

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

Isolamento e identificazione di lieviti e batteri lattici da sottoprodotti  
dell'industria molitoria e loro impiego nella formulazione di pre-  
fermenti da utilizzare in panificazione

Tesi in Microbiologia delle fermentazioni

**Presentata da**

Alessio Gigli

**Relatore**

Prof.ssa Rosalba Lanciotti

**Correlatori**

Dott. Lorenzo Siroli

Dott.ssa Samantha Rossi

Sessione I

Anno Accademico 2019-2020

## SOMMARIO

1	Introduzione .....	1
1.1	I sottoprodotti dell'industria alimentare .....	1
1.2	Industria molitoria .....	3
1.2.1	I Sottoprodotti dell'industria molitoria.....	7
2	La panificazione .....	8
2.1	Materie prime .....	11
2.2	Fermentazione .....	13
2.2.1	Lievito di birra.....	14
2.3.2	Batteri lattici nella panificazione.....	16
2.2.2	Lievito madre: sourdough .....	17
3	Valorizzazione dei sottoprodotti di frumento; altri impieghi .....	18
3.1	Componenti bioattivi e benefici derivati dalla fermentazione dei cereali .....	20
4	Obiettivi.....	23
5	Materiali e metodi.....	26
5.1	Prima prova: preparazione pre-fermento per l'isolamento di lieviti e batteri lattici autoctoni .	26
5.1.1	Isolamento ed identificazione di lieviti e batteri lattici.....	27
5.2	Seconda prova: prove di fermentazione dei singoli sottoprodotti utilizzando uno starter microbico predefinito.....	31
5.2.1	Ripresa dei ceppi dalla collezione interna.....	31
5.2.2	Preparazione dei prefermenti e inoculo.....	31
5.3	Terza prova: formulazione di pre-fermenti ottenuti da miscele di sottoprodotti e utilizzando un consorzio microbico predefinito .....	33

5.4	Analisi microbiologiche .....	35
5.4.1	Terreno YPD .....	35
5.4.2	Terreno mMRS.....	36
5.5	Analisi Chimiche.....	36
5.5.1	Determinazione del pH.....	36
6	Risultati.....	38
6.1	Prima Prova .....	38
6.1.1	pH e carico cellulare di lieviti e batteri lattici .....	38
6.1.2	identificazione per sequenziamento molecolare .....	41
6.2	Seconda prova .....	45
6.2.1	Cinetiche di acidificazione .....	46
6.2.2	Cinetiche di crescita di lieviti e LAB .....	48
6.3	Terza Prova .....	50
6.3.1	Cinetiche di acidificazione .....	51
6.3.2	Cinetiche di crescita di lieviti e batteri lattici .....	52
7	Conclusioni.....	54
	Bibliografia.....	56

## 1 Introduzione

Secondo la FAO, Sono 805 milioni le persone sottonutrite al mondo tra il 2012 e il 2014 mentre si prevede che la crescita numerica della popolazione mondiale nel 2050 richiederà un aumento di produzione alimentare che riesca a soddisfare i bisogni di 9 miliardi di persone richiedendo un aumento del 60-70% della produzione alimentare. In ottica di queste previsioni, il corretto utilizzo delle risorse e la valorizzazione dei sottoprodotti rappresenta una strategia necessaria.

### 1.1 I sottoprodotti dell'industria alimentare

Secondo la Waste Framework Directive 2008/98/EC “by-product” ovvero “sottoprodotto” può non essere considerato come rifiuto se possiede determinate caratteristiche come descritto di seguito:

- È certo un suo ulteriore utilizzo
- Può essere utilizzato direttamente senza ulteriore trattamento
- È prodotto come parte integrante di un processo di produzione
- Il prodotto soddisfa tutti i requisiti riguardanti la protezione della salute e dell'ambiente.

Nell'industria alimentare, soprattutto nell'industria della lavorazione di frutta e verdura, viene prodotta una considerevole quantità di sottoprodotti che sono poco sfruttati a livello commerciale ed economico (Corso valorizzazione dei sottoprodotti nell'industria alimentare 2019).

Nel 2014 solamente in Europa sono stati prodotti 100 milioni di tonnellate di ortaggi e 73 milioni di tonnellate di frutta corrispondenti a 8,6% e 8,9% della produzione mondiale dove inevitabilmente sono state prodotte milioni di tonnellate di sottoprodotti (Trigo et al. 2020). Nella figura 1 sono indicate le percentuali di scarti lungo tutta la supply chain e nella tabella 1 la percentuale di scarto approssimativo dei prodotti alimentari.

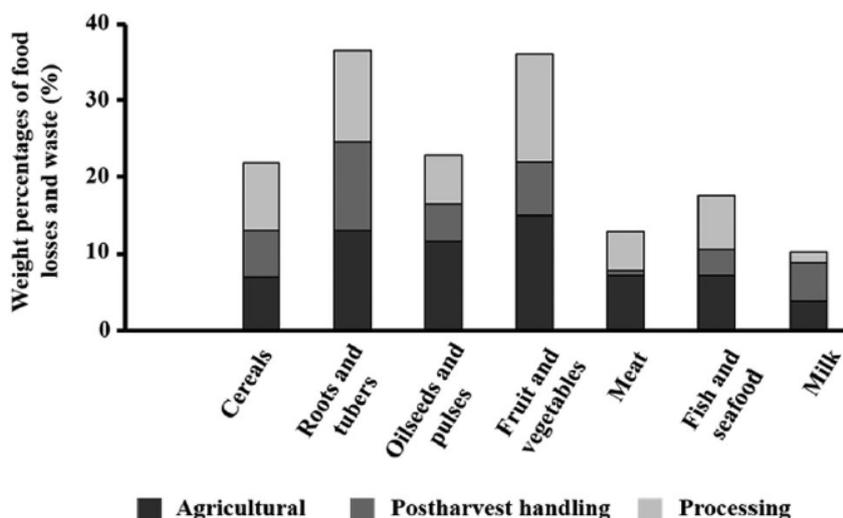


Figura 1: Percentuale di scarti e rifiuti alimentari prodotti lungo la supply chain di differenti settori alimentari. (FAO 2011)

Fruit/vegetable	By-product	Approximate waste (%)	Reference
Apple	Peel, pomace, seed	25	Aljila et al. (2012)
Banana	Peel	35	Aljila et al. (2012)
Citrus	Peel, rag, seed	50	Aljila et al. (2012)
Grape	Stem, skin, seed	20	Aljila et al. (2012)
Mango	Peel, stones	60	Padayachee et al. (2017)
Pomegranate	Peel, mesocarp	40–45	Duarte et al. (2016)
Potato	Peel	15	Aljila et al. (2012)
Tomato	Skin, core, seed	20	Aljila et al. (2012)

Tabella 1: Percentuale di scarti alimentari industriali di ortaggi e frutta (Trigo et al. 2020).

Nella filiera della produzione dei cereali e in particolare nella produzione di frumento, vengono prodotti una vastità di sottoprodotti che sono stati raggruppati nelle diverse fasi di produzione:

- Nella fattoria dove la maggior parte dello scarto è la paglia;
- Durante il primo processo di molitura;

- Durante il secondo processo, cioè i sottoprodotti dell'industria di panificazione;
- Durante la distribuzione dei prodotti a base di cereali causato soprattutto dalla deperibilità di questi prodotti.

Nella prima fase di lavorazione del frumento, la molitura, vengono prodotti una quantità considerevole di sottoprodotti quali crusca e germe, distaccati dall'endosperma che è ricco di amido. Si considera un dato generale di scarto del 28% del frumento per la produzione della farina bianca (tipo 0, 00) facendo perdere al prodotto gran parte di vitamine, fibre, minerali e grassi. Secondo FAOSTAT 2010, nel 2007 si è stimato che a partire da 434 milioni di tonnellate di grano trasformato in farina il processo abbia prodotto 121 milioni di tonnellate di crusca (Chandrasekaran et al. 2013).

## 1.2 Industria molitoria

I cereali più utilizzati nell'industria molitoria sono il frumento, la segale, l'orzo, l'avena, il miglio, il granturco e il riso.

Il frumento è il cereale più utilizzato per la produzione di sfarinati. Appartiene al genere *Triticum* e le 2 specie che assumono un ruolo importante nell'attività commerciale sono il *Triticum aestivum* o grano tenero e il *Triticum durum* o grano duro.

La struttura di interesse della pianta è la cariosside. Nel frumento tenero la sua frattura si presenta bianca e sfarinabile e produce farina dalla quale si ricavano principalmente i prodotti derivati dal processo della panificazione. Per il grano duro la cariosside si presenta alla frattura con un colore ambrato e spigoli netti; fornisce le semole che sono utilizzate nell'industria della pastificazione (Carrai, 2010),

In entrambe le specie la cariosside si distingue in:

- **Endosperma o mandorla amilifera:** è costituito da due parti: lo strato aleuronico e l'endosperma amilifero. Lo strato aleuronico che viene perso con la crusca, è lo strato più esterno monostratificato, ricco di proteine, grassi, sostanze minerali, vitamine ed enzimi. L'endosperma amilifero rappresenta l'80-85% del peso dell'intera cariosside ed è costituito da cellule poliedriche allungate che contengono i granuli di amido.
- **Tegumenti esterni:** sono il 7-8 % del chicco e costituiscono la crusca. Sono costituiti da tre strati: il pericarpo, lo spermoderma e il perisperma. Il pericarpo è l'involucro esterno ed è formato dall'epicarpo e da tre strati di cellule (intermedie, incrociate e tubolari). Lo spermoderma è l'involucro che serve a proteggere il seme vero e proprio. Il perisperma o strato ialino separa l'ultimo strato dello spermoderma da quello delle cellule aleuroniche. Essi vanno a formare la crusca che normalmente viene allontanata durante la macinazione. Da un punto di vista morfologico, hanno la funzione di proteggere l'embrione e le sostanze nutritive ad esso necessarie durante il primo periodo di germinazione.

- **Germe o embrione:** costituisce l'apparato germinativo del chicco e contiene lipidi, vitamine del gruppo B e, minerali e proteine (Surget et al., 2005 e Carrai, 2010)

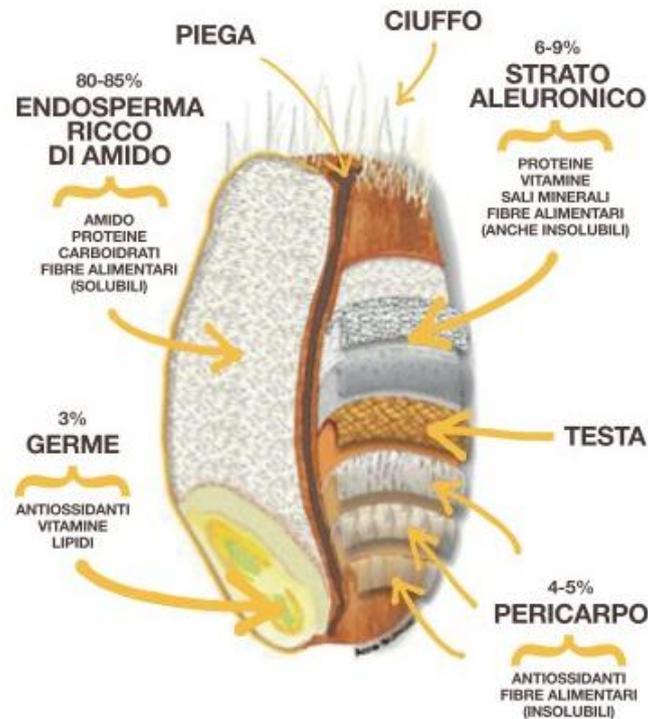


Figura 2: struttura della cariosside del frumento (Surget et. al.,2005)

Le fasi della molitura devono essere precedute da una fase di pulitura e di condizionamento dei cereali. Nella prima fase lo scopo è quello di eliminare i materiali estranei come pietre, sassi e paglia. Invece, il condizionamento consiste nel ridurre, attraverso l'umidificazione, la friabilità che è presente nei tegumenti allo stato secco. Inoltre, rende più friabile l'endosperma e ne facilita la separazione dai tegumenti. L'umidità iniziale nel frumento tenero è del 10-12% mentre l'umidità finale dopo il condizionamento è del 15-16% aumentando in questa fase la possibilità di fenomeni di germinazione e crescita microbica.

La macinazione successiva viene effettuata in molini a cilindri metallici o laminatoi che ruotano in senso opposto, provocando la frantumazione della cariosside.

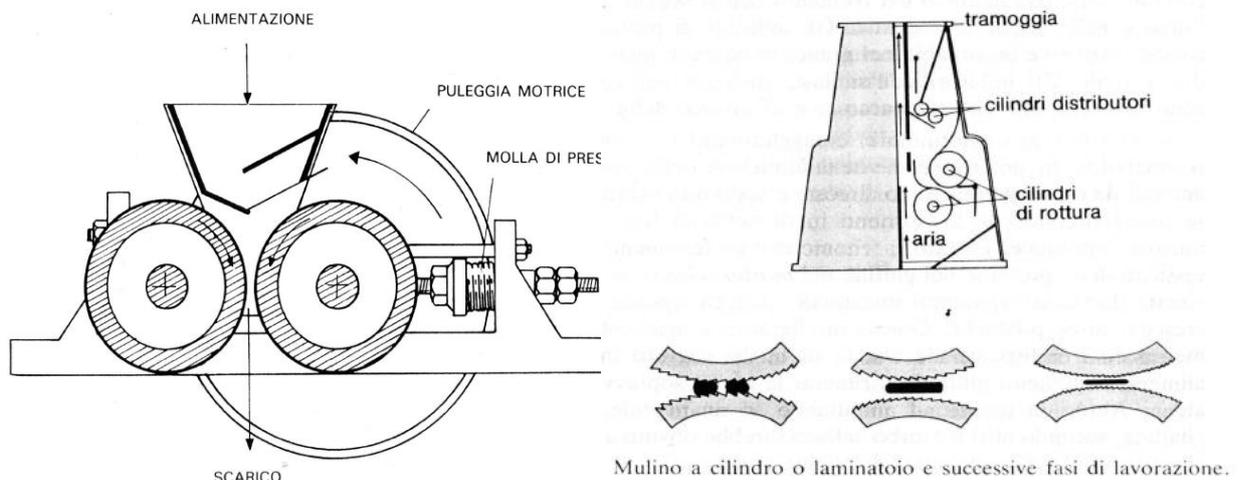


Figura 3: sezione trasversale dei molini o laminatoi a cilindri (corso " tecnologie dei cereali e derivati", Prof. Pinnavaia 2018)

- **La prima fase** è la rottura del chicco, l'obiettivo è l'apertura del chicco attraverso forze di compressione e di stiramento. I cilindri di rottura sono dotati di rigature profonde e distanziate che hanno come obiettivo di staccare la parte corticale dalla parte farinosa creando larghe scaglie.
- **La seconda fase** è la classificazione dei prodotti della prima fase che avviene attraverso il plansichter, che separa le varie parti: la rottura, il materiale intermedio e la farina. Questo avviene grazie a dei setacci sovrapposti aventi le luci delle maglie di grandezza decrescente dall'alto verso il basso con varie uscite di prodotto e dotati di movimento oscillatorio.
- **Il terzo passaggio** è lo svestimento attraverso dei rulli rigati, ma questa volta le rigature sono più ravvicinate e tendono a svestire i frammenti di amido dalle parti corticali ancora attaccate.

