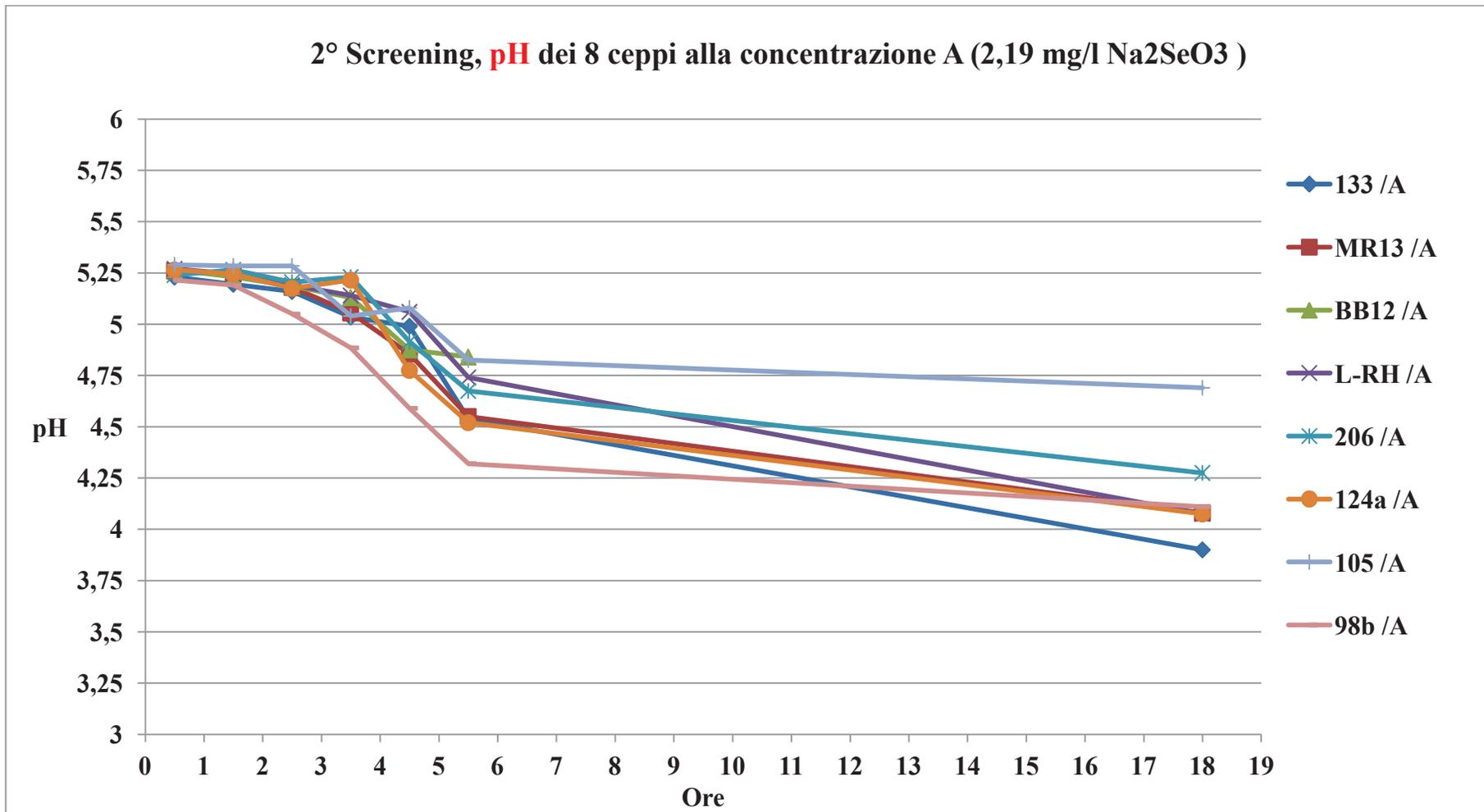


Grafico 17: Valutazione dello sviluppo microbico per pH in fase 1 e 2 degli 8 ceppi di batteri lattici selezionati nel primo screening, crescita su terreno mMRS alla concentrazione di 2.19 mg/l di Na₂SeO₃.

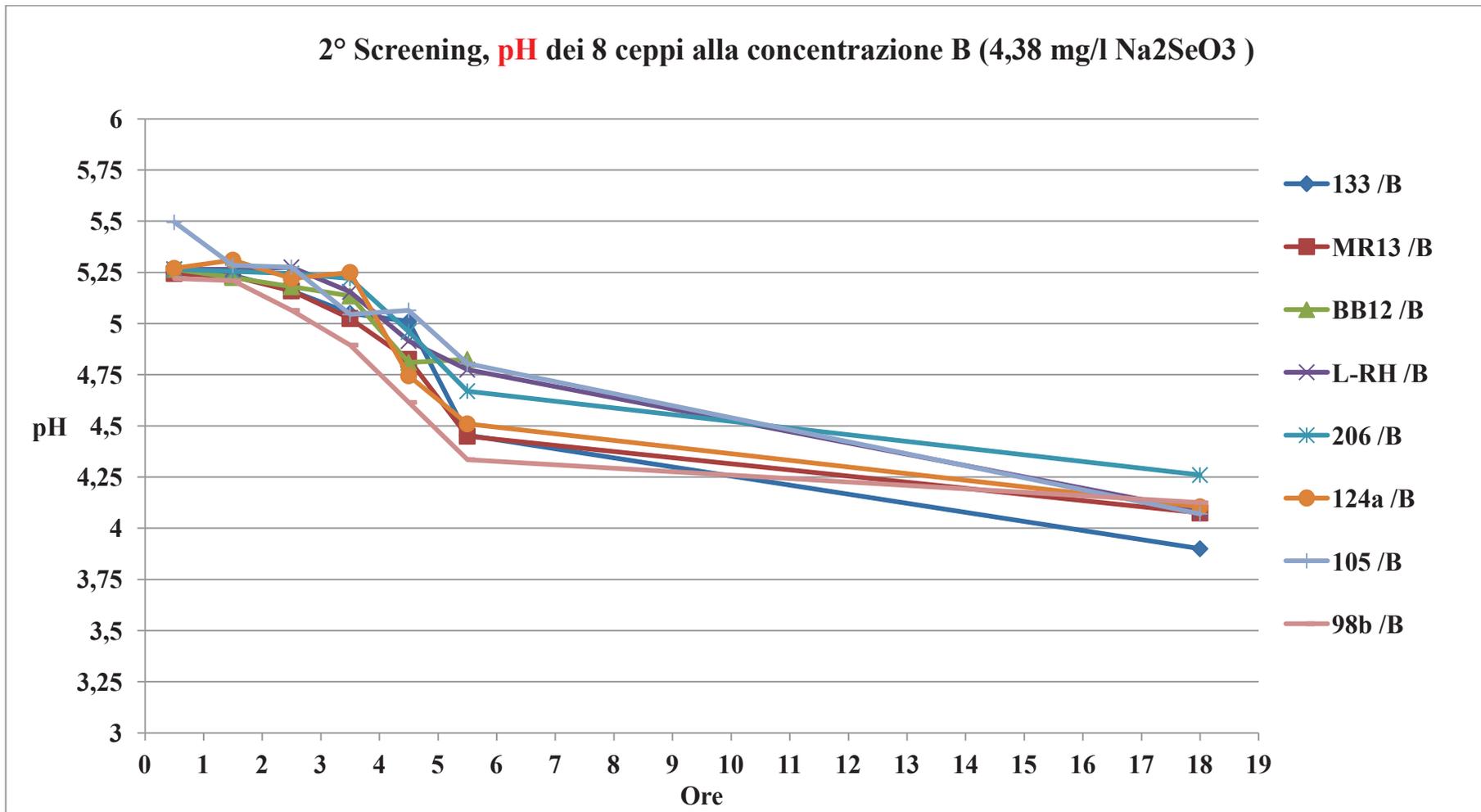


Grafico 18: Valutazione dello sviluppo microbico per pH in fase 1 e 2 degli 8 ceppi di batteri lattici selezionati nel primo screening, crescita su terreno mMRS alla concentrazione di 4.38 mg/l di Na₂SeO₃.

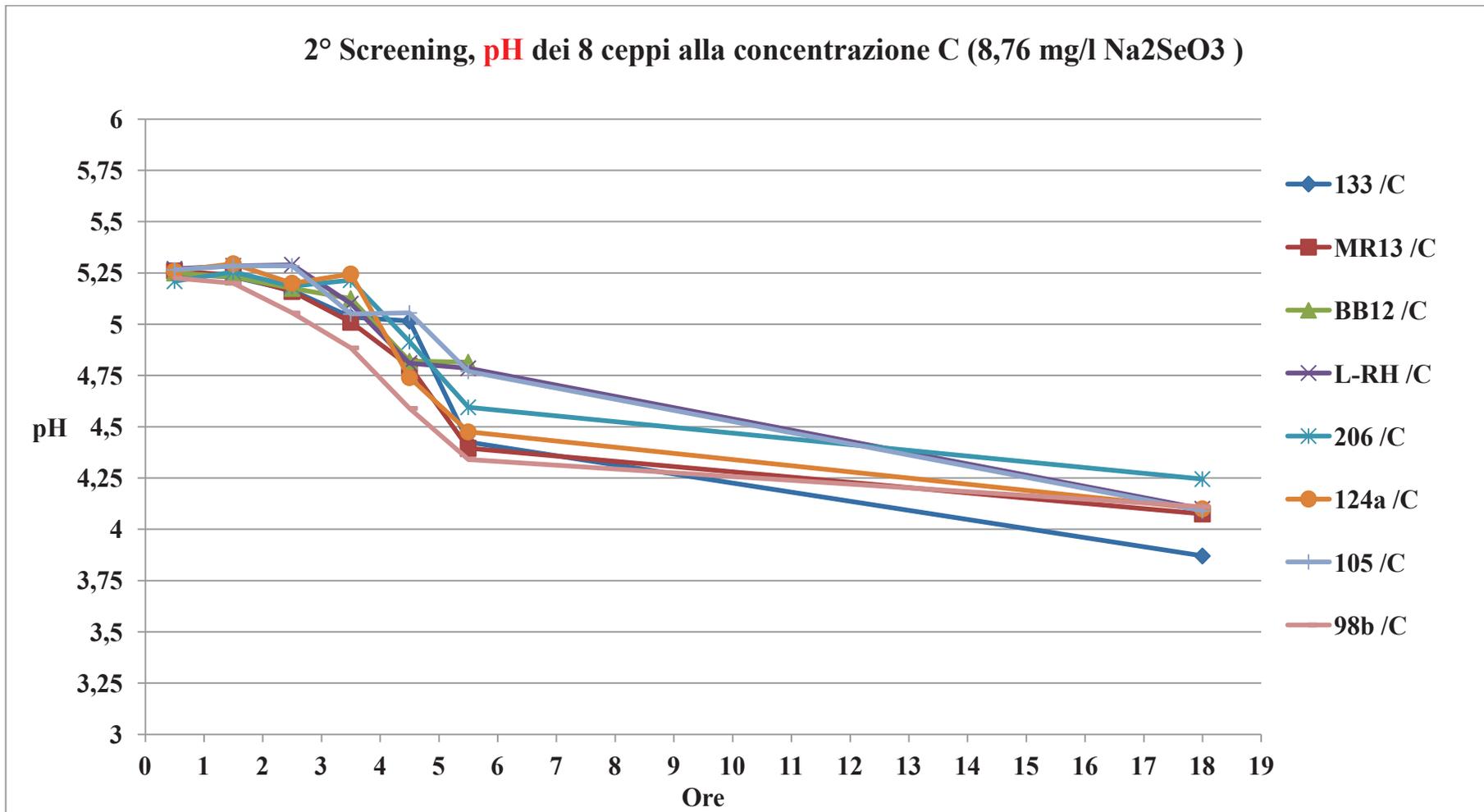


Grafico 19: Valutazione dello sviluppo microbico per pH in fase 1 e 2 degli 8 ceppi di batteri lattici selezionati nel primo screening, crescita su terreno mMRS alla concentrazione di 17.52 mg/l di Na₂SeO₃.

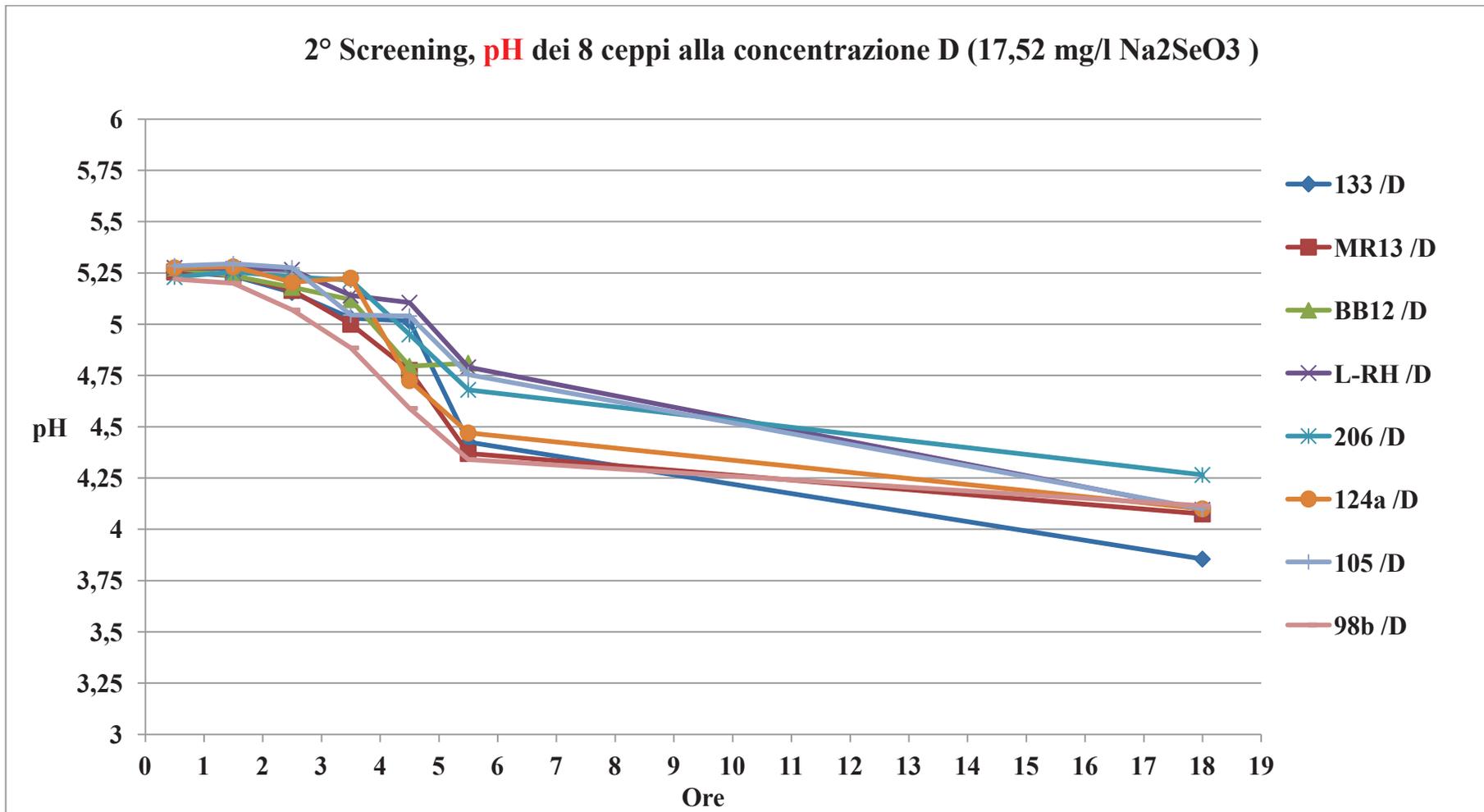


Grafico 20: Valutazione dello sviluppo microbico per pH in fase 1 e 2 degli 8 ceppi di batteri lattici selezionati nel primo screening, crescita su terreno mMRS alla concentrazione di 17.52 mg/l di Na₂SeO₃.