- **L'ultimo passaggio** è la rimacina, qui si ha la riduzione delle dimensioni dei frammenti fino alla granulometria desiderata. Questa volta i cilindri sono lisci e riducono i frammenti in farina.

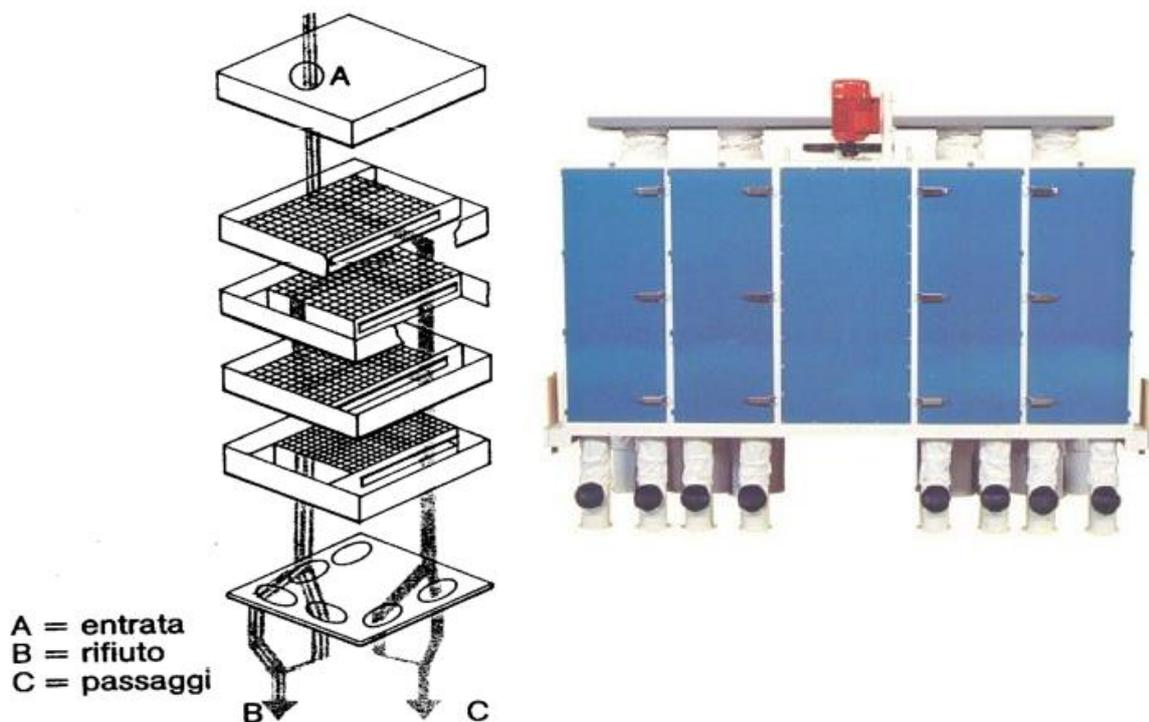


Figura 4: esploso della struttura del plansicther e fotografia della parte esterna (corso Pinnavaia 2018)

### 1.2.1 I Sottoprodotti dell'industria molitoria

I prodotti e i sottoprodotti della macinazione del frumento, sottoposto alle varie fasi di macinazione e conseguente abburattamento, si possono dunque suddividere in:

#### PRODOTTI

- **Farina:** 75%

#### SOTTOPRODOTTI

- **Farinaccio:** 2,5-3% dimensioni di circa 200  $\mu\text{m}$
- **Crusca:** 20-22% insieme a cruschello e tritello. Ha una dimensione di circa 900-600  $\mu\text{m}$

- **Cruschello:** dimensione di 340  $\mu\text{m}$
- **Tritello:** simile al cruschello, ma con parti più triturate e con più parti farinose attaccate
- **Farinette:** 0,2-2%.

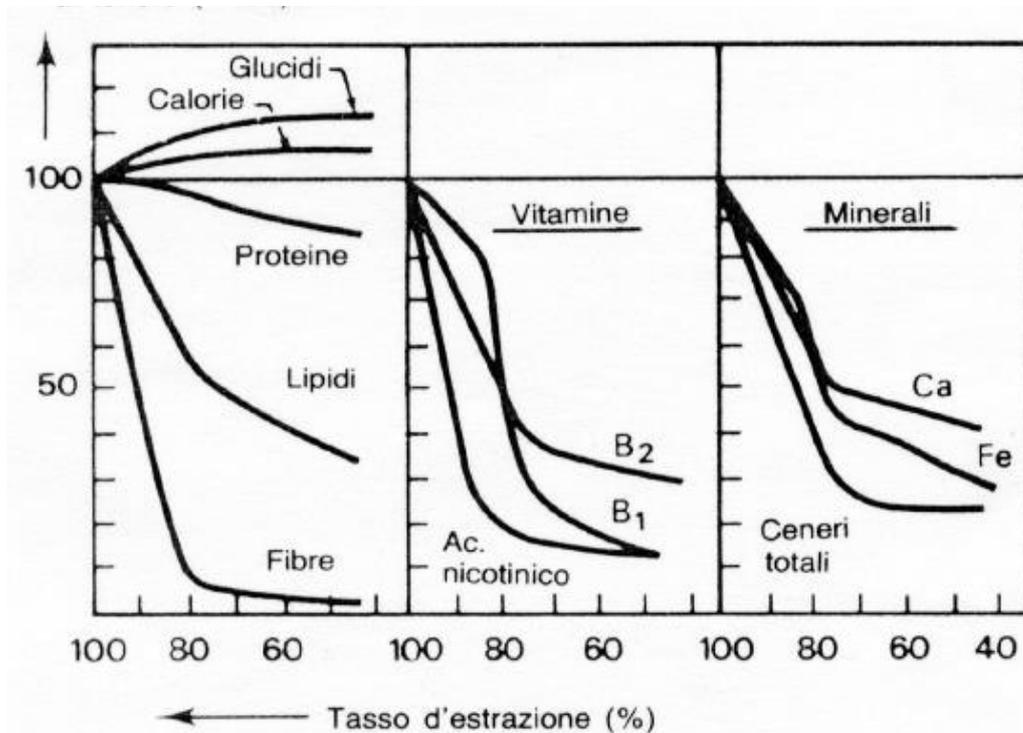


Figura 5: tenore in diversi costituenti rapportato al tenore (=100) nel seme intero (corso Pinnavaia 2018)

Aumentando il tasso di estrazione e quindi diminuendo lo scarto nella farina ottenuta, saranno sempre più presenti tutte le componenti alimentari e nutrizionali della cariosside. Diminuendo il tasso si ottengono farine sempre più raffinate e prive delle parti esterne della cariosside; questo va a diminuire le componenti nutrizionali presenti in origine (figura 5)

## 2 La panificazione

Il pane e i lievitati sono gli alimenti più consumati e sono alla base dell'alimentazione umana. Il processo e l'arte della panificazione sono sempre esistiti da quando esiste la storia tramandata per scrittura e si crede anche prima. Infatti, da alcuni scavi condotti in diverse parti del mondo sono state rinvenute delle immagini rappresentative di tale processo. In particolare, alcune

attività delle fasi di cottura sono state rilevate in dipinti tombali dell'antico Egitto e altri dipinti ancora più dettagliati risalgono al regno di Seti I nel 1303-1290 a.C.

Lo scopo finale della panificazione è rimasto sempre lo stesso fino ad oggi, ovvero, presentare un prodotto al consumatore, derivato dalle farine di cereali avente un aspetto e una forma attraente, appetibile e che sia digeribile (Clarke et. al., 2005). Per molti secoli, i panificati, hanno intrecciato la loro storia con quella della civiltà umana integrando la loro proprietà nutrizionale con aspetti religiosi, politici ed economici. Infatti, dopo la loro scoperta e il loro utilizzo, gli Egizi utilizzavano il pane come compenso ai contadini ed anche ai funzionari pubblici. È noto che il pane veniva utilizzato anche nelle cerimonie di offerta ai defunti (Gobbetti et al. 2012). I primi pani erano, molto probabilmente, dei pani che non avevano ancora subito il processo dello sviluppo della mollica, e quindi la lievitazione; questi sono i pani azzimi e fiat (Clarke et. al., 2005). Successivamente, gli Egizi svilupparono più di cinquanta tipi di focacce e pani dolci (Gobbetti et al. 2012). L'innovazione tecnica che produsse dei pani con appetibilità superiore fu la lievitazione. Inizialmente la tecnica di lievitazione di base e quindi la più antica, fu affidata alla flora microbica autoctona presente che, attraverso l'aggiunta di acqua alla farina, andava a fermentare e diveniva un lievito dal gusto acido che donava un aroma caratteristico. Questo causava anche un aumento nel volume grazie alla formazione di gas (Clarke et. al., 2005).

Per quanto riguarda l'Italia, ha un'ampia varietà di prodotti da forno tipici. Per citarne qualcuno: Catone il Censore nel 160 a.C. riportava il *libum* (pane votivo), il *placenta* (focaccia di farine miste con miele) e l'*erneum* che era una specie di pandoro.

La colomba tipica prodotta ai nostri tempi a partire dal 1930 dall'azienda Motta ha origine all'epoca del Re longobardo Alboino ricevuta come segno di pace durante l'assedio a Pavia nel 572 d.C.

Il pane come simbolo di rivolta per quanto riguarda il pane Toscano e il Pane di Terni che veniva prodotto senza sale nel primo in segno di protesta per la tassazione imposta dalle autorità pisane durante i conflitti con la città di Firenze; i secondi venivano prodotti dai fornai umbri in risposta all'aumento del prezzo del sale imposto da Paolo III nel 1531.

Ma il pane non era considerato il cibo dei soli poveri ma veniva presentato in diverse forme e presentazioni nelle corti dei signori. Ne è un esempio la “coppia Ferrarese”; un pane tradizionale con forma particolare a quattro braccia. È un esempio di ricchezza anche il Panettone per la qualità degli ingredienti e il Pandoro servito ai nobili veneziani ricoperto di fogli di oro zecchino (Gobbetti et al. 2012)

Nel XVIII secolo si notò che per facilitare la produzione continua, si poteva tenere da parte una porzione di impasto maturo per inoculare gli impasti successivi. Con l'avanzare del tempo, oltre all'utilizzo della lievitazione naturale, viene utilizzato il lievito di birra in addizione; questo per migliorare e velocizzare il processo di fermentazione. La tecnica andò avanti fino al XIX secolo, momento nel quale il lievito di birra fu reso disponibile e a disposizione di tutti. Questo portò alla perdita dell'uso della pasta madre che non fu del tutto abbandonata nella preparazione del pane di segale. Infatti, per avere una cottura corretta in questo pane, si deve avere una riduzione del pH dell'impasto (Clarke et. al., 2005).

Ad oggi sono diffuse 200 tipologie di pane che sono il frutto della tradizione millenaria che si uniscono alla pratica artigianale insieme alla moderna tecnologia; molti sono prodotti tipici DOP, IGP, pani arricchiti, precotti e surgelati, gluten-free, biologici e moltissimi prodotti lievitati dolci (Gobbetti et al. 2010).

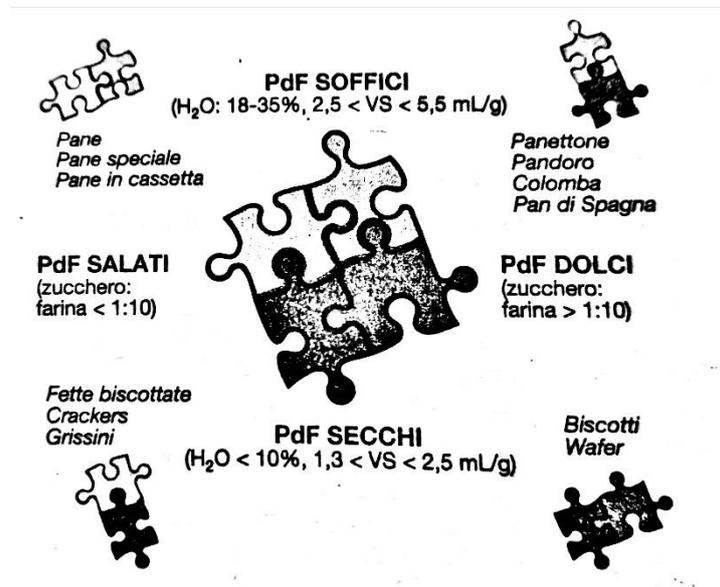


Figura 6: classificazione dei Prodotti da forno (Gobbetti et al. 2010)

## 2.1 Materie prime

### Farina

Dalle varie tipologie di farina utilizzate (frumento, orzo, riso, mais, avena, farro, segale, amaranto e grano saraceno) ne derivano prodotti diversi; alcune possono essere utilizzate per prodotti gluten-free. Tra le molteplici tipologie, la farina di grano tenero e grano duro sono le più utilizzate grazie alle loro proprietà che le rendono adatte alla panificazione. In particolare, troviamo il glutine che è un reticolo proteico viscoelastico tridimensionale. Questo è derivato dalla qualità e quantità delle proteine e in particolare il rapporto tra gliadine e glutenine che in presenza di acqua e forza di impastamento si aggregano. Inoltre, è presente l'amido che è la maggiore frazione della cariosside. Fibra e lipidi dipendono dalla tipologia di farina utilizzata.

## **Acqua**

È un elemento fondamentale sia per la formazione del glutine e l'idratazione dei granuli di amido che durante la fase della cottura si gelatinizzano e si rigonfiano. Inoltre, favorisce l'attività degli enzimi naturalmente presenti nella matrice alimentare e promuove l'attività del fenomeno della lievitazione. La quantità di acqua inserita caratterizza il prodotto finale e conseguentemente anche la sua shelf-life. L'acqua deve essere di una durezza media per dare la giusta consistenza all'impasto. La durezza alla quale si ottiene un buon impasto la si raggiunge alla concentrazione che va da 100 a 200 mg/L di CaCO<sub>3</sub>.

## **Sale**

È presente nella maggior parte dei prodotti da forno. I ruoli ricoperti da questo ingrediente sono essenzialmente 3:

- **Organolettico:** conferisce un effetto positivo sull'aroma del prodotto
- **Controllo dell'attività microbica** durante la fermentazione
- **Interagisce con le proteine** rafforzando l'impasto e garantendo un aumento di volume che va dal 1,5 al 2 %

## **Agenti lievitanti**

La lievitazione può avvenire in maniera chimica o biologica. La prima non è permessa dalla legge cogente per la lievitazione del pane ed è consentita solamente per i dolci. La lievitazione biologica viene effettuata grazie l'uso di lievito di birra (*Saccharomyces cerevisiae*) e/o con lievito naturale (pasta madre) (Gobbetti et al. 2012).

## 2.2 Fermentazione

Nella panificazione la fermentazione è il processo biologico naturale portato avanti dai due agenti biologici (lievito di birra o lievito naturale) che possono essere utilizzati separatamente o contemporaneamente. Infatti, secondo la legge 4/7/67 n. 580: il prodotto pane è regolamentato come:

“il prodotto ottenuto dalla cottura di una pasta convenientemente lievitata, preparata con sfarinati di grano, acqua e lievito, con o senza aggiunta di sale comune”.

Lo scopo primario è l'aumento del volume della massa per consentirne la lavorazione e garantire durante la cottura, un prodotto con lo sviluppo corretto della mollica e crosta. Inoltre, alla fermentazione vengono attribuiti altri effetti riconosciuti quali:

- **Il miglioramento della conservazione:** grazie all'acidificazione derivante dalla produzione di acidi organici e/o la produzione dell'etanolo che evita lo sviluppo di muffe superficiali.

Lo sviluppo di precursori di aromi utili nella cottura come: zuccheri semplici e peptidi, altri composti di aroma derivanti dal metabolismo degli starter utilizzati;

- **Si ottiene una migliore qualità organolettica** attraverso il rilascio nella matrice di metaboliti primari e secondari. In particolare, da parte dei batteri lattici. Inoltre, la fermentazione porta alla formazione di precursori di sostanze aromatiche che si sviluppano durante la cottura e la reazione di Maillard:

- **Miglioramento del valore nutrizionale** con l'attivazione delle fitasi endogene rese operative dalla diminuzione del pH dell'ambiente;

- **Produzione di peptidi bioattivi**

- **Riduzione del contenuto delle micotossine**

### 2.2.1 Lievito di birra

Il *Saccaromyces cerevisiae*, detto anche lievito di birra, è il lievito principalmente utilizzato nella panificazione. Il suo uso e nome comune deriva dal fatto che gli antichi egizi lo immettevano nella fase di impastamento inconsapevolmente, aggiungendo i residui della lavorazione della birra. Questo garantisce di ottenere un prodotto soffice e dalle caratteristiche organolettiche gradite. Al giorno d'oggi il lievito utilizzato deriva da specifici biotipi di *Saccaromyces cerevisiae* che sono stati selezionati e sono adatti alla panificazione. Infatti, devono avere particolari altre caratteristiche oltre alla capacità di produrre gas (CO<sub>2</sub>) per garantire la lievitazione (Gobbetti et al 2010). Il lievito può essere aggiunto fino al 5% e il rigonfiamento che produce nell'impasto, è dovuto grazie alla tessitura colloidale del glutine che trattiene la CO<sub>2</sub> (Galli et al. 2005). Devono essere rapidamente adattabili alle condizioni dell'ambiente di inoculo e devono poter fermentare rapidamente il maltosio e quindi essere altresì rapidi a produrre gli enzimi e i coenzimi necessari al metabolismo. Per fare ciò, sono ottenuti da una coltura pura in laboratorio e successivamente coltivati in fermentatori disposti a batteria nei quali si utilizzano, come nutrimento, dei derivati della barbabietola e la canna da zucchero, sterilizzati, addizionati di altri nutrienti e aventi valori di pH controllati di 4,5-5. La tecnica utilizzata per la coltivazione è lo scaling-up, tecnica che permette di seminare il nuovo terreno di coltura con una parte della coltura matura precedente. Questo porta a dei vantaggi e a degli svantaggi:

- **I vantaggi** sono che la biomassa prodotta al termine di un ciclo di riproduzione può arrivare fino a 100 tonnellate. Successivamente, la biomassa viene separata dal terreno esausto attraverso una centrifugazione e trattata con delle lavorazioni successive secondo la tipologia di prodotto desiderato.

- **Gli svantaggi** derivano dal fatto che se una coltura viene contaminata da alcuni batteri lattici, questi possono arrivare a fermentare il prodotto per il quale il lievito era stato preparato, portando a dei risultati a volte non voluti e non graditi.

Le tipologie di lievito di birra possono essere quindi differenti: **la crema di lievito, il lievito secco attivo, il lievito istantaneo e il lievito compresso** (Gobbetti et al. 2010).

Per quanto riguarda le specie di lieviti maggiormente isolate nelle farine, i lieviti sono presenti nell'ordine di  $10^3$ - $10^4$  UFC/g e sono maggiormente riportati:

- *Cryptococcus albidus*
- *Rhodotorula glutinis*
- *Pichia membranaefaciens*
- *Pichia anomala*
- *Pichia burtonii*
- *Thricosporon cutaneum*
- *Candida zeylanoides*

Durante la maturazione della pasta madre utilizzata in panificazione, ci sono alcune specie che prendono il sopravvento diventando dominanti e persistenti come:

- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Kazachstania exigua*
- *Issactechenckia orientalis*
- *Pichia saitoi*

In particolare, la situazione di dominanza risulta più complessa (Gobbetti et al. 2010). In particolari lieviti naturali Sanfrancisco domina la *Kazachstania exigua* e *S. cerevisiae* è presente in quantità minore. Nei lieviti finlandesi i dominanti sono molteplici: *S. cerevisiae*,

*Kazachstania exigua*, *Candida stellata*, *Endomycopsis fibuligera* (Corso microbiologia delle fermentazioni, 2020). Nei lieviti naturali isolati in Sud Africa dominano: *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces* spp. e *Torulaspota* spp. (Gobbetti et al. 2010).

### 2.3.2 Batteri lattici nella panificazione

I batteri lattici sono dei bacilli o cocci che possono raggrupparsi in catene da due o più. Sono una categoria eterogenea e ampia. Non hanno la capacità di muoversi, sono asporigeni, catalasi negativi anaerobi ossigeno-tolleranti. Per coltivarli in laboratorio sono molto esigenti sotto il profilo nutrizionale ed originano colonie molto piccole ed incolori. In generale, i terreni di coltura per coltivarli sono molto complessi e molto variabili. Possono essere a base di latte, siero di latte, verdure, estratti secchi di carne malto ed estratti di lievito (Galli, 2005).

Le attività pro-tecnologiche principali dei batteri lattici sono attività acidificante, proteolitica, peptidolitica, antagonistica nei confronti dei patogeni, aromatizzante e altre attività secondarie come quella lipolitica, sintesi di polisaccaridi e antiossidante.

Fra i batteri lattici si trovano sia specie termofile che mesofile con ottimi di temperatura compresi tra 25°C e 45°C.

Nel lievito naturale i batteri lattici più frequentemente isolati appartengono al genere *Lactobacillus*. A seconda del loro diverso metabolismo dei carboidrati vengono classificati in tre categorie metaboliche: omofermentanti obbligati che producono solamente acido lattico a partire da esosi; eterofermentanti facoltativi che possono utilizzare sia pentosi che esosi e producono acido lattico, l'acido acetico, l'alcool etilico e CO<sub>2</sub>; gli eterofermentanti obbligati che producono acido lattico, CO<sub>2</sub>, acido acetico e alcool etilico e questi ultimi sono i più frequenti. La conseguenza del rilascio dei prodotti finali del loro metabolismo causa un'acidificazione degli impasti. Inoltre, il rilascio di particolari peptidi consente una maggiore produzione di composti aromatici durante la fase di cottura.

Il più rappresentativo tra i lieviti rimane il *Lactobacillus sanfranciscensis* che è presente quasi sempre nei lieviti naturali a parte alcuni rari casi (Gobbetti et al 2010).

### 2.2.2 Lievito madre: sourdough

È definito come agente lievitante e denominato con più sinonimi come “impasto acido, lievito naturale o lievito madre”. La sua definizione comune è “un impasto costituito di farina, in genere di grano o segale, acqua con o senza aggiunta di sale, fermentato senza l’intervento di microrganismi deliberatamente aggiunti e ottenuto tramite una serie successiva di rinfreschi che hanno scopo di ottimizzare la capacità acidificante e lievitante. La fermentazione avviene ad opera di batteri lattici endogeni della farina, ai quali si possono aggiungere quelli di derivazione ambientale.” (Gobbetti et al., 2010).

La prima fase quindi prevede l’aggiunta della sola acqua alla farina che fermenta spontaneamente. Successivamente a questo primo fermento, chiamato anche pre-fermento, può essere utilizzato come inoculo in altra acqua e farina per creare un nuovo lievito e così via.

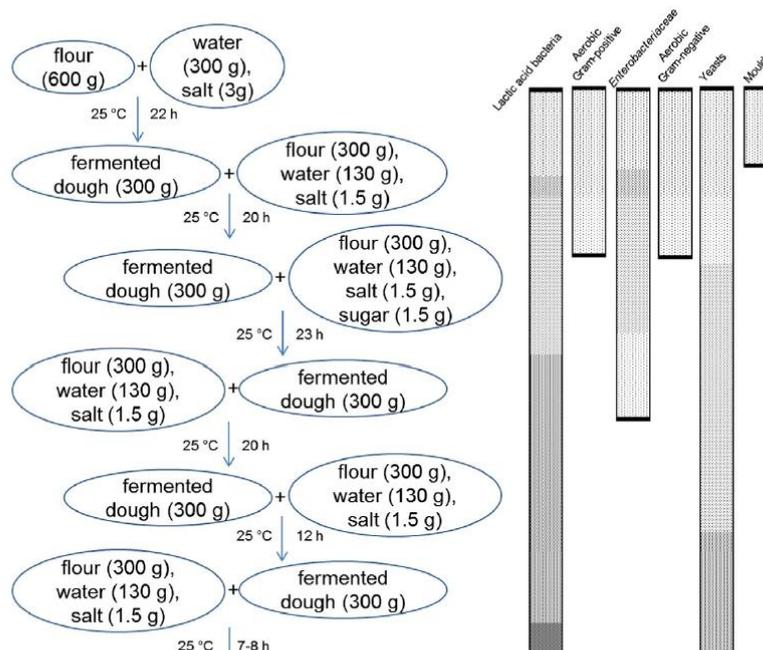


Figura 7: diagramma di flusso del protocollo di fermentazione riguardante la creazione di sourdough mature in “french style” e la tipica dinamica dei differenti gruppi microbici che intervengono (Minervini et al.2014).

Possono essere utilizzati ingredienti addizionali quali succo d'uva, miele, malto, zucchero e aceto. Questo serve per incrementare la velocità di fermentazione (Minervini et al. 2014).

Nelle fasi iniziali si osserva la presenza di Gram-negativi come *Pseudomonas* spp, *Enterobacteriaceae* e Gram-positivi: *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp. e batteri lattici. La formazione iniziale viene poi rimodulata attraverso vari rinfreschi che stabilisce la formazione del microbiota rappresentato da *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Queste specie portano ad una rapida acidificazione del substrato (pH fino a 4,5) sin dalle prime fasi di fermentazione garantendo l'inibizione dei batteri acido sensibili tra i quali troviamo i patogeni (Gobbetti et al. 2010).

I parametri ecologici che vanno ad influenzare l'ecosistema del lievito madre sono da tenere in considerazione per un corretto sviluppo. Normalmente si parlerebbe di parametri endogeni (es. pH) ed esogeni (es. temperatura). Ma questi non sono i soli parametri da tenere in considerazione perché, da soli, non riescono ad adattarsi bene al lievito naturale. Questo perché ci sono interazioni molto complesse (es. operazioni manuali...) che creano un particolare ecosistema. In questo caso particolare è più indicato parlare di parametri tecnologici specifici (percentuale di lievito naturale, pH, temperatura, DY, potenziale ossidoriduttivo...) e parametri non pienamente sotto controllo come la tipologia della farina chiamata "house" del microbiota. Tutti questi parametri giocano un ruolo fondamentale per la struttura del microbiota (Minervini et al., 2014).

### 3 Valorizzazione dei sottoprodotti di frumento; altri impieghi

I sottoprodotti derivati dalla molitura del frumento sono in primo impiegati nei mangimi animali, ma un'alternativa è l'estrazione della fibra alimentare e proteine dalla crusca o dal germe per includerle nell'approvvigionamento alimentare dell'uomo. Il primo prodotto di scarto formato nelle fattorie, la paglia, viene principalmente utilizzato come lettiera per gli

animali. Questo sottoprodotto, piuttosto che essere incenerito, può essere utilizzato come materiale per l'edilizia, nell'industria della carta e per la produzione di carburanti come il biocarburante o il biogas. Inoltre, viene utilizzato come materiale grezzo nell'industria chimica per la produzione di furfurale. Se il produttore non riesce a trovare alternative di utilizzo, la paglia viene interrata in campo per aumentare la sostanza organica nel terreno per migliorarne le caratteristiche e per apportare sostanze nutritive per le colture successive (Chandrasekaran et al. 2013)

Il germe del frumento contiene  $\alpha$ -tocoferolo, vitamine, minerali, fitochimici e proteine di alto valore, trigliceridi e lipasi e attività di lipossigenasi. La presenza di questi elementi purtroppo favoriscono l'ossidazione dei grassi e quindi la formazione di off-flavour nella fase di stoccaggio e nella preparazione di panificati. Questo però non avviene se viene utilizzata la lievitazione con lievito madre, perché quest'ultima è capace di disattivare l'attività delle lipasi consentendo l'uso del germe nei lievitati. Per quanto riguarda lo stoccaggio, il germe non produce composti volatili sgradevoli durante la conservazione delle madri derivate da ceppi autoctoni di *L. plantarum* e *L. rossiae* per almeno 40 giorni. Ad incrementarne il valore funzionale, i batteri lattici selezionati riescono a rilasciare nella matrice il **2-metossi benzochinone** e il **2,6-dimetossibenzochinone** a partire dai chinoni glicosilati grazie all'attività enzimatica della  $\beta$ -glucosidasi. Questi hanno un effetto antiproliferativo delle cellule tumorali, anti-metastatico ed effetto immunologico. L'effetto anti-carcinogenesi è stato dimostrato paragonandolo ad un farmaco antitumorale noto, che consiste in una preparazione farmaceutica molto conosciuta preparata a base di germe fermentato da una pasta madre (Gobbetti et al., 2019)

Negli ultimi anni la ricerca scientifica ha focalizzato il suo interesse verso i sottoprodotti e soprattutto sulla possibilità del loro riutilizzo come ingredienti o starter alimentari per la

formulazione di prodotti alimentari innovativi (Chandrasekaran et al. 2013). Per quanto concerne i by-products derivati dall'industria molitoria, recentemente è stato notato che tali sottoprodotti sono una fonte considerevole di fibra alimentare e composti bioattivi che hanno proprietà antiossidante e antimicrobica. Tra quest'ultimi troviamo carotenoidi, composti fenolici, oli essenziali e  $\beta$ -glucani (Trigo et al., 2020). Inoltre, alcuni di essi possono essere utilizzati come coloranti alimentari naturali o possedere composti volatili che possono essere utilizzati nella produzione di bevande (Fritsch et al. 2017).

### 3.1 Componenti bioattivi e benefici derivati dalla fermentazione dei cereali

Per quanto riguarda i benefici per la salute derivati dal consumo di cereali integrali, ci sono evidenze scientifiche riguardanti l'efficacia sulla prevenzione di malattie cardiovascolari, diabete, obesità ed altre patologie correlate alle problematiche del metabolismo o alla prevenzione del cancro al colon (Gobbetti et al. 2018). Tra i composti che apportano particolari benefici dal punto di vista tecnologico e fisiologico troviamo i componenti delle fibre alimentari:

- **Arabinosilani:** sono presenti nelle pareti cellulari legati tramite un legame crociato con l'acido fenolico. Attraverso idrolisi enzimatica vengono liberati gli oligosaccaridi-arabinosilani che sono considerati probiotici: modulano il microbiota intestinale e la permeabilità intestinale, funzione utile nei pazienti obesi. Inoltre, regolano anche il metabolismo postprandiale e i livelli di colesterolo.
- **$\beta$ -glucani:** se presenti in piccole quantità sono capaci di limitare il rischio delle malattie alle coronarie, stimolare il sistema immunitario, prevenire il cancro e ridurre i disordini relativi al metabolismo. Regolano gli alti livelli di colesterolo nel sangue, il diabete mellito e l'obesità. Inoltre, i  $\beta$ -glucani hanno attività prebiotica come promotori di crescita di batteri probiotici come *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.