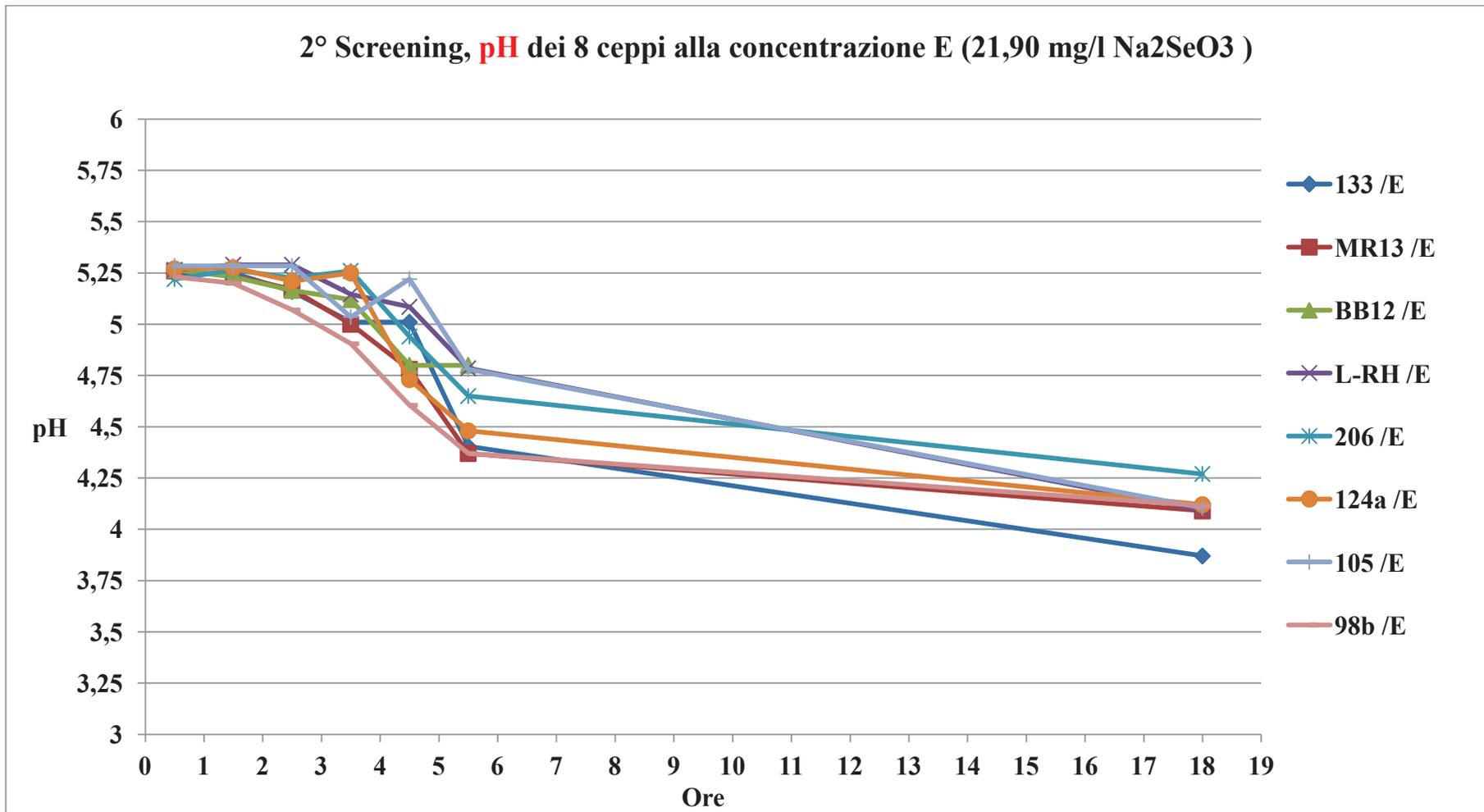


Grafico 21: Valutazione dello sviluppo microbico per pH in fase 1 e 2 degli 8 ceppi di batteri lattici selezionati nel primo screening, crescita su terreno mMRS alla concentrazione di 21.90 mg/l di Na₂SeO₃.

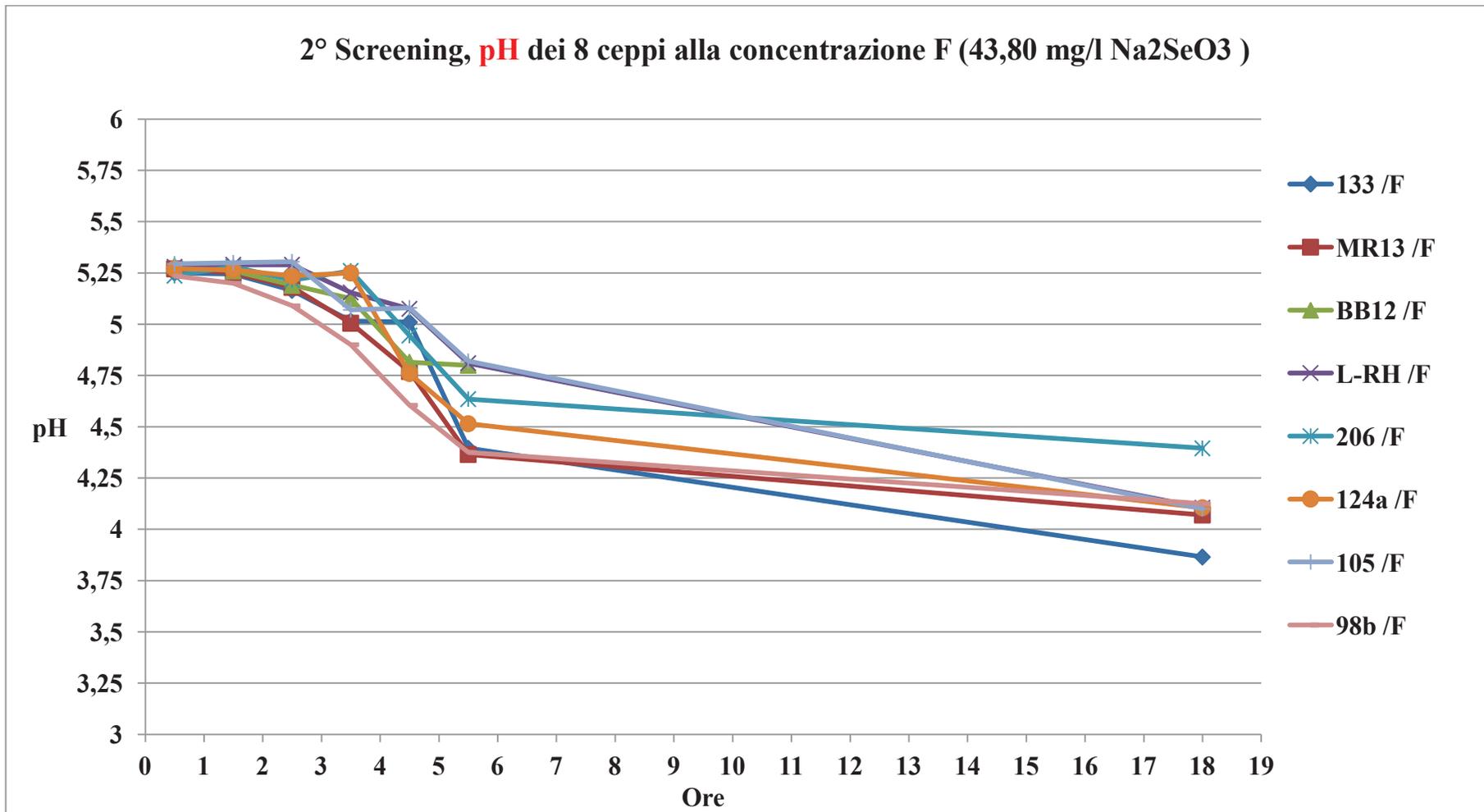


Grafico 22: Valutazione dello sviluppo microbico per pH in fase 1 e 2 degli 8 ceppi di batteri lattici selezionati nel primo screening, crescita su terreno mMRS alla concentrazione di 43.80 mg/l di Na₂SeO₃.