- **Fruttani:** si trovano principalmente nello strato aleuronico del frumento e sono degradati nel colon dai microorganismi della flora batterica producendo delle corte catene di acidi grassi avendo così una funzione prebiotica. Inoltre, i fruttani favoriscono l'assorbimento dei sali minerali, riducono l'appetito e stimolano il sistema immunitario.
- **Amido resistente:** è la parte dell'amido definito come la somma dell'amido e i prodotti dell'amido degradato che resiste alla digestione nella prima parte dell'intestino. Ci sono evidenze scientifiche sulla sua funzione prebiotica, infatti, favorisce anche il benessere dell'intestino dagli stadi infiammatori e il cancro colon-rettale (Saa et al., 2017).

Ad oggi sono sempre più richiesti, da parte dei consumatori, prodotti alimentari contenenti ingredienti che abbiano la capacità di incrementare lo stato di salute e prevenire malattie croniche oltre che essere prodotti sicuri e idonei al consumo. Avere la possibilità di incorporare le proprietà sopracitate in ingredienti che aumentano il valore nutrizionale e donino proprietà utili agli alimenti per incrementarne la qualità o creare prodotti alimentari funzionali, è una possibilità che la comunità scientifica moderna sta considerando (Gobbetti et al. 2019).

Generalmente per aumentare la biodisponibilità dei composti bioattivi presenti nei cereali, i sottoprodotti devono subire una fase di pretrattamento (pre-fermentazione e processi di panificazione entrambi con lieviti selezionati). I composti bioattivi devono essere però presenti nella matrice di partenza condizione dipendente dal genotipo e dallo stadio di maturazione della coltura cerealicola presa in considerazione (Iancu et al., 2019). Inoltre, proprio attraverso la fermentazione lattica operata da alcuni batteri lattici (LAB, GRAS ovvero Generally Recognised As Safe secondo la Food and Drug Administration), è stato osservato un incremento del valore nutrizionale dei prodotti a base di cereali. I LAB sono anche capaci di diminuire l'impatto negativo di molti fattori anti-nutrizionali presenti nei cereali. Nello specifico, è stato osservato che, nei prodotti da forno ottenuti utilizzando le madri acide, queste

hanno permesso l'aumento dell'attività delle fitasi grazie all'abbassamento del pH e quindi l'incremento di assorbimento dei minerali. Infatti, i cationi sono strettamente legati da dei legami forti con l'acido fitico che vengono liberati attraverso reazioni enzimatiche (Sakandar et al., 2018).

Per quanto riguarda le proteine presenti negli impasti, è stato osservato che con la fase di maturazione avviene una parziale idrolisi dei peptidi del frumento, quali residui di proline e glutammine che sono responsabili dell'innesco della risposta autoimmune nei pazienti celiaci (Iancu et al., 2019). In altri studi si è invece recentemente provato che il glutine viene completamente idrolizzato durante la fermentazione utilizzando madri acide, rendendo i prodotti derivati sicuri per il consumo da parte di individui celiaci.

Correlato al disturbo della celiachia, è stato osservato che i prodotti fermentati da madri acide riescono a controllare e a ridurre i sintomi da intestino irritabile (Gobbetti et al., 2019).

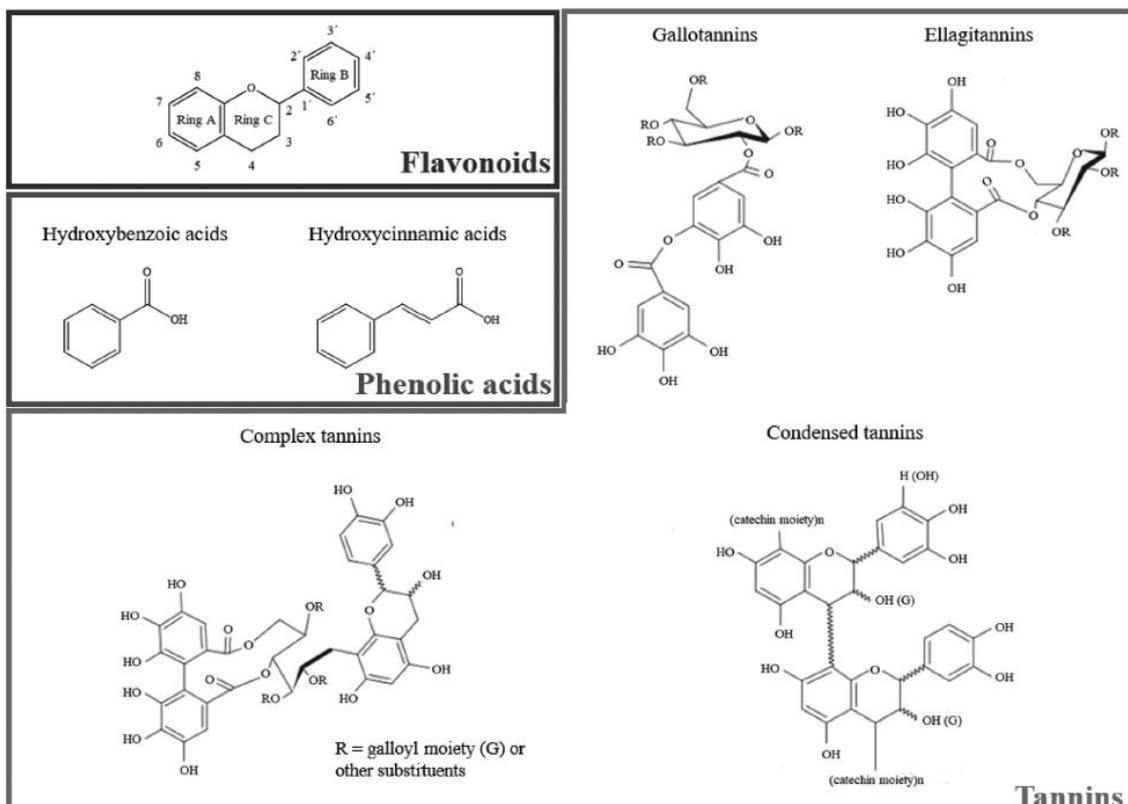


Figura 8: Strutture delle differenti classi di composti fenolici: flavonoidi, acidi fenolici e tannini (Trigo et. al. 2020).

#### 4 Obiettivi

Il grano destinato al consumo umano viene solitamente trasformato in farina. Il tasso di estrazione della farina varia dal 73 al 77%, a seconda del processo di macinazione utilizzato, della varietà di grano e delle condizioni di coltivazione (Elliott et al., 2002). Pertanto, i flussi di sottoprodotti tra cui crusca e altri composti come il germe di grano e parti dell'endosperma ammontano a circa il 23-27% del prodotto di macinazione. La frazione più importante di tutti i sottoprodotti è la crusca, che rappresenta circa il 25% del peso del grano (Neves et al., 2006). Tuttavia, la frazione di crusca comprende anche parti dell'endosperma amidaceo e lo strato aleuronico, poiché non è possibile separare completamente tutti i singoli strati della cariosside di grano (Koutinas et al., 2006). Supponendo che tutto il grano destinato al consumo alimentare venga macinato, il flusso dei sottoprodotti rappresenterebbe circa 150 milioni di tonnellate di crusca all'anno.

Attualmente, la crusca di frumento viene utilizzata principalmente per l'alimentazione del bestiame; solo ridotti volumi di crusca sono attualmente commercializzati a scopi alimentari. Considerando le grandi quantità di biomassa di crusca e il basso valore dei prodotti per l'alimentazione animale a base crusca, l'industria molitoria mira a trovare nuove applicazioni a valore aggiunto per la crusca di frumento. Sono state discusse diverse possibilità per l'uso olistico della crusca di frumento per produrre ingredienti ad elevato valore aggiunto, tra cui un concetto integrato di bioraffineria che combina la macinazione di farina con la produzione di alimenti innovativi, alimenti per animali arricchiti di nutrienti e prodotti chimici a valore aggiunto (Apprich et al., 2013; Koutinas et al., 2006). L'interesse verso l'utilizzo della crusca, e di altri sottoprodotti dell'industria molitoria, nella formulazione di alimenti è dovuto alle loro numerose proprietà salutistiche riconosciute. È dimostrato che i cereali integrali o la stessa crusca modulano lo stato e la sensazione di fame e di sazietà, influenzano lo stato glicemico, lipidico e infiammatorio dei consumatori e hanno attività prebiotica. D'altra parte, l'ossidazione

dei componenti cellulari è spesso coinvolta in meccanismi che causano malattie. Pertanto, la ricerca si concentra su antiossidanti naturali che possono agire come scavenger di radicali liberi. La crusca di frumento fornisce sia fibre alimentari che una grande varietà di sostanze che si ritiene siano biologicamente attive, come antiossidanti, fitoestrogeni o lignani (Pruckler et al., 2014). Tra i settori alimentari in cui la crusca è utilizzata, a predominare è sicuramente la categoria dei prodotti da forno. Tuttavia, l'uso di crusca in panificazione modula la reologia dell'impasto e causa difficoltà nella produzione di prodotti da forno. Nelle farine raffinate, i componenti principali responsabili dell'assorbimento dell'acqua sono le proteine del glutine. Le particelle di crusca di frumento possono interferire con la maglia glutinica, ridurre la resilienza dell'impasto e compromettere la ritenzione di gas. Questi effetti possono portare ad una limitata lievitazione del pane basso e una qualità di cottura inferiore (Anil, 2012; Pruckler et al., 2014). L'aggiunta della crusca di frumento in generale provoca un aumento del tempo di lievitazione e una stabilità dell'impasto più breve. Inoltre, l'elevata presenza di fibre può aumentare la rigidità dell'impasto (Anil, 2012; Schmiele et al., 2012). Recentemente diversi processi compresa l'estrusione, la fermentazione microbica, trattamenti termici e enzimatici, sono stati proposti con successo per modificare componenti della crusca come amido, lipidi, strutture proteiche e fibre. Queste modifiche permettono di ottenere delle migliori performance di panificazione in termini di riduzione del tempo di lievitazione, maggiore produzione e ritenzione di gas e migliori proprietà reologiche (Gomez et al., 2011; Poutanen et al., 2009; Pruckler et al., 2014).

Tra i processi proposti per migliorare la funzionalità della crusca, la fermentazione eseguita da ceppi microbici e consorzi microbici selezionati sta riscontrando sempre più interesse. Infatti, la fermentazione con consorzi microbici può migliorare sia la funzionalità tecnologica che nutrizionale della crusca di frumento. Oltre a migliorare le caratteristiche sensoriali, la fermentazione può ritardare la digeribilità dell'amido portando a una bassa risposta glicemica.

L'azione di alcuni enzimi endogeni migliora la bio-accessibilità di minerali e composti bioattivi o ne forma di nuovi come ad esempio gli oligosaccaridi prebiotici (Poutanen, Flander e Katina, 2009). Inoltre, durante la fermentazione da parte di lieviti e batteri lattici selezionati varie attività di fitasi endogene ed esogene possono essere indotte attraverso la diminuzione del pH, un aumento della temperatura e l'idratazione dell'impasto (Lopez et al., 2001).

In questo contesto l'obiettivo della mia tesi è stato quello di selezionare, in termini di formulazione e consorzi microbici per la loro fermentazione, dei prefermenti a base di sottoprodotti dell'industria molitoria potenzialmente utilizzabili nel settore dei prodotti da forno. Per raggiungere questo obiettivo, da una parte sono stati isolati e identificati lieviti e batteri lattici a partire da impasti preparati con sottoprodotti, a diverso grado di macinatura, sia da grano tenero che da grano duro. Questo per ottenere dei ceppi ben adattati alla matrice e tra i quali selezionare, sulla base delle caratteristiche tecnologiche, consorzi microbici ottimali per l'ottenimento di prefermenti da utilizzare nella formulazione di prodotti da forno. In secondo luogo, sono stati preparati prefermenti a partire da ciascun singolo sottoprodotto dell'industria molitoria, utilizzando un consorzio microbico selezionato e composto da lieviti e batteri lattici come agente fermentante. Dei prefermenti ottenuti è stata valutata la cinetica di acidificazione e di sviluppo di lieviti e batteri lattici, la stabilità del prefermento nel tempo ed infine l'accettabilità organolettica. Tutto ciò ha permesso di definire alcune formulazioni ottimali di sottoprodotti da utilizzare per l'ottenimento di prefermenti utilizzabili in panificazione.

## 5. Materiali e metodi

Di seguito sono descritti i materiali e metodi utilizzati in questa sperimentazione.

### 5.1 Prima prova: preparazione pre-fermento per l'isolamento di lieviti e batteri lattici autoctoni

L'isolamento è stato effettuato a partire da pre-fermenti ottenuti da fermentazioni spontanee senza l'inoculo di starter. I pre-fermenti sono stati formulati come di seguito:

- **30% di farina 0**
- **25% di sottoprodotto dell'industria molitoria**
- **45% di acqua minerale naturale**

Quindi sono stati preparati diversi impasti rimescolando gli ingredienti, fino ad ottenere una consistenza omogenea e ben coesa. Successivamente gli impasti sono stati trasferiti in vasi di vetro (400 ml) precedentemente sterilizzati e ricoperti con pellicola forata e lasciati a temperatura ambiente. Un totale di 4 impasti sono stati ottenuti a partire da sottoprodotti della lavorazione di grano tenero e 3 da grano duro.

Ciascun prefermento è stato rinfrescato ogni 24 h fino a quando non si è osservata una stabilizzazione del pH.

Al tempo iniziale e a cadenza di 24h è proceduto alla rilevazione del pH e al campionamento microbiologico per la determinazione di batteri lattici e lieviti. I campioni, opportunamente diluiti in soluzione fisiologica sterile, sono stati poi seminati su piastre agarizzate di mMRS e Sourdough medium per i batteri lattici, e su YPD e WL nutrient agar per i lieviti. Sia per lieviti che LAB le piastre sono incubate per 24-48 h a 30°C.

### 5.1.1 Isolamento ed identificazione di lieviti e batteri lattici

Dalle colonie presenti sui vari terreni di coltura è stato eseguito il loro isolamento e la successiva purificazione. Questo procedimento ha previsto l'utilizzo di un'ansa sterile, la quale è stata impiegata per prelevare la colonia singola e strisciarla sul terreno di coltura agarizzato più adatto al suo sviluppo. I ceppi sono stati ristricciati almeno due volte al fine di avere la certezza che le colonie fossero pure. Contemporaneamente alla purificazione in piastra si è proceduto anche alla valutazione morfologica attraverso microscopio ottico. Questo è stato effettuato per differenziare le varie morfologie di cocci e bacilli e la loro morfologia di aggregazione evitando di tralasciare specie di microorganismi di interesse.