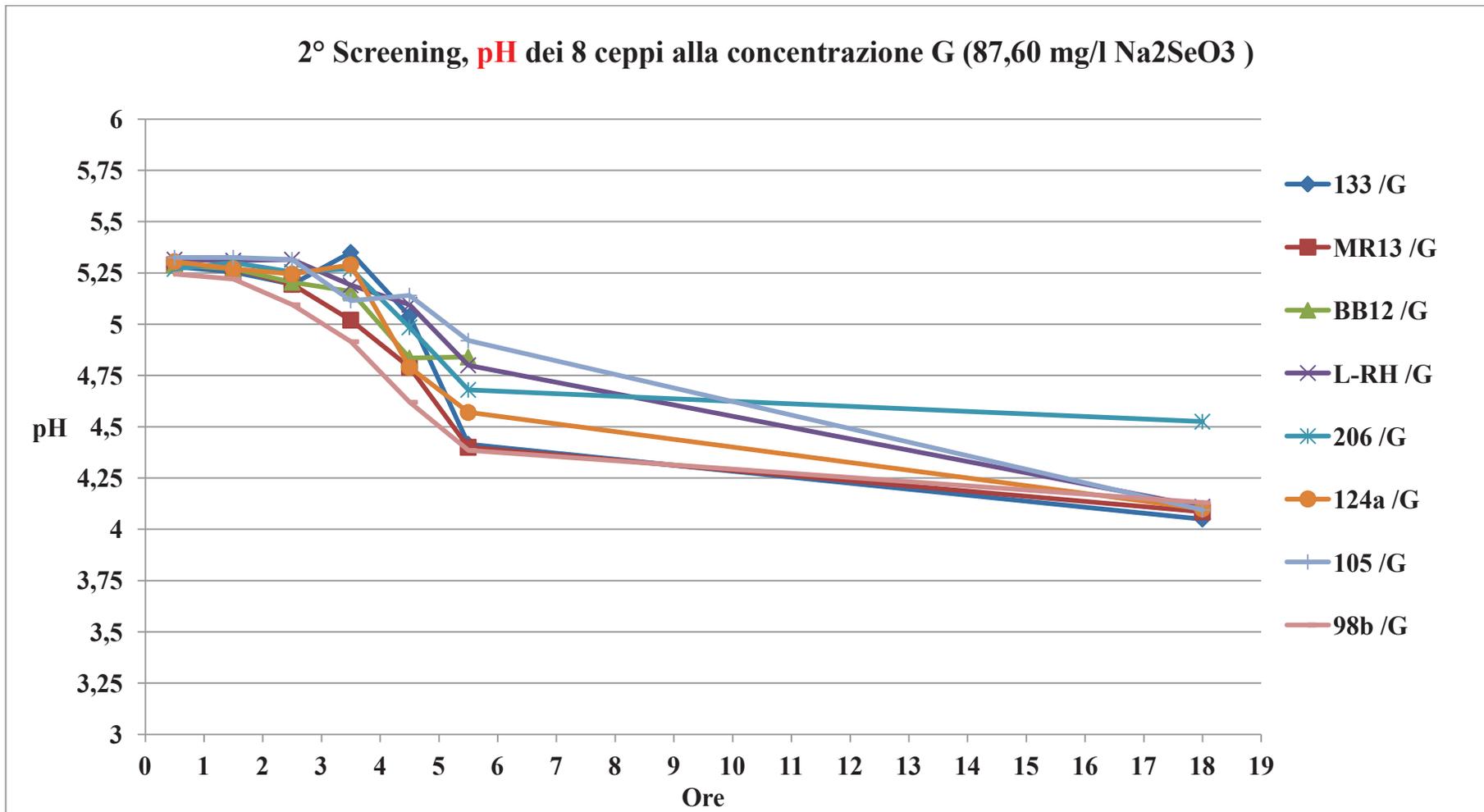


Grafico 23: Valutazione dello sviluppo microbico per pH in fase 1 e 2 degli 8 ceppi di batteri lattici selezionati nel primo screening, crescita su terreno mMRS alla concentrazione di 87.60 mg/l di Na₂SeO₃.

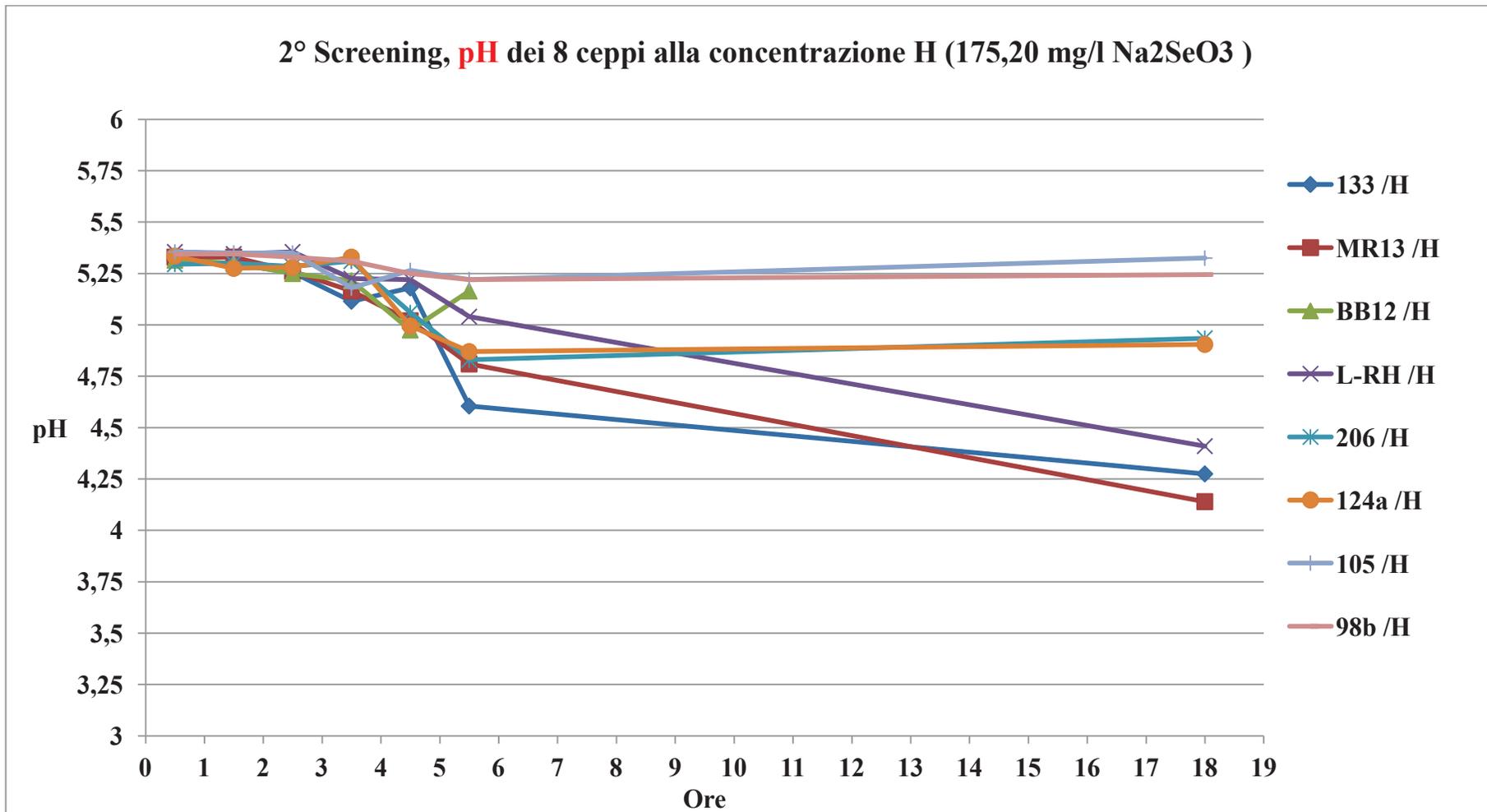


Grafico 24: Valutazione dello sviluppo microbico per pH in fase 1 e 2 degli 8 ceppi di batteri lattici selezionati nel primo screening, crescita su terreno mMRS alla concentrazione di 175.20 mg/l di Na₂SeO₃.