Per identificare i ceppi isolati di lieviti e batteri lattici sono state impiegate tecniche molecolari. Per prima cosa è stato estratto il DNA genomico di ogni ceppo attraverso il seguente protocollo:

- 1- Risospendere le colonie pure in 1 ml di acqua bidistillata in eppendorf sterili da 1,5 mL e centrifugare a 12.000 giri per 1 minuto;
- 2- Rimuovere il surnatante e aggiungere 0,2 mL di InstaGene Matrix (Bio-Rad), incubare i campioni a 56°C per 25 minuti;
- 3- Vortexare le eppendorf per 10 secondi e porle in un bagno caldo a 100°C per 8 minuti;
- 4- Centrifugare i campioni a 12.000 giri per 3 minuti;
- 5- Raccogliere 0,05 mL del surnatante per le reazioni di PCR. I DNA estratti e non analizzati subito devono essere conservati a -20°C.

In seguito all'estrazione, il DNA estratto è stato sottoposto a reazione di amplificazione del gene 16S rRNA:

I primers utilizzati sono stati costruiti sulla base della regione altamente conservata del gene 16S rRNA (De Angelis et. al, 2006) (tabella 5 e 7).

**Per i batteri lattici:**

<b>Primer</b>	<b>Sequenza (5'-3')</b>
Lpig_F	5' –TACGGGAGGCAGCAGTAG- 3'
Lpig_R	5' – CATGGTGTGACGGGCGGT- 3'

Tabella 5: Regione altamente conservata del gene 16S rRNA per i batteri lattici

L'amplificazione del DNA è stata sviluppata nel termociclatore T 3000 Thermocycler (Biometra®) con il seguente ciclo:

1-	Denaturazione	94°C x 5'	} x 35 cicli
2-	Denaturazione:	94°C x 45''	
3-	Annealing:	52°C x 2'30''	
4-	Estensione:	72°C x 2'	
5-	Estensione finale:	72°C x 5'	

La miscela utilizzata per la reazione di PCR è descritta in tabella 6:

<b>H<sub>2</sub>O</b>	42,74 µL
<b>Buffer + MgCl<sub>2</sub> (10X)</b>	5 µL
<b>dNTPs (50 mM)</b>	1 µL
<b>Lpig_F (100 pMoli)</b>	0,25 µL
<b>Lpig_R (100 pMoli)</b>	0,25 µL
<b>Taq polymerase (5U)</b>	0,25 µL

Tabella 6: Miscela utilizzata per la reazione di PCR dei batteri

In ogni eppendorf sono stati inseriti 49,5  $\mu\text{L}$  di mix + 0,5  $\mu\text{L}$  di DNA.

**Per i lieviti:**

Primer	Sequenza (5'-3')
ITS1	5' –TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3'
ITS4	5' –TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3'

*Tabella 7: Regione altamente conservata del gene 16S rRNA per i lieviti*

La miscela utilizzata per la reazione di PCR è descritta in tabella 8:

<b>H<sub>2</sub>O</b>	34,6 $\mu\text{L}$
<b>Buffer (10X)</b>	5 $\mu\text{L}$
<b>dNTPs (10 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	1 $\mu\text{L}$
<b>MgCl<sub>2</sub> (50 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	1,5 $\mu\text{L}$
<b>ITS1 (20 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	1,25 $\mu\text{L}$
<b>ITS4 (20 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	1,25 $\mu\text{L}$
<b>Taq polymerase (250U)(Fisher)</b>	0,4 $\mu\text{L}$

*Tabella 8: Miscela utilizzata per la reazione di PCR dei lieviti*

La reazione conteneva: mix 46  $\mu\text{L}$  + 4  $\mu\text{L}$  DNA.

1. Denaturazione	95°C x 5'	} x 35 cicli
2. Denaturazione:	94°C x 1'	
3. Annealing:	55,5°C x 2'	
4. Estensione:	72°C x 2'	
5. Estensione finale:	72°C x 10'	

Al termine della reazione di PCR, i campioni sono stati fatti migrare per elettroforesi su gel di agarosio 1,5% in TAE 10X a cui è stato aggiunto gel red alla concentrazione finale di 0,5 µg/mL. Per ogni campione di 50 µl sono stati caricati 5 µl di amplificato + 2 µl di colorante. La migrazione è stata condotta in una cella elettroforetica orizzontale applicando una differenza di potenziale di 100 V/cm per circa 40 minuti.

Le bande sono state rese visibili su un transilluminatore UV.

I prodotti di PCR ottenuti tramite amplificazione del gene 16S (batteri lattici) o ITS (lieviti) sono stati purificati tramite QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

I campioni sono stati spediti alla BMR Genomics (Padova) che ha provveduto al sequenziamento. Le sequenze ottenute sono state confrontate tramite BLAST nel sito dell'European Bioinformatic Institute (<http://www.ebi.ac.uk/>) in grado di allineare le sequenze ignote con tutte quelle presenti nei database on line. I risultati hanno mostrato sempre un 100% di similarità.

5.2 Seconda prova: prove di fermentazione dei singoli sottoprodotti utilizzando uno starter microbico predefinito.

#### 5.2.1 Ripresa dei ceppi dalla collezione interna

I ceppi utilizzati (successivamente chiamati consorzio A) per la creazione del consorzio microbico starter predefinito provenienti dalla collezione interna del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari, campus di Cesena. I ceppi in esame erano stati precedentemente isolati da pasta madre. Il consorzio microbico A, composto da 3 batteri lattici (*Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus* e *Lactobacillus curvatus*) e 2 lieviti entrambi appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae*, è stato ripreso a partire da stock in glicerolo di ciascun ceppo conservati a -18°C. In particolare, i ceppi sono stati inoculati singolarmente in terreni liquidi contenuti all'interno di provette precedentemente sterilizzate: YPD per i lieviti e mMRS per i batteri lattici. Sono stati incubati a 30°C per 24 h ed è stato verificato il carico cellulare e la purezza attraverso un campionamento microbiologico. La procedura è stata ripetuta almeno due volte prima dell'utilizzo dei ceppi nelle prove previste dal piano sperimentale.

#### 5.2.2 Preparazione dei prefermenti e inoculo

Per la preparazione degli impasti si è proceduto alla formulazione empirica che prevedeva l'aggiunta del singolo sottoprodotto con aggiunta di acqua minerale e l'addizione o meno di germe di grano (particolarmente instabile data la sua natura lipidica).

In condizione igieniche adeguate sono stati preparati 11 prefermenti costituiti dai sottoprodotti di grano "TENERO" e "DURO", e la cui composizione è riportata in Tabella 2:

<b>Campione</b>	<b>Quantità sott.</b>	<b>Germe</b>	<b>Acqua</b>	<b>Inoculo consorzio microbico*</b>
<b>Componente 1 tenero</b>	80 g	-	80 g	160 µl
<b>Componente 2 tenero</b>	80 g	-	80 g	160 µl
<b>Componente 3 tenero</b>	80 g	-	80 g	160 µl
<b>Componente 4 tenero</b>	80 g	-	80 g	160 µl
<b>Componente 1 tenero + germe</b>	70 g	10 g	80 g	160 µl
<b>Componente 2 tenero + germe</b>	70 g	10 g	80 g	160 µl
<b>Componente 3 tenero + germe</b>	70 g	10 g	80 g	160 µl
<b>Componente 4 tenero + germe</b>	70 g	10 g	80 g	160 µl
<b>Componente 1 duro</b>	80 g	-	80 g	160 µl
<b>Componente 2 duro</b>	80 g	-	80 g	160 µl
<b>Componente 4 duro micro</b>	80 g	-	80 g	160 µl

*Tabella 1: formulazione dei pre-fermenti composti dal singolo sottoprodotto.*

I prefermenti preparati come riportato in tabella 2 sono stati successivamente inoculati con lieviti e batteri lattici del consorzio A. In particolare, lieviti e batteri lattici sono stati inoculati negli impasti ad un livello pari rispettivamente a  $10^4$ - $10^3$  UFC/g. I prefermenti sono stati “rinfrescati” ogni 24 h per almeno 2 volte, fatta eccezione per quelli di grano duro che sono stati rinfrescati solamente una volta dopo 24 h.

I rinfreschi sono stati effettuati come indicato successivamente:

**Rinfreschi grano tenero:**

- 20 g di prefermento + 35 g\* sottoprodotto + 25 g di acqua

con aggiunta di germe:

- 20 g preferente + 30 g\* sottoprodotto + 5g germe + 25 g di acqua

\* per il componente 1 e il componente 2 sono stati utilizzati 5 g in meno a causa del volume eccessivo.

**Rinfreschi grano duro:**

- 20 g di prefermento + 35 g\* di sottoprodotto + 35 g di acqua

\* per il componente 4 e il componente 1 sono stati utilizzati 5 g in meno a causa del volume eccessivo.

I parametri sono stati verificati attraverso il campionamento microbiologico e analisi del pH per individuare il substrato migliore per la formulazione di miscele di sottoprodotti.

### 5.3 Terza prova: formulazione di pre-fermenti ottenuti da miscele di sottoprodotti e utilizzando un consorzio microbico predefinito

Osservando i dati raccolti dalla seconda prova, si è potuto formulare il substrato maggiormente adatto alla preparazione di prefermenti utilizzabili nella formulazione di prodotti da forno. Quindi, dai dati rilevati, si è ipotizzata empiricamente la formulazione di tre miscele di sottoprodotti (chiamate successivamente mix) e riportate in tabella 3.

Le miscele (figura 9) sono state preparate nelle stesse condizioni utilizzate nella seconda prova precedentemente riportata e secondo le formulazioni elencate in tabella 3:

### Miscela

Sottoprodotto	MIX A	MIX B	MIX C
Componente 1 tenero %	5	10	-
Componente 2 tenero %	5	10	-
Germe %	5	10	5
Componente 4 tenero %	45	40	35
Componente 3 tenero %	40	30	
Componente 5 duro %	-	-	40
Componente 4 duro %	-	-	25
Acqua g	80	85	85

Tabella 3: formulazione delle miscele di pre-fermento

I prefermenti preparati come riportato in tabella 3 sono stati successivamente inoculati con lieviti e batteri lattici del consorzio A. In particolare, lieviti e batteri lattici sono stati inoculati negli impasti ad un livello pari rispettivamente a  $10^4$  -  $10^3$  UFC/g. Il processo fermentativo ha previsto una durata di 24h ed è stato svolto a temperatura ambiente. I rinfreschi sono stati ripetuti per 2 volte a distanza di 24 ore nella modalità descritta in tabella 4:

### Rinfreschi

Sottoprodotto	MIX A	MIX B	MIX C
Miscela g	50	50	50
Pre-fermento g	30	30	30
Acqua g	50	50	60

Tabella 4: quantità utilizzate nel rinfresco



Figura 9: Da sinistra: mix A, mix B e mix C

In questo caso i campioni sono stati analizzati per il carico microbico di lieviti e batteri lattici e per i valori di pH al tempo iniziale, dopo 17 e 24h e a 24h dal primo e dal secondo rinfresco.

#### 5.4 Analisi microbiologiche

I campionamenti microbiologici eseguiti per la ricerca di lieviti e lattici, indipendentemente dalla prova, sono sempre stati eseguiti con la stessa modalità. Sono stati prelevati 10 g di campione a cui sono stati aggiunti 90 ml di soluzione fisiologica (0,9% di NaCl) sterile. Successivamente è stata eseguita una omogeneizzazione del campione in stomacher per 60 secondi. Successivamente sono state eseguite delle diluizioni seriali 1:10 in provette di soluzione fisiologica sterile. Le diluizioni sono state eseguite sulla base del carico microbico atteso e dalle diluizioni selezionate sono stati prelevati sterilmente 100µL e inoculati su piastre di terreni di coltura selettivi agarizzate. L'inoculo è stato poi distribuito uniformemente su tutta la superficie della piastra attraverso la tecnica di campionamento per piastramento superficiale. I terreni di coltura utilizzati sono stati YPD per i lieviti e mMRS per i batteri lattici.

##### 5.4.1 Terreno YPD

**YPD+C** (*Yeast extract Peptone Dextrose medium + cloramfenicolo*), sul quale sono stati ricercati lieviti; le piastre ottenute tramite spatolamento superficiale, sono state successivamente incubate per 24-48 ore a 30°C in termostato.

Composizione del terreno:

- Estratto di lievito (10g/L);
- Peptone (10g/L);
- D-glucosio (20g/L);
- Cloramfenicolo (0.2g/L);
- Agar (16g/L).

#### 5.4.2 Terreno mMRS

**mMRS**, sul quale sono stati ricercati i batteri lattici; le piaste ottenute per spatolamento superficiale, sono state successivamente incubate per 24-48 ore a 30°C in termostato.

Composizione del terreno:

- Polipeptone (10g/L);
- Estratto di carne (10g/L);
- Estratto di lievito (5g/L);
- Maltosio (20g/L)
- Tween 80 (1ml/L);
- Dipotssio fosfato (2g/L);
- Sodio acetato (5g/L);
- Ammonio citrato (2g/L);
- Magnesio solfato (0,2g/L);
- Manganese solfato (0,05g/L);
- Agar (16g/L).

Il pH finale è stato corretto a 5,4 tramite acidificazione con HCl 5M.

#### 5.5Analisi Chimiche

##### 5.5.1 Determinazione del pH

Per la valutazione delle cinetiche di acidificazione dei prefermenti di ciascuna prova prevista dal piano sperimentale, sono stati determinati i valori di pH ai tempi previsti.

Il pH è stato misurato tramite pH-metro (BASIC 20, Crison, Modena, Italy) (Figura 8), opportunamente tarato con standard pH 7,0 e 4,0. Sono stati prelevati 10 g da ogni impasto e aggiunti a 10 g di acqua distillata (figura 11). Il pH è stato misurato inserendo la sonda nel sacchetto contenente il campione.



*Figura 10: pH-metro BASIC 20, Crison.*



*Figura 11: campione da sottoporre ad analisi del pH*

## 6 Risultati

### 6.1 Prima Prova

Nella prima fase della ricerca effettuata sono stati isolati lieviti e batteri lattici da prefermenti ottenuti a partire da diversi sottoprodotti dell'industria molitoria (4 da grano tenero e 3 da grano duro) fermentati in modo spontaneo. In particolare, i prefermenti, ottenuti anche con l'aggiunta di farina, sono stati rinfrescati giornalmente sino a stabilizzazione dopodiché è stato valutato il pH finale, il carico di lieviti e batteri lattici ed infine sono stati eseguiti gli isolamenti microbiologici.

#### 6.1.1 pH e carico cellulare di lieviti e batteri lattici

I campioni considerati in questa prova, la cui preparazione e composizione sono riportate nella sezione 5.1 del capitolo 5, sono stati rinfrescati almeno 2 volte sino al raggiungimento di un pH stabile. In Figura 12 sono riportati i valori di pH finale di ciascun prefermento considerato.