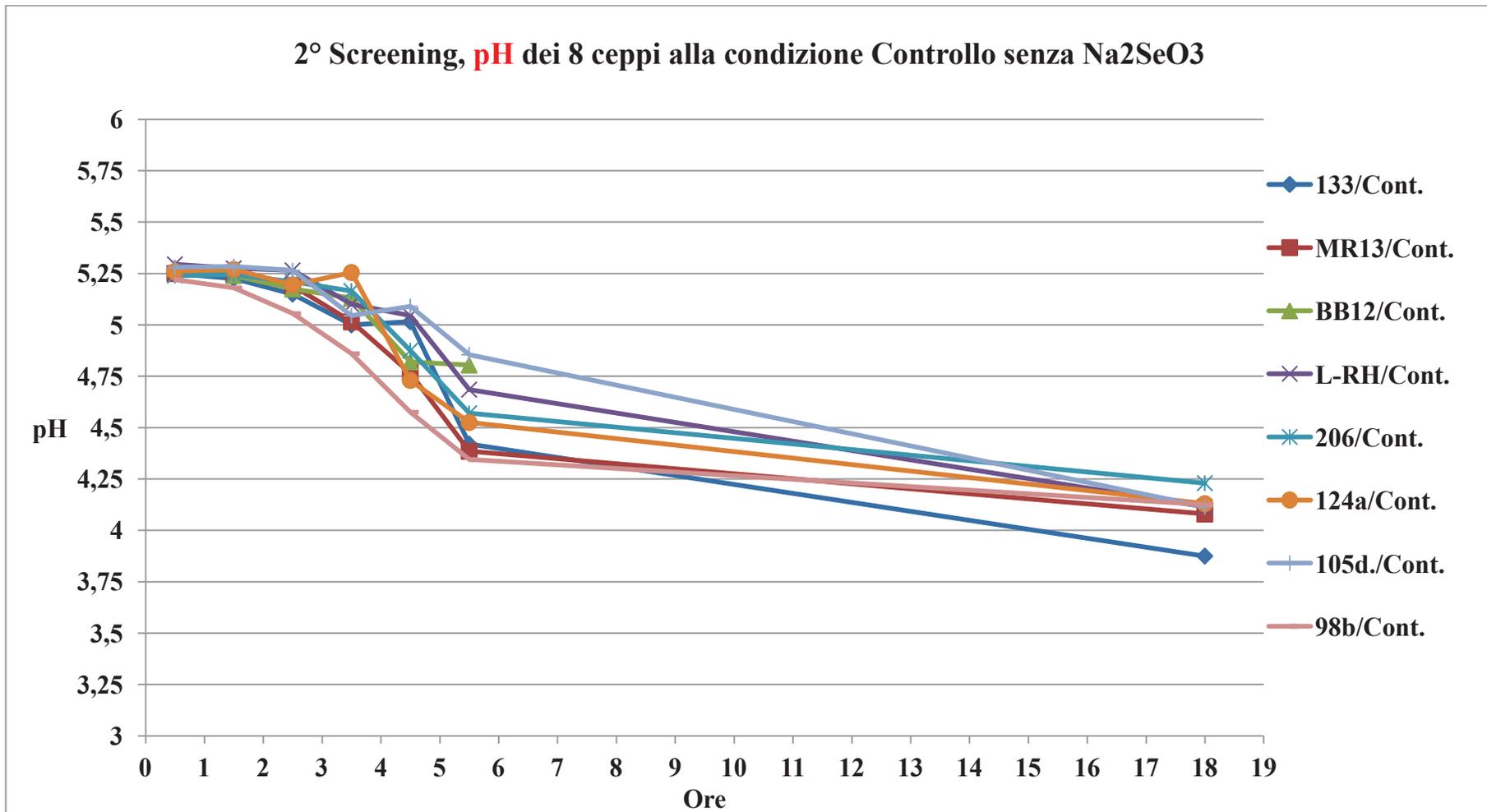


Grafico 25: Valutazione dello sviluppo microbico per pH in fase 1 e 2 degli 8 ceppi di batteri lattici selezionati nel primo screening, crescita su terreno mMRS senza Na₂SeO₃.

Ceppi	10 ⁹ Log CFU/g	Dev.St	Ceppi	10 ⁹ Log CFU/g	Dev.St
133/A	9,7572 ± 0,6533		39 /A	8,671 ± 0,155	
133/B	8,4897 ± 0,4970		39 /B	8,723 ± 0,304	
133/Cont	10,3555 ± 1,0440		39 /Cont	8,770 ± 0,259	
MR13/A	9,528 ± 0,171		25 /A	9,347 ± 0,051	
MR13/B	9,323 ± 0,051		25 /B	9,029 ± 0,003	
MR13/Cont	10,540 ± 1,608		25 /Cont	8,717 ± 0,127	
BB12 /A	10,629 ± 1,687		5bhi /A	9,227 ± 0,082	
BB12 /B	10,185 ± 1,229		5bhi /B	9,425 ± 0,046	
BB12 /Cont	8,887 ± 0,175		5bhi /Cont	9,314 ± 0,342	
L-RH C1122 /A	9,289 ± 0,173		98a /A	9,546 ± 0,702	
L-RH C1122/B	8,874 ± 0,061		98a /B	9,301 ± 0,361	
L-RH C1122 /Cont.	8,765 ± 0,293		98a /Cont	9,287 ± 0,226	
206/A	9,2077 ± 0,2042		189a /A	9,718 ± 0,760	
206/B	9,1793 ± 0,2538		189a /B	9,516 ± 0,226	
206/Cont	9,3547 ± 0,3598		189a /Cont	9,846 ± 0,750	
124a/A	8,930 ± 0,886		8bhi /A	9,295 ± 0,307	
124a/B	8,882 ± 0,358		8bhi /B	9,387 ± 0,219	
124a/Cont	8,773 ± 0,644		8bhi /Cont	9,471 ± 0,029	
105 /A	8,770 ± 0,155		98b /A	9,915 ± 0,688	
105 /B	8,814 ± 0,314		98b /B	9,284 ± 0,559	
105 /Cont	8,504 ± 0,042		98b /Cont	9,721 ± 0,312	
91 /A	9,939 ± 0,788				
91 /B	10,322 ± 1,154				
91 /Cont	10,452 ± 1,643				

Tabella 17: Conte Microbiche dei 15 batteri lattici a fine fase 2. Le lettere a fianco i valori identificano: **A** 2,19 mg/l Na₂SeO₃; **B**: 4,38 mg/l Na₂SeO₃ e **Cont**: Controllo. Si riporta la rispettiva deviazione standard.

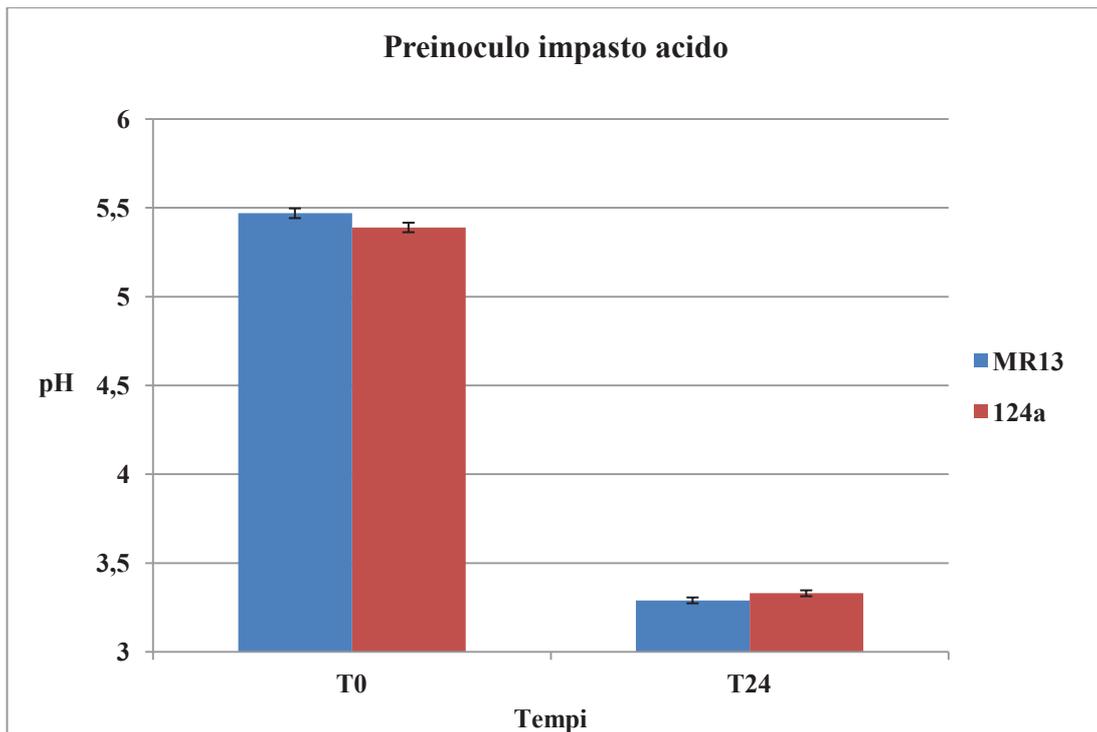


Grafico 26: Valori del pH al T0 e T24 del preinoculo di impasto acido di MR13 e 124a . L'errore rappresenta la deviazione standard.