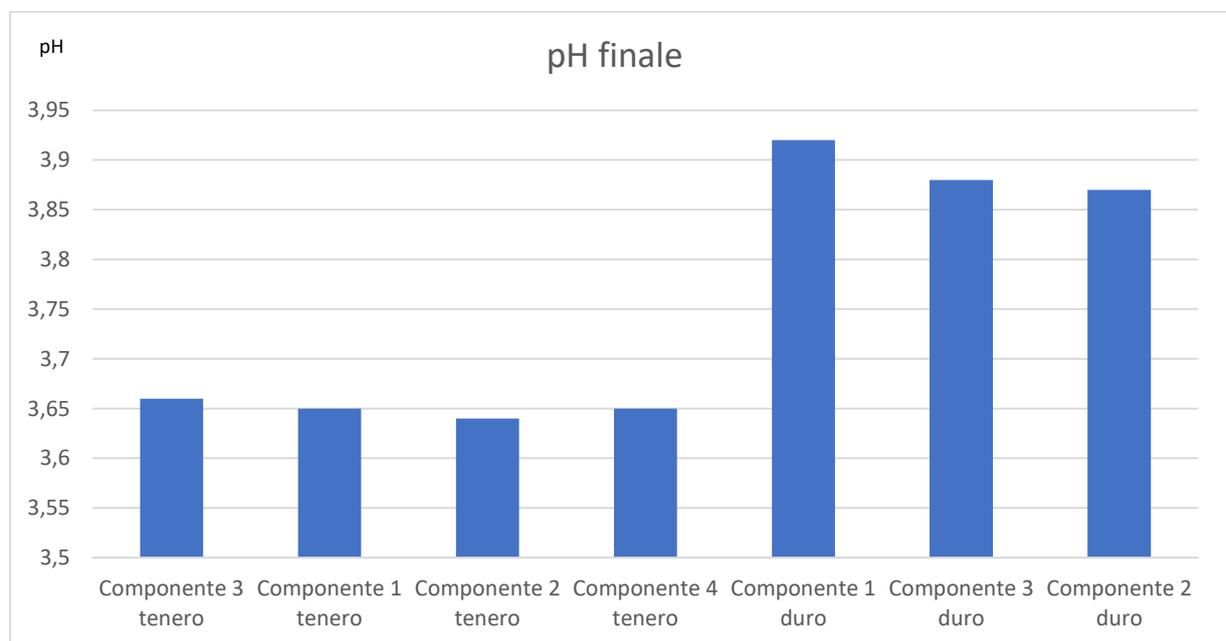


Figura 12: pH finali dei prefermenti ottenuti a partire da diversi sottoprodotti dell'industria molitoria e fermentati in modo spontaneo

La Figura 12 descrive l'evidente differenza tra i pH finali dei campioni influenzata dalla tipologia di grano analizzata. In tutti i campioni formulati con sottoprodotti derivati dal grano duro il pH finale è risultato superiore ai prefermenti ottenuti dal frumento tenero. Infatti, se l'acidificazione è stata elevata per tutti i campioni analizzati che hanno espresso valori di pH al di sotto del 4,0, i campioni a base di grano duro hanno mostrato valori di pH compresi tra 3,86 e 3,92 mentre quelli a base di grano tenero sono risultati più acidi con valori di pH compresi tra 3,64 e 3,66.

Ciascun campione è stato analizzato anche da un punto di vista microbiologico sia per valutare la proporzione e il carico di lieviti e LAB che poi per procedere al successivo loro isolamento. In figura 13 sono riportati i carichi microbici espressi come log UFC/g di lieviti e LAB in ciascun prefermento considerato.

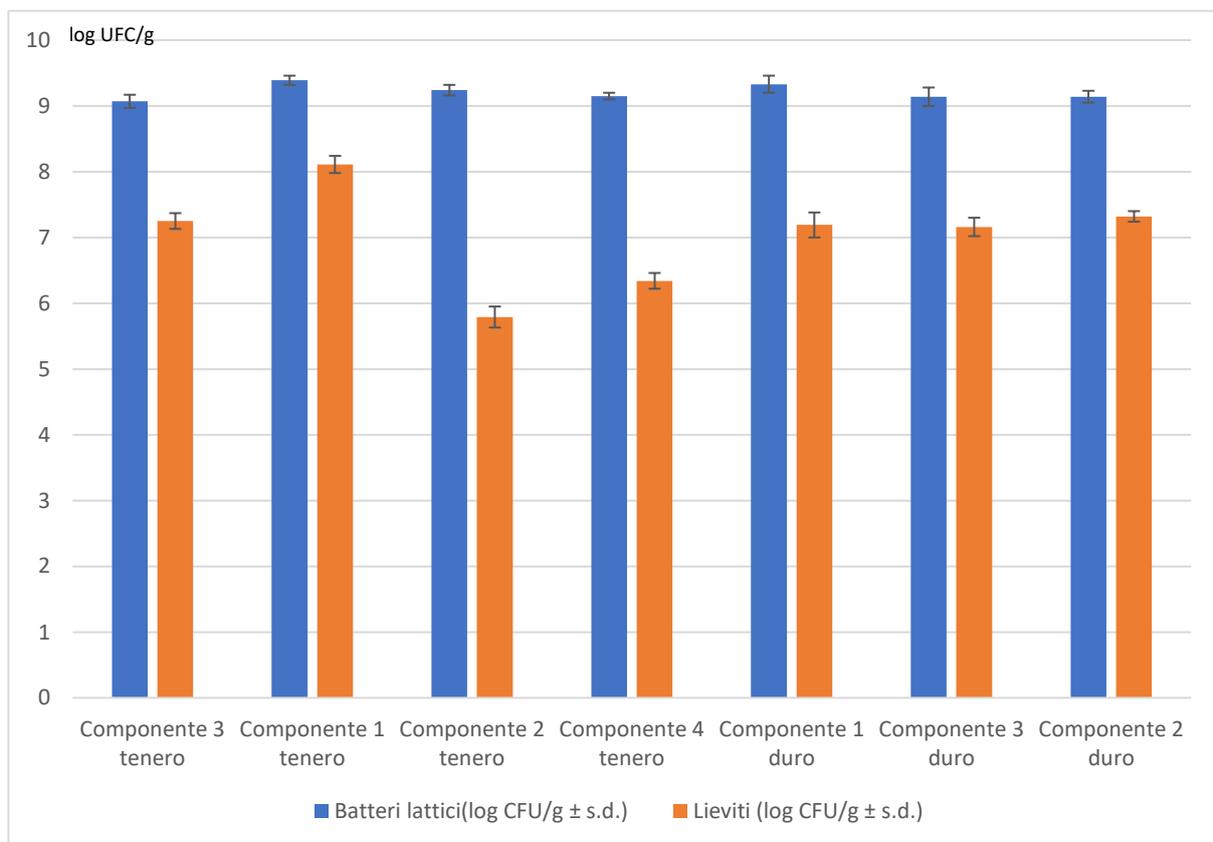


Figura 13: Carico cellulare di lieviti e batteri lattici, espresso come log UFC/g in ciascun prefermento da grano tenero e grano duro fermentato spontaneamente

Una volta stabilizzati i prefermenti in termini di livello di acidità, è stato possibile osservare come la microflora autoctona si era differenziata fra lieviti e batteri lattici in un rapporto differente fra i due in funzione del campione considerato e quindi della tipologia di sottoprodotto (figura 13). In tutti i campioni il carico di batteri lattici ha raggiunto valori molto simili e pari a circa  $10^9$  UFC/g, al contrario il livello dei lieviti è risultato influenzato dalla tipologia dei campioni. Nei campioni ottenuti da grano duro e in quello costituito dal componente 3 di grano tenero il livello di lieviti è risultato pari a circa  $10^7$  UFC/g e quindi era mantenuto un rapporto fra lieviti e batteri lattici pari a 1:100 considerato come rapporto ottimale in impasti acidi. Al contrario, nel campione contenente il **componente 1 tenero** i lieviti si aggiravano intorno a  $10^8$  UFC/g e quindi in questo caso il rapporto tra batteri lattici e lieviti risultava sproporzionato a favore di questi ultimi. Andamento molto diverso hanno avuto i campioni costituiti dal **componente 2 e dal componente 4 di grano tenero** che hanno manifestato un carico microbico di lieviti intorno a  $10^6$  UFC/g. In questo caso il rapporto tra batteri lattici e lieviti è risultato sproporzionato a favore dei primi.

Nelle piastre ottenute dal campionamento microbiologico, oltre alla quantificazione di lieviti e lattici, sono stati effettuati degli isolamenti delle singole colonie in relazione alla loro morfologia. In tabella 9 è riportata la quantità di differenti morfologie di lieviti e LAB individuate per ogni singolo campione.

<b>Prefermento</b>	<b>Numero delle differenti morfologie di LAB</b>	<b>Numero delle differenti morfologie dei lieviti</b>
Componente 3 tenero	5	3
Componente 1 tenero	7	3
Componente 2 tenero	5	2
Componente 4 tenero	6	3
Componente 1 duro	6	3
Componente 3 duro	6	2
Componente 2 duro	5	2

*Tabella 9: numero di differenti morfologie di lieviti e batteri lattici individuate per ciascun prefermento ottenuto da fermentazione spontanea*

Indipendentemente dal campione considerato, il numero di differenti morfologie di LAB è risultato compreso tra 5 e 7 mentre quello di lieviti tra 2 e 3. Dunque, nel caso dei LAB è stata individuata una microflora più complessa e costituita da un numero maggiore di ceppi rispetto a quanto osservato per i lieviti.

#### 6.1.2 identificazione per sequenziamento molecolare

In seguito all'isolamento e alla purificazione dei ceppi individuati precedentemente è stato possibile identificare le differenti morfologie individuate di lieviti e batteri. Nelle tabelle 10 e 11 sono riportati rispettivamente i risultati dell'identificazione mediante sequenziamento genetico di lieviti e batteri lattici.

#### Lieviti identificati

Ceppo	Prefermento	Identificato	Ceppo	Prefermento	Identificato
F1	Componente 4 tenero	<i>Pichia</i> <i>Kudriavzevii</i>	F1.1	Componente 2 duro	<i>Pichia kudriavzevii</i>
F2	Componente 4 tenero	<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	F1.2	Componente 2 duro	<i>Kazachstania</i> <i>unispورا</i>
CR1	Componente 2 tenero	<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	F1.3	Componente 2 duro	<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>
CR2	Componente 2 tenero	<i>Pichia</i> <i>kudriavzevii</i>	T1	Componente 3 tenero	<i>Pichia kudriavzevii</i>
W1	Componente 3 duro	<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	T2	Componente 3 tenero	<i>Kazachstania</i> <i>unispورا</i>
W2	Componente 3 duro	<i>Kazachstania</i> <i>unispورا</i>	T3	Componente 3 tenero	<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>
W3	Componente 3 duro	<i>Pichia</i> <i>kudriavzevii</i>	T4	Componente 3 tenero	<i>Pichia kudriavzevii</i>
W1.1	Componente 3 duro	<i>Pichia</i> <i>kudriavzevii</i>	C1	Componente 1 tenero	<i>Pichia kudriavzevii</i>

YP2	Consorzio A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	C2	Componente 1 tenero	<i>Pichia kudriavzevii</i>
W1.2	Componente 1 duro	<i>Pichia kudriavzevii</i>	C3	Componente 1 tenero	<i>Pichia kudriavzevii</i>
W1.3	Componente 1 duro	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	WL1	Consorzio A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Tabella 10: Identificazione molecolare di ceppi di lieviti isolati da prefermenti ottenuti da fermentazioni spontanee

### Batteri Lattici

Ceppo	Sottoprodotto	Identificato
FA	Componente 4 tenero	<i>Lactobacillus brevis</i>
FB	Componente 4 tenero	<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>
FC	Componente 4 tenero	<i>Lactobacillus plantarum</i>
FD	Componente 4 tenero	<i>Lactobacillus plantarum</i>
FE	Componente 4 tenero	<i>Lactobacillus fermentum</i>
FF	Componente 4 tenero	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>
FG	Componente 4 tenero	<i>Lactobacillus songhuajiangensis/guizhouensis</i>
CBA	Componente 2 tenero	<i>Lactobacillus curvatus</i>
CBB	Componente 2 tenero	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
CBC	Componente 2 tenero	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
CBD	Componente 2 tenero	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
CBE	Componente 2 tenero	<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>
CBF	Componente 2 tenero	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>
WA	Componente 3 duro	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
WB	Componente 3 duro	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
WC	Componente 3 duro	<i>Lactobacillus curvatus</i>
WD	Componente 3 duro	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
WE	Componente 3 duro	<i>Lactobacillus brevis</i>
WF	Componente 3 duro	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LAA	Consorzio A	<i>Lactobacillus curvatus</i>
LAB	Consorzio A	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
WB1	Componente 1 duro	<i>Lactobacillus plantarum</i>

WB2	Componente 1 duro	<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>
WB3	Componente 1 duro	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
WB4	Componente 1 duro	<i>Lactobacillus brevis</i>
WB5	Componente 1 duro	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
WB6	Componente 1 duro	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
F1A	Componente 2 duro	<i>Lactobacillus plantarum</i>
F1B	Componente 2 duro	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
F1C	Componente 2 duro	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
F1D	Componente 2 duro	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
F1E	Componente 2 duro	<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>
F1F	Componente 2 duro	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
TA	Componente 3 tenero	<i>Lactobacillus fermentum</i>
TB	Componente 3 tenero	<i>Lactobacillus curvatus</i>
TC	Componente 3 tenero	<i>Lactobacillus plantarum</i>
TD	Componente 3 tenero	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
TE	Componente 3 tenero	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>
TF	Componente 3 tenero	<i>Lactobacillus songhuajiangensis/guizhouensis</i>
C1A	Componente 1 tenero	<i>Lactobacillus pentosus/plantarum</i>
C1B	Componente 1 tenero	<i>Lactobacillus curvatus</i>
C1C	Componente 1 tenero	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
C1D	Componente 1 tenero	<i>Lactobacillus brevis</i>
C1E	Componente 1 tenero	<i>Lactobacillus songhuajiangensis/guizhouensis</i>
CBF	Componente 1 tenero	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
CBG	Componente 1 tenero	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>
LANCC	Consorzio A	<i>Pediococcus pentosaceus</i>

LANCD	Consorzio A	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
-------	-------------	--------------------------------

Tabella 11: Identificazione molecolare di ceppi di batteri lattici isolati da prefermenti ottenuti da fermentazioni spontanee

I dati di sequenziamento hanno evidenziato come nel caso dei lieviti solo 3 specie sono state identificate quali *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii* e *Kazachstania unispora*. Se *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* sono state isolate da quasi tutti i campioni, *K. unispora* è stata isolata solo sporadicamente. Tutti i lieviti identificati sono riportati come caratteristici di impasti acidi oltre ad essere stati isolati frequentemente da crusche di diversi cereali.

Nel caso dei batteri lattici è stata riscontrata una maggiore eterogeneità tra i campioni. Le specie identificate sono state: *Pediococcus pentosaceus* 15 ceppi, *Leuconostoc mesenteroides* 4 ceppi, *Lactobacillus curvatus* 5 ceppi, *Lactobacillus brevis* 4 ceppi, *Lactobacillus plantarum* 7 ceppi, *Lactobacillus fermentum* 2 ceppi, *Lactobacillus paralimentarius* 4 ceppi, *Lactobacillus pentosus* 2 ceppi e *Lactobacillus songhuaqiagensis* 3 ceppi.

## 6.2 Seconda prova

Nella seconda prova è stato testato un consorzio microbico predefinito, isolato da impasti acidi tradizionali, e composto da *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Pediococcus pentosaceus* come LAB e *Saccharomyces cerevisiae* come lievito per la preparazione di prefermenti ottenuti a partire da differenti tipologie di sottoprodotti dell'industria molitoria considerati singolarmente o con aggiunta di germe di grano (vedi tabella 2 materiali e metodi), al fine di valutare la capacità di crescita e acidificazione da parte del consorzio microbico e le caratteristiche del prefermento in termini di coesione e accettabilità organolettica.

### 6.2.1 Cinetiche di acidificazione

Per ottenere un prefermento stabile, il parametro del pH è fondamentale ed è il risultato dell'evoluzione della popolazione microbica all'interno del prefermento.

Durante la seconda prova sono state valutate sia le cinetiche di acidificazione che di crescita microbica dei differenti campioni. La figura 14 descrive l'andamento del pH dei diversi campioni a tempo zero, dopo 24h di fermentazione e dopo 24h dal primo e successivamente dal secondo rinfresco.

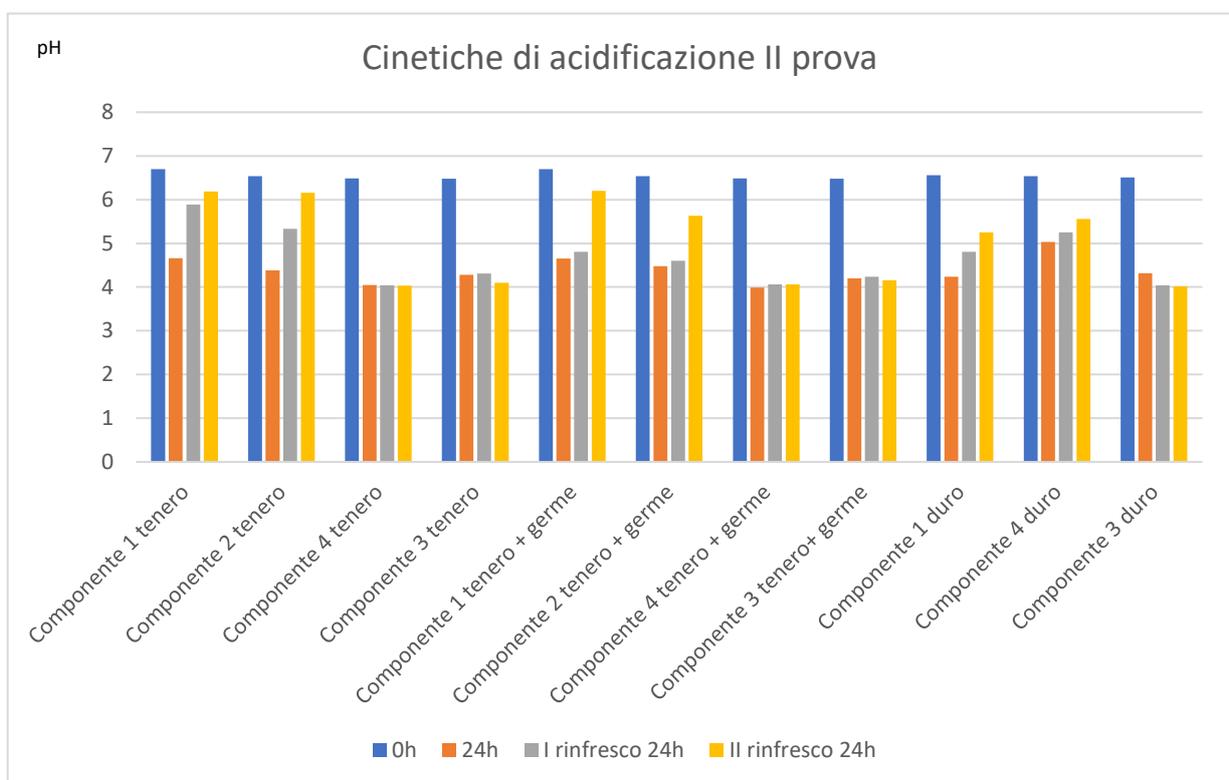


Figura 14: Cinetiche di acidificazione dei diversi prefermenti considerati nella seconda prova in funzione della tipologia di campione

I risultati ottenuti hanno mostrato una buona acidificazione in tutti i campioni considerati, sia quelli a base di grano tenero che di grano duro, indipendentemente dalla presenza del germe di grano, già dopo 24h di fermentazione. Infatti, ad eccezione del componente 1 di grano tenero in presenza o assenza di germe di grano e del componente 4 da grano duro, tutti gli altri campioni hanno evidenziato valori di pH di circa 4,0 dopo 24h.

Possiamo notare che i campioni che hanno mostrato una maggiore stabilità sono stati: il componente 4 tenero, il componente 3 tenero, il componente 4 tenero + germe, il componente 3 tenero + germe e il componente 3 duro, inquanto dopo le prime 24 ore hanno raggiunto tutti un pH intorno al 4,0 ed in seguito a successivi rinfreschi non hanno subito particolari variazioni di pH che, infatti, rimaneva pressoché costante. Negli altri campioni è stato osservato invece un incremento del pH, più o meno accentuato in base alla matrice, a seguito della preliminare acidificazione osservata dopo 24h, rendendo quindi questi campioni instabili nei successivi rinfreschi. Questa caratteristica indica come i sottoprodotti da cui sono stati ottenuti questi ultimi campioni non siano risultati particolarmente idonei per la formulazione di prefermenti utilizzabili in panificazione in quanto non hanno mostrato performance ottimali in termini di acidificazione e stabilità necessarie per soddisfare i requisiti tecnologici e nutrizionali (es. pH ottimale delle per attivazione delle fitasi dei LAB).

## 6.2.2 Cinetiche di crescita di lieviti e LAB

I prefermenti considerati in questa prova sperimentale sono stati sottoposti anche a campionamento microbiologico al fine di determinare la cinetica di sviluppo di lieviti e batteri lattici membri del consorzio microbiologico utilizzato per il processo fermentativo.

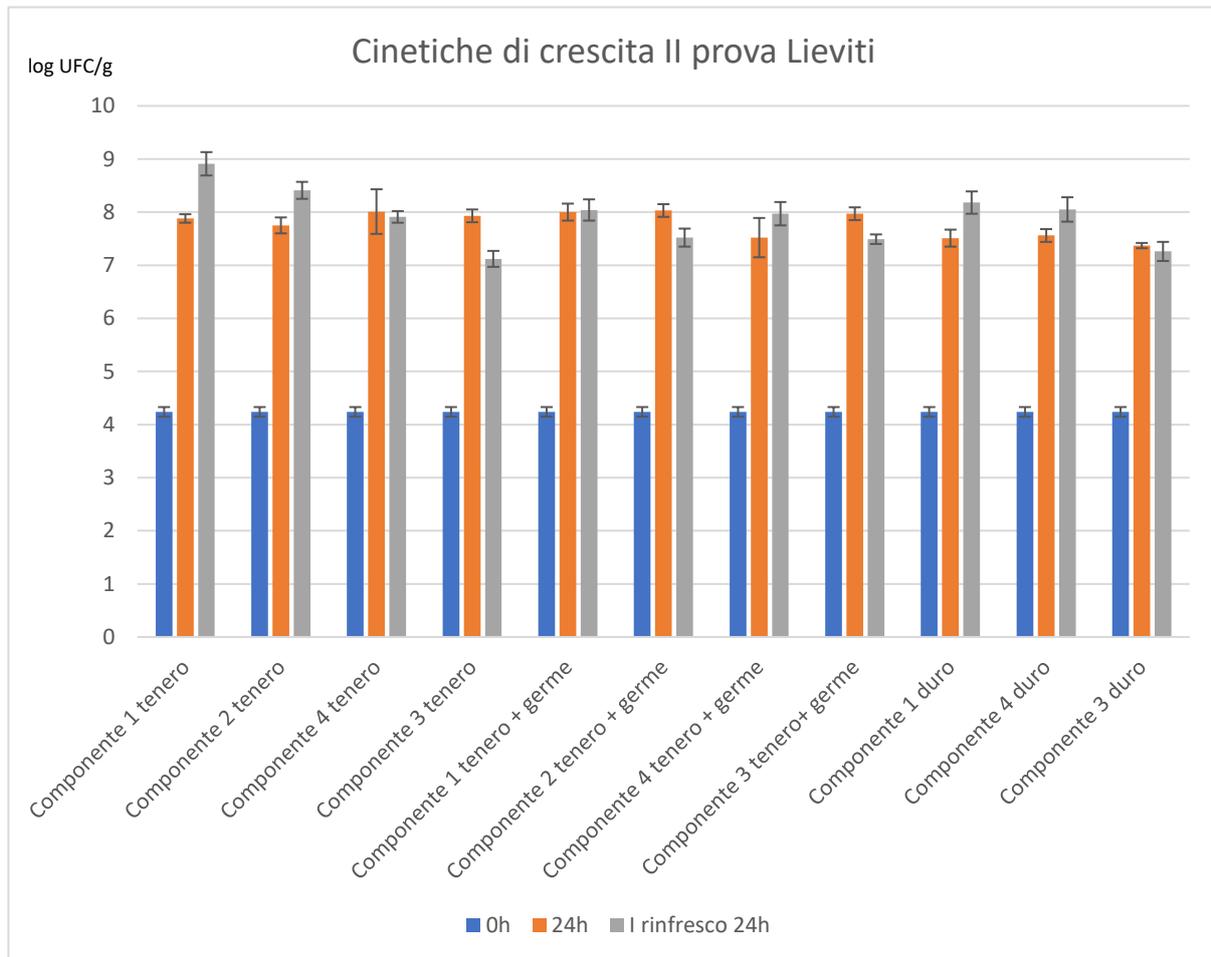


Figura 15: Carico cellulare di lieviti espresso come log UFC/g nei diversi prefermenti al tempo 0 e dopo 24h di fermentazione e ulteriori 24h dal primo rinfresco

In particolare, le analisi microbiologiche sono state eseguite a tempo zero, dopo 24 ore di fermentazione, e dopo ulteriori 24h dal primo rinfresco. In figura 15 e 16 sono riportate rispettivamente le cinetiche di crescita di lieviti e batteri lattici nei diversi campioni.

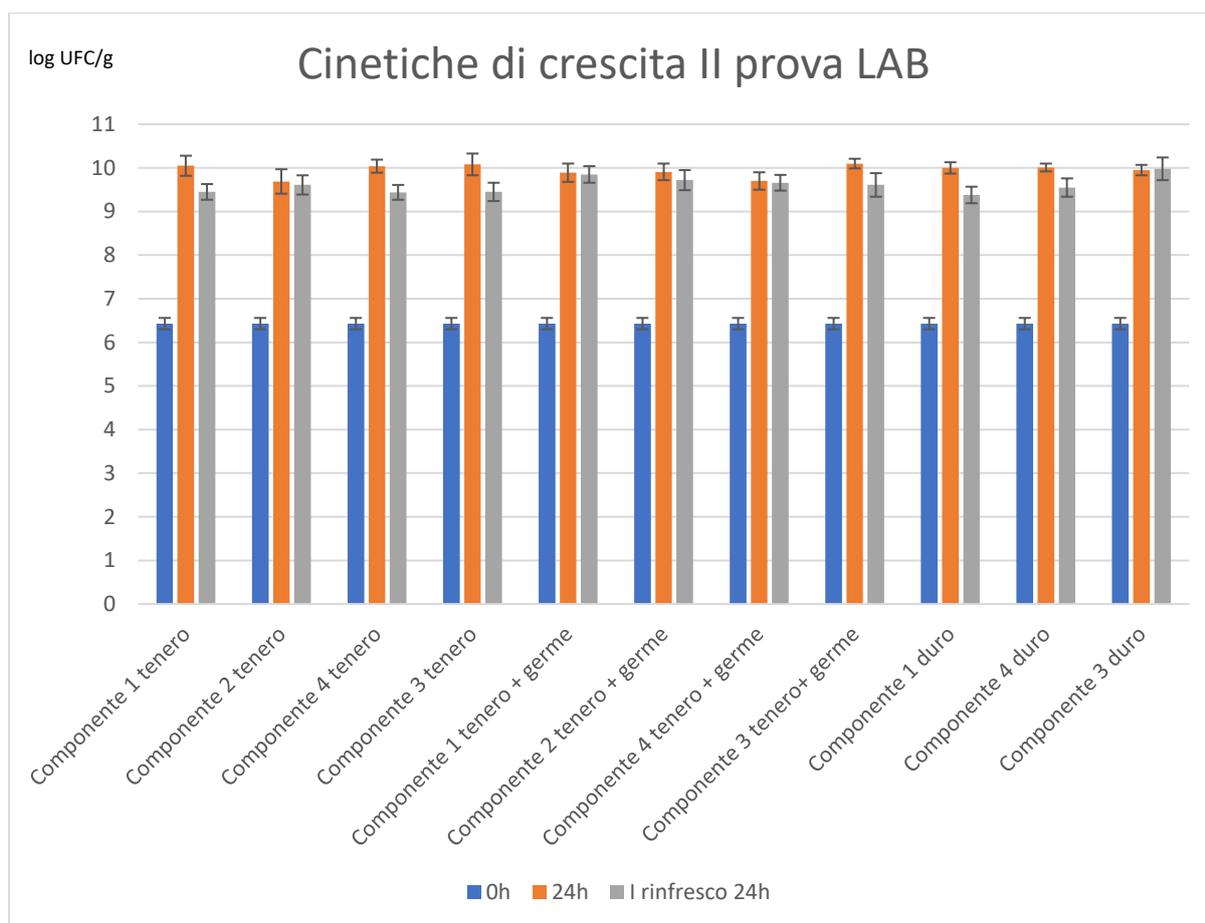


Figura 16: Carico cellulare di batteri lattici espresso come log ufc/g nei diversi prefermenti al tempo 0 e dopo 24h di fermentazione e ulteriori 24h dal primo rinfresco

Dalle figure 15 e 16 è possibile notare che lo sviluppo dei lieviti dopo 24 ore si aggirava a fra  $10^8$  e  $10^9$  UFC/g in base alla tipologia di campione analizzato, invece la carica microbica dei LAB è risultata più costante indipendentemente dal componente, rimanendo in un range più ristretto fra  $5 \times 10^9$  e  $10^{10}$  UFC/g. Inoltre, si può notare che dopo il primo rinfresco, solamente i campioni costituiti dalla componente 3 e 4 da grano tenero, indipendentemente dalla presenza di germe di grano, e dalla componente 3 di grano duro non hanno fatto registrare eccessive differenze nel carico cellulare di lieviti e LAB rispetto a quanto osservato dopo 24h di fermentazione. Questo è un elemento fondamentale affinché si abbiano dei prefermenti stabili nel tempo. Questi dati confermano quanto era stato osservato per le cinetiche di acidificazione dei medesimi campioni. Infatti, i campioni a base dei componenti 1 e 2 di grano tenero e 1 e 4

di grano duro hanno fatto registrare, a seguito del primo rinfresco, un incremento della popolazione di lieviti accompagnata da una diminuzione di quella di LAB. Ciò ha portato ad uno squilibrio del rapporto ottimale tra lieviti e lattici risultando in un prefermento non stabile in cui è stato osservato un incremento del pH nel tempo probabilmente dovuto alla disacidificazione svolta dall'eccessiva presenza di lieviti che d'altra parte se le condizioni lo richiedono sono in grado di metabolizzare lattato come fonte di energia.