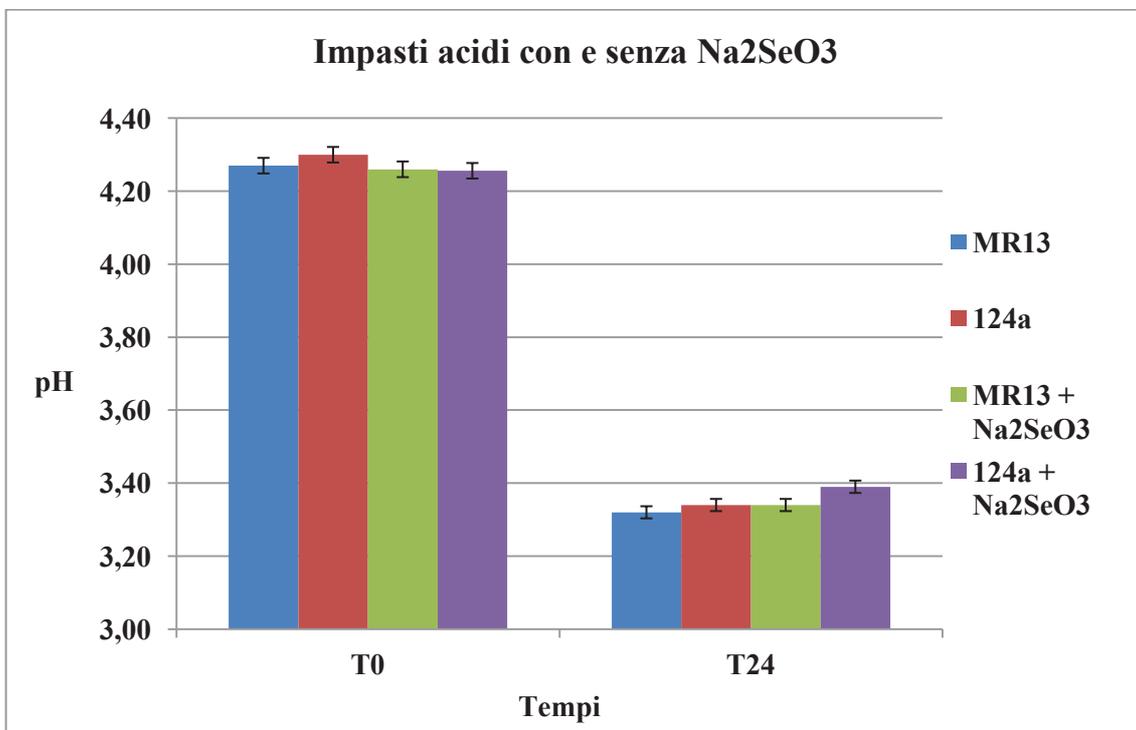


Grafico 27: Valori del pH al T0 e T24 dell'impasto acido MR13, 124a , MR13 + Na₂SeO₃ e 124a + Na₂SeO₃. L'errore rappresenta la deviazione standard.

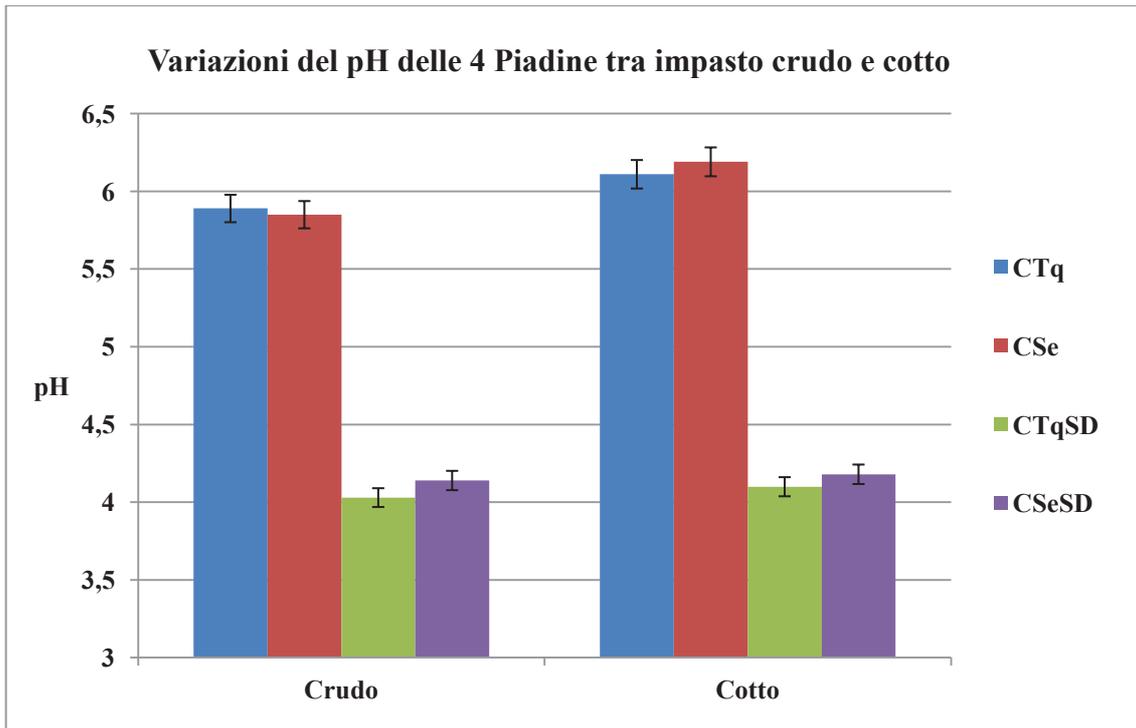


Grafico 28: Valori del pH nei campioni CTq, CSe, CTqSD, CSeSD nelle condizioni di impasto crudo e piadina cotta. L'errore rappresenta la deviazione standard.

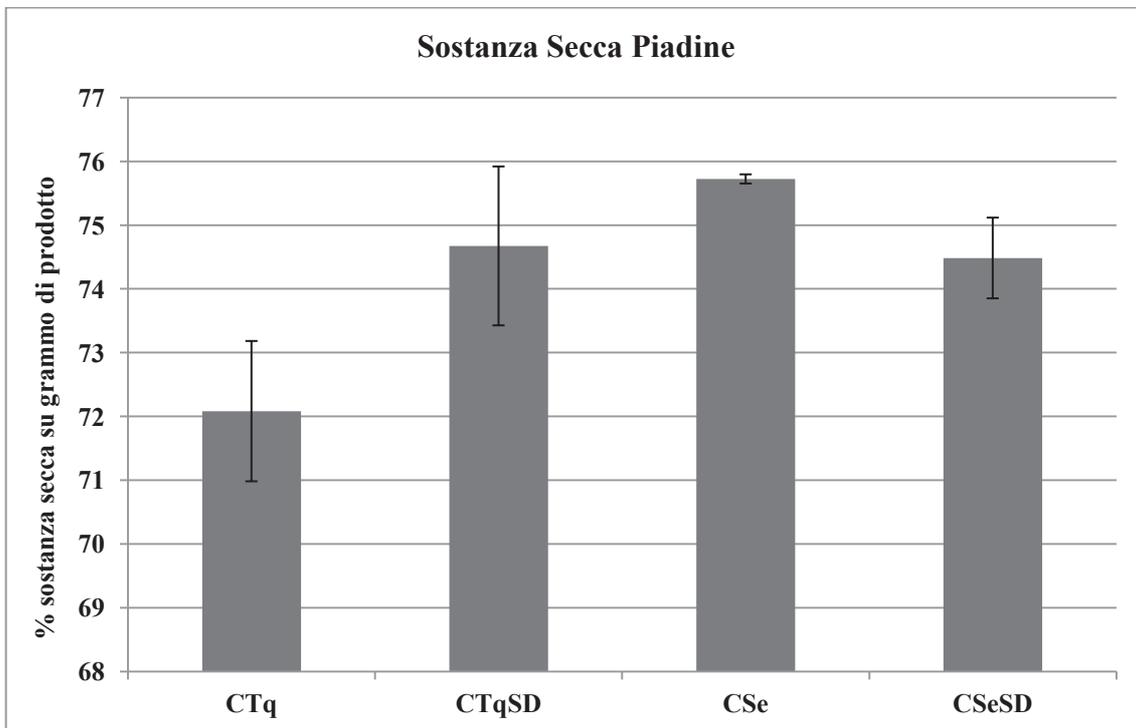


Grafico 29: Valori percentuali di sostanza secca nei campioni di piadina (CTq, CSe, CTqSD e CSeSD). L'errore rappresenta la deviazione standard.

A) Preinoculo impasti acidi		Log CFU/g	Dev.st	Δ Log CFU/g
T0	MR13	8,582 ±	0,740	-
	124a	8,737 ±	0,405	-
T24	MR13	9,105 ±	0,267	0,523
	124a	9,034 ±	0,209	9,034

B) Impasti acidi con e senza Selenito di sodio		Log CFU/g	Dev.st	Δ Log CFU/g
T0	MR13	8,940 ±	0,092	-
	MR13 + Na ₂ SeO ₃	8,676 ±	0,152	-
	124a	9,074 ±	0,304	-
	124a + Na ₂ SeO ₃	9,402 ±	0,624	-
T24	MR13	9,000 ±	0,090	0,060
	MR13 + Na ₂ SeO ₃	8,754 ±	0,502	0,077
	124a	9,031 ±	0,178	-0,043
	124a + Na ₂ SeO ₃	7,869 ±	1,139	-1,533

C) Impasto Crudo e Piadine		Log CFU/g	Dev.st	Δ Log CFU/g
Impasto crudo Ctq		3,340 ±	0,464	-
Impasto crudo, CSe		3,852 ±	1,252	-
Impasto crudo, CTqSD		8,547 ±	1,491	-
Impasto crudo, CSeSD		8,273 ±	0,960	-
Piadina Ctq		2,041 ±	0,557	-1,299
Piadina, CSe		1,628 ±	0,516	-2,223
Piadina, CTqSD		2,994 ±	0,845	-5,552
Piadina, CSeSD		3,490 ±	0,883	-4,783

Tabella 18: Campionamenti del: A) **Preinoculo** al T0 e T24 dell'impasto acido MR13 e 124a ; B) **Impasti acidi con e senza Na₂SeO₃** al T0 e T24 per MR13 e 124 ; C) **Impasti crudi e Piadine** nelle rispettive quattro condizioni sperimentali. Si riporta la rispettiva deviazione standard. In Δ Log CFU/g si indica la differenza nel conteggio tra la condizione al T0 e T24 per il preinoculo impasti acidi e impasti acidi con e senza selenito di sodio e tra impasto crudo e piadina nelle diverse condizioni sperimentali.

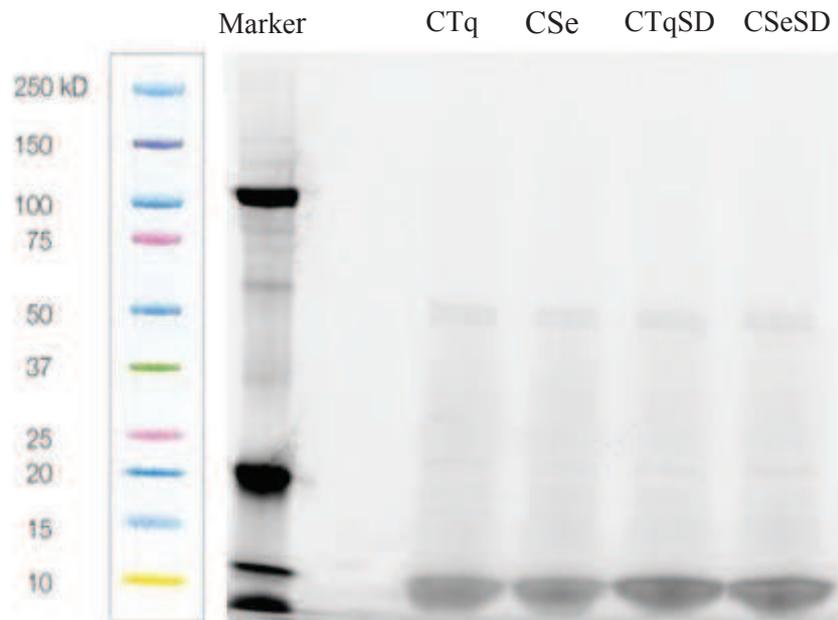


Figura 31: Elettroforesi SDS-PAGE su digeriti gastrici tal quali di piadina.

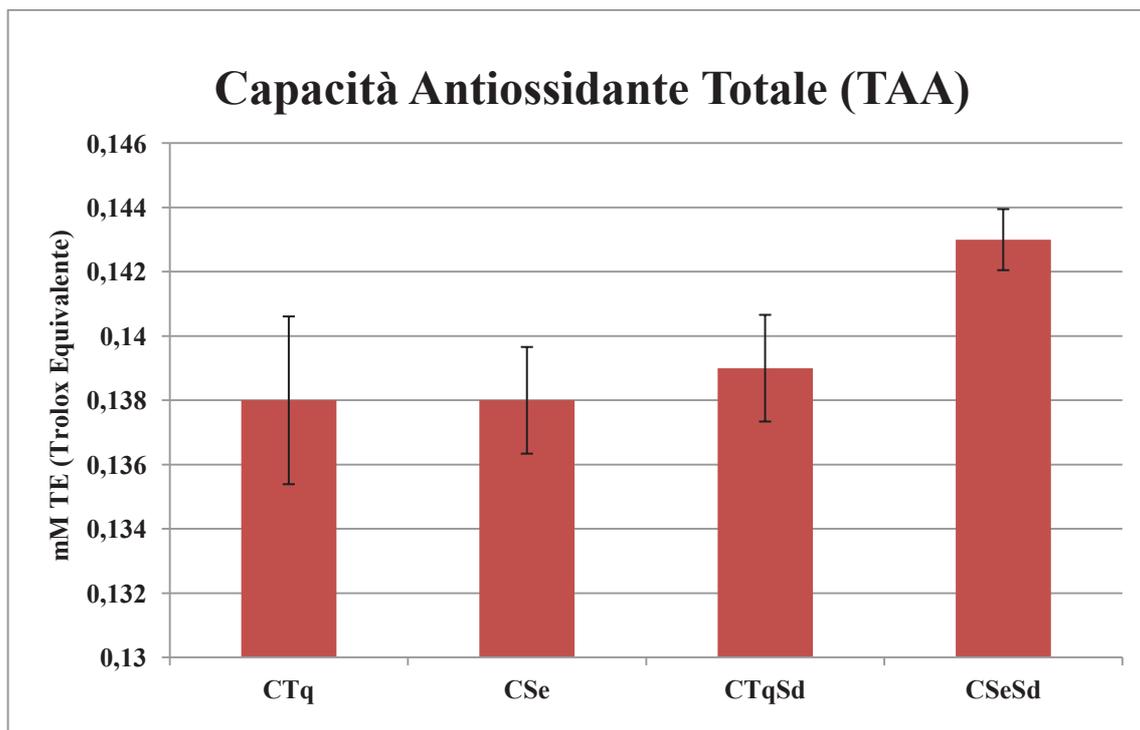


Grafico 30: Risultati della capacità antiossidante totale (TAA) dei digeriti gastrici tal quali di piadina. L'errore rappresenta la deviazione standard.

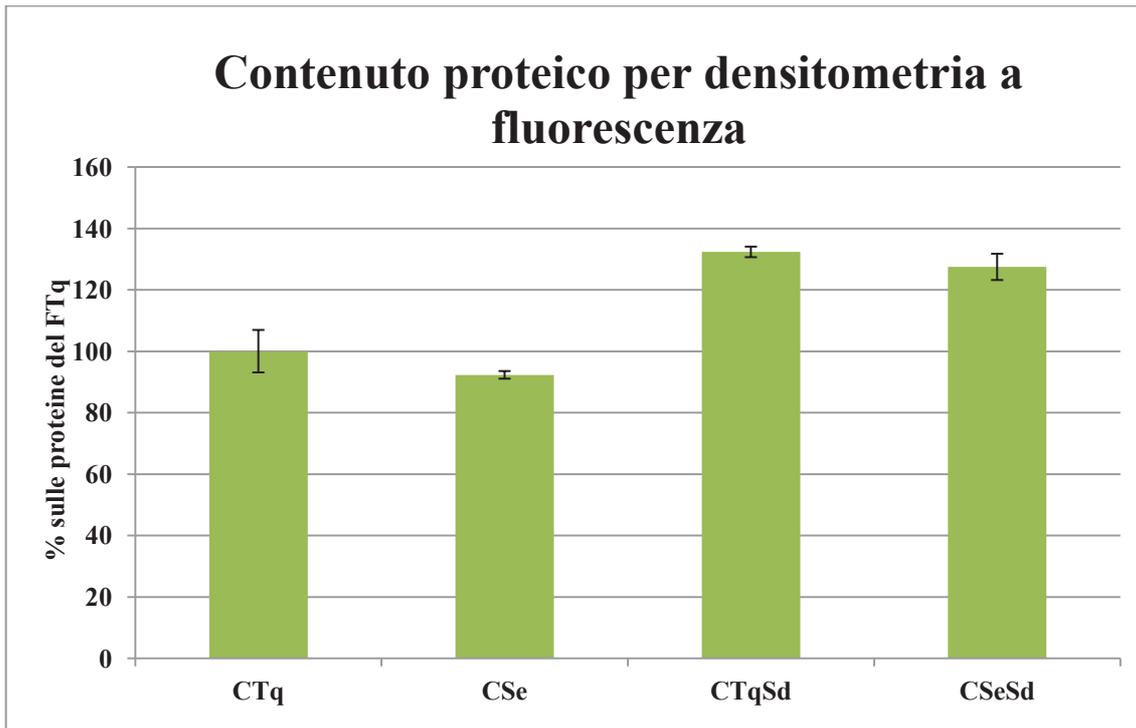


Grafico 31: Risultati della densitometria a fluorescenza SDS-PAGE. L'errore rappresenta la deviazione standard.

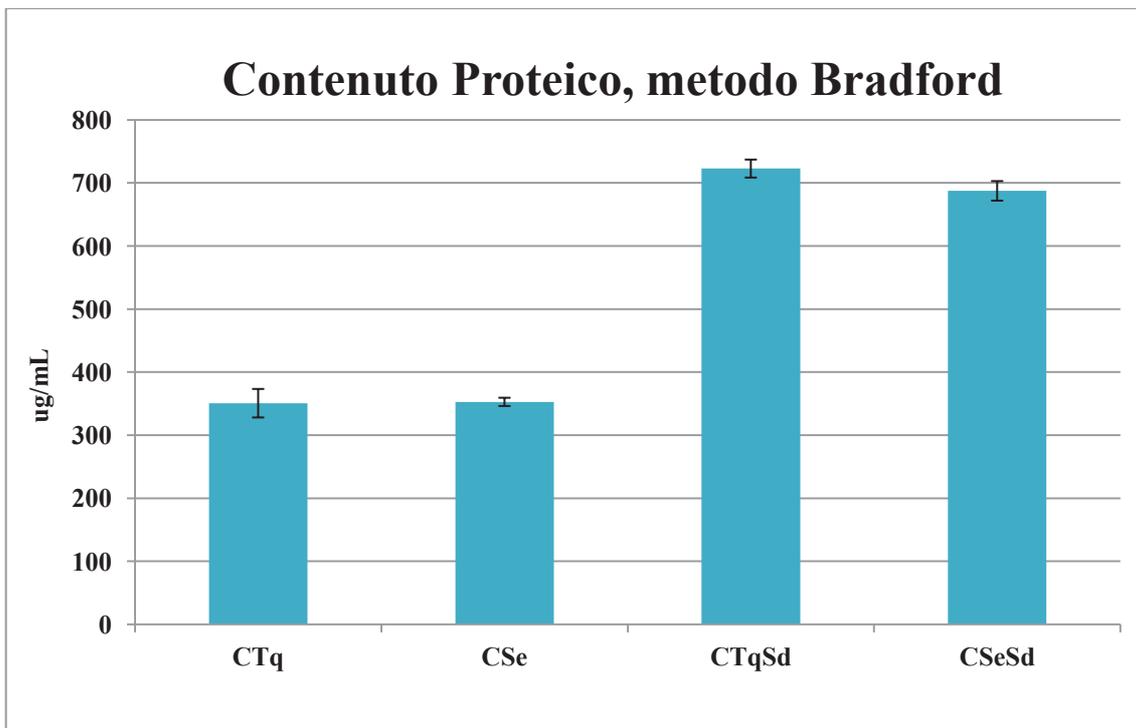


Grafico 32: Risultati del contenuto proteico totale su metodologia Bradford dei digeriti gastrici tal quali di piadina. L'errore rappresenta la deviazione standard.

Allegati

	Void	MeSeCys	Dev.st	SeMet	Dev.st	SeIV	Dev.st	SeVI	Dev.st	U1	Somma specie	Dev.st	TOT ICP-MS	Dev.st
CTq<3KDa	0,0003	ND	-	0,0016	± 8,22E-05	ND	-	0,001	± 3,51E-05	ND	0,003	± 1,30E-04	0,006	± 3,10E-04
CTq	0,0005	0,00015	± 7,47E-06	0,0016	± 8,00E-05	ND	-	0,001	± 3,01E-05	ND	0,003	± 1,42E-04	0,022	± 1,10E-03
CTqSD<3KDa	0,0002	ND	-	0,0015	± 7,59E-05	ND	-	0,001	± 4,30E-05	ND	0,003	± 1,29E-04	0,007	± 3,53E-04
CTqSD	0,0005	ND	-	0,0026	± 1,28E-04	ND	-	0,001	± 3,93E-05	ND	0,004	± 1,93E-04	0,012	± 6,14E-04
CSe<3KDa	0,0008	0,00038	± 1,92E-05	0,0057	± 2,83E-04	0,039	± 1,93E-03	ND	-	ND	0,046	± 2,28E-03	0,127	± 6,34E-03
CSe	0,0012	ND	-	0,0064	± 3,20E-04	0,040	± 1,98E-03	ND	-	ND	0,047	± 2,36E-03	0,264	± 1,32E-02
CSeSD<3KDa	0,0008	0,00047	± 2,36E-05	0,0040	± 2,00E-04	0,003	± 1,74E-04	ND	-	ND	0,009	± 4,39E-04	0,109	± 5,46E-03
CSeSD	0,0012	0,00032	± 1,62E-05	0,0069	± 3,46E-04	0,004	± 2,25E-04	ND	-	ND	0,013	± 6,48E-04	0,265	± 1,33E-02

Tabella 19: Valori dell'analisi HPLC-ICP-MS per la speciazione delle diversi composti organici e inorganici contenenti Se. I valori riportati sono espressi in mg/kg con rispettiva deviazione standard.

	TOT ICP-MS	Dev.st
CTq<3KDa	0,006	± 3,10E-04
CTq	0,022	± 1,10E-03
CTqSD<3KDa	0,007	± 3,53E-04
CTqSD	0,012	± 6,14E-04
CSe<3KDa	0,127	± 6,34E-03
CSe	0,264	± 1,32E-02
CSeSD<3KDa	0,109	± 5,46E-03
CSeSD	0,265	± 1,33E-02

Tabella 20: Valori del selenio totale all'analisi HPLC-ICP-MS. Valori espressi in mg/kg con rispettiva deviazione standard

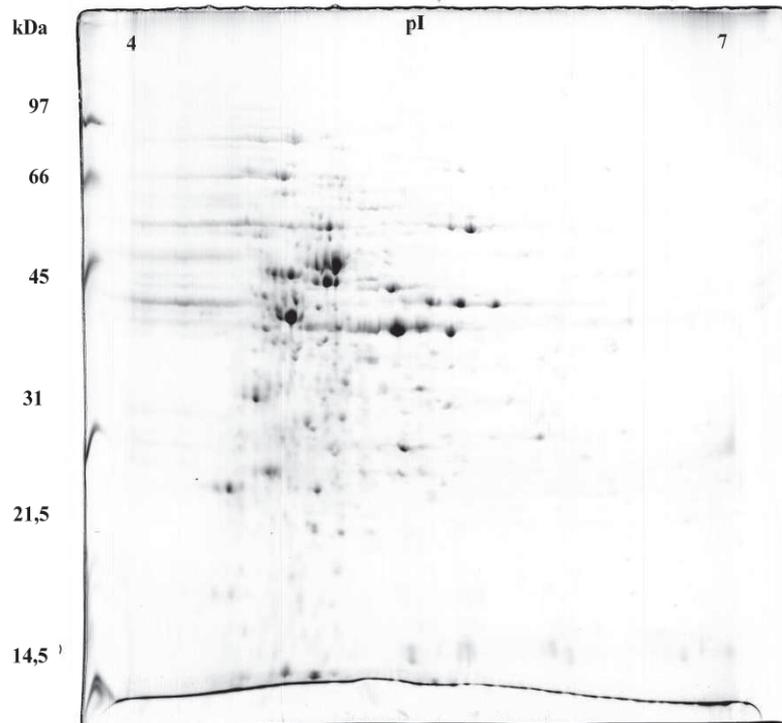


Figura 32: Gel 2-DE del ceppo 124a cresciuto in mMRS con 90,02 mg/L di Na_2SeO_3 .

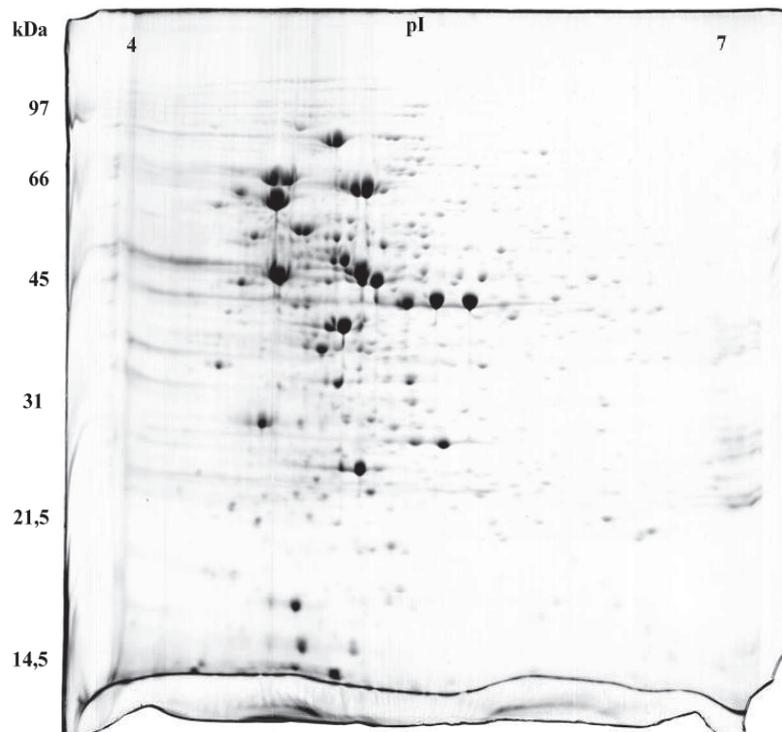


Figura 33: Gel 2-DE del ceppo 124a controllo cresciuto in mMRS senza Na_2SeO_3 .