I dati di questa seconda prova hanno permesso di individuare, tra i vari sottoprodotti dell'industria molitoria testati, gli ingredienti e le formulazioni ottimali per la preparazione di prefermenti ottimali da un punto di vista tecnologico per poter essere utilizzati nel settore dei prodotti da forno.

### 6.3 Terza Prova

La terza prova è stata svolta testando 3 differenti miscele di sottoprodotti dell'industria molitoria, la cui composizione e preparativa è riportata nella sezione 5.3 del capitolo 5 materiali e metodi. Come possibile osservare dalla composizione percentuale di queste miscele i componenti addizionati in maggiore quantità sono stati quelli che in base alla prova 2 hanno mostrato i migliori risultati da un punto di vista tecnologico ovvero componente 3 e 4 da grano tenero e componente 3 da grano duro. Tuttavia, piccole quantità anche dei componenti 1 e 2 da grano tenero sono stati addizionati in quanto, nonostante le negative proprietà tecnologiche, erano caratterizzati da ottime proprietà nutrizionali come l'elevato contenuto in fibre. Le tre miscele, inoculate con il medesimo consorzio microbico utilizzato nella prova 2, sono state lasciate fermentare a temperatura ambiente per 24h e sono state successivamente rinfrescate per 3 volte a cadenza giornaliera. Durante il processo fermentativo, i campioni sono stati sottoposti ad analisi microbiologiche e del pH.

### 6.3.1 Cinetiche di acidificazione

Il pH dei campioni è stato rilevato a differenti tempi equivalenti a 0, 17 e 24h oltre a diversi tempi successivi ai tre rinfreschi effettuati (figura 17).

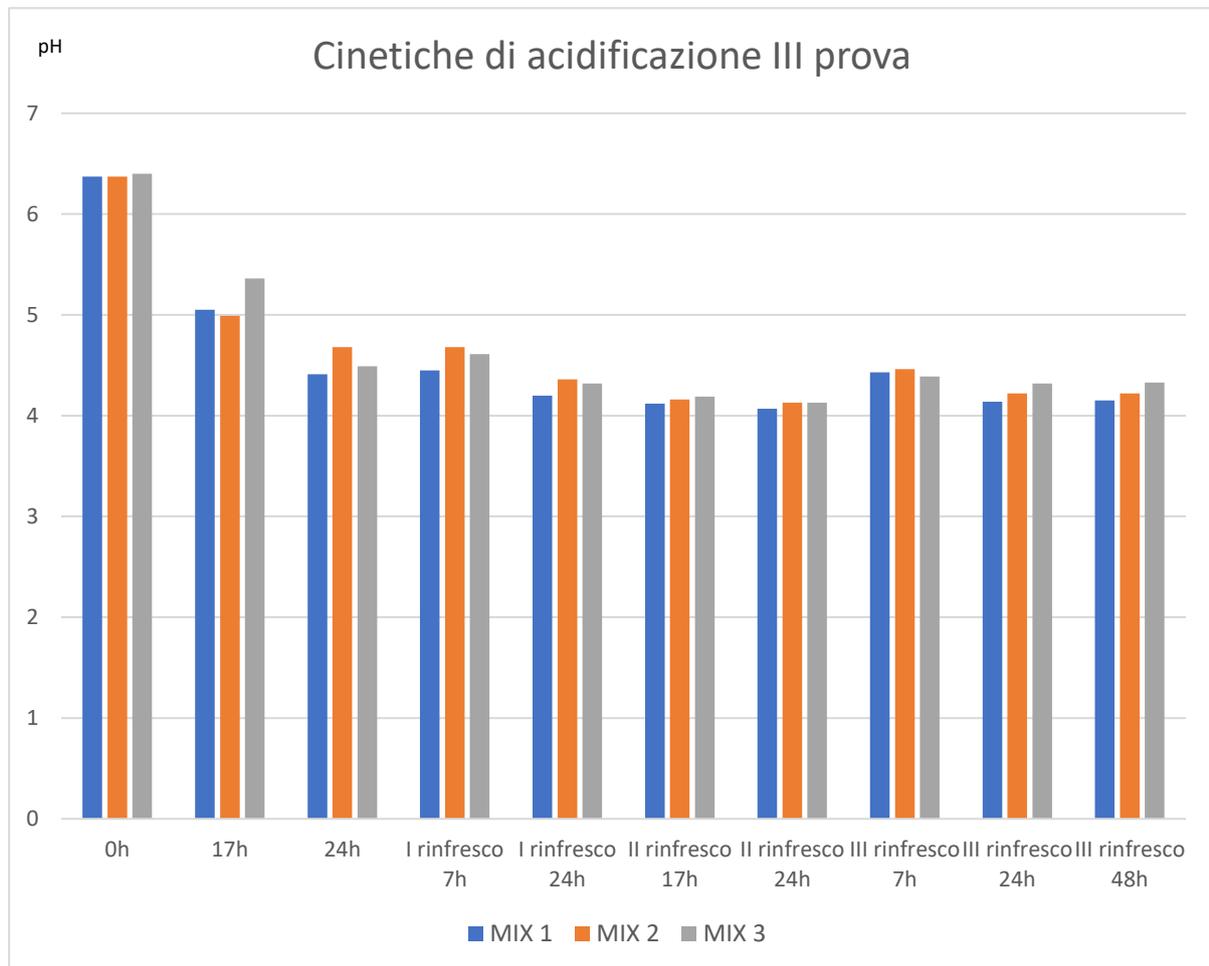


Figura 17: Cinetiche di acidificazione delle MIX 1, 2 e 3 ottenute con l'aggiunta di un consorzio microbico selezionato, al tempo iniziale, dopo 17 e 24h di fermentazione e a seguito dei successivi rinfreschi

Le cinetiche di acidificazione osservate sono risultate abbastanza simili per tutti i prefermenti considerati. Infatti, i valori di pH osservati dopo 24h sono rimasti pressoché costanti anche durante i successivi rinfreschi indicando una buona stabilità dei prefermenti ottenuti. Anche da un punto di vista organolettico e di consistenza i prefermenti hanno mostrato delle buone caratteristiche.

### 6.3.2 Cinetiche di crescita di lieviti e batteri lattici

Le miscele sono state anche sottoposte ad analisi microbiologica per valutare lo sviluppo di lieviti e batteri nel tempo. Le analisi sono state fatte sia sulle MIX di partenza inoculate con il consorzio microbico considerato costituito da *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Pediococcus pentosaceus* come LAB e *Saccharomyces cerevisiae* come lievito, fermentate per 24h che sui successivi tre rinfreschi dopo 24 ore.

In figura 18 sono riportate le cinetiche di crescita dei lieviti nel tempo in relazione alla MIX considerata. È possibile come lo sviluppo sia risultato simile indipendentemente dalla miscela considerata, ed in particolare, un costante incremento del carico cellulare dei lieviti è stato osservato sino a 24h dal primo rinfresco mentre a seguito dei rinfreschi successivi è rimasto più o meno costante e pari a circa  $10^8$  UFC/g.

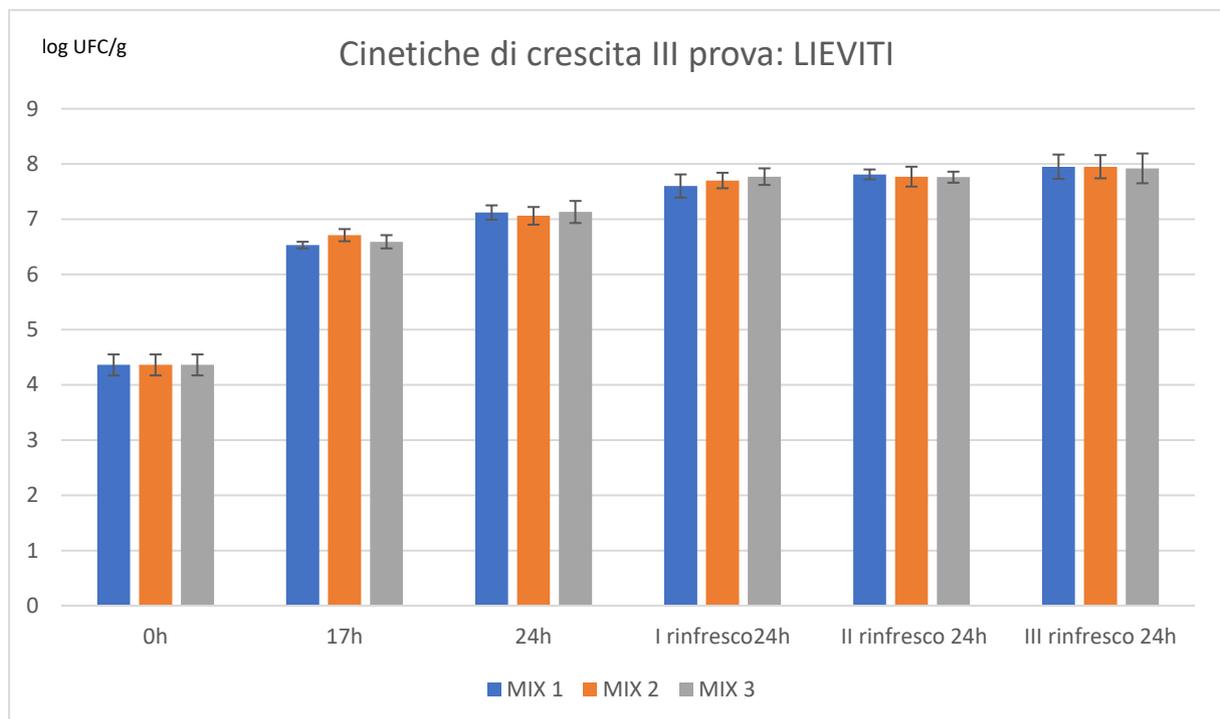


Figura 18: risultati del campionamento microbiologico dei Lieviti in YPD + C

In figura 19 sono invece descritte le cinetiche di crescita dei batteri lattici nelle varie mix a differenti tempi e rinfreschi. Contrariamente a quanto descritto per i lieviti, è possibile notare che i batteri lattici avevano raggiunto la loro concentrazione massima già dopo 17 ore di fermentazione del prefermento iniziale. I successivi rinfreschi confermano la stabilità del consorzio di lattici utilizzato che ha mostrato un carico del tutto simile a quello osservato dopo 17h e pari a circa  $10^{10}$  UFC/g.

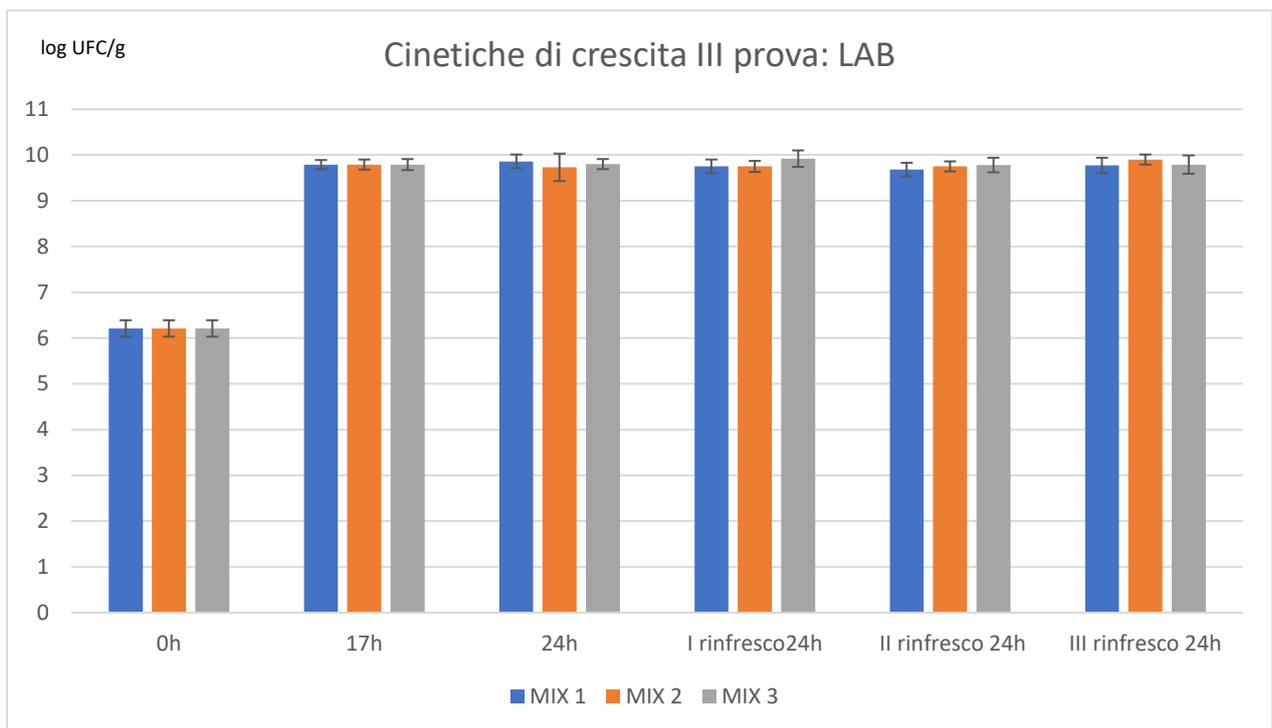


Figura 19: Risultati del campionamento microbiologico dei LAB in mMRS

Anche i dati relativi allo sviluppo di lieviti e lattici indicano le ottime potenzialità sia delle miscele selezionate e del consorzio microbico testato per la produzione di prefermenti utilizzabili in panificazione. Infatti, il consorzio microbico impiegato è risultato piuttosto stabile in termini di cinetica di crescita che di acidificazione, indipendente dalla miscela di sottoprodotti utilizzata. Tutti i prefermenti ottenuti sono risultati accettabili da un punto di vista organolettico indicando come le formulazioni delle miscele effettuate sulla base delle prove preliminari siano state adeguate.

Dai dati ottenuti è risultato un po' più lento lo sviluppo dei lieviti che tuttavia si stabilizzava a seguito del primo rinfresco. Inoltre, modulando l'aggiunta di acqua nella formulazione del prefermento sarà possibile accelerare l'ottenimento del prefermento riducendo i tempi necessari all'ottenimento dei valori di pH ottimali e velocizzando la crescita e stabilizzazione di lieviti e batteri lattici utilizzati come starter.

## 7 Conclusioni

Nella parte iniziale di questa sperimentazione sono stati isolati batteri lattici e lieviti da impasti preparati a partire da diversi sottoprodotti di grano tenero e di grano duro e fermentati in modo spontaneo. I LAB e i lieviti isolati dai prefermenti sono risultati caratteristici dei tradizionali impasti acidi. Infatti, sono stati isolati sia batteri lattici omofermentanti che eterofermentanti obbligati o facoltativi, e tutte le specie identificate sono riportate come caratteristiche di impasti acidi. Inoltre, i lieviti appartenenti ai generi *Saccharomyces*, *Kazachstania* e *Pichia* sono anch'essi indicati come caratteristici di impasti acidi. Per di più, il rapporto ottimale LAB: lieviti in pasta madre è generalmente riportato essere pari a 100:1; i nostri prefermenti a base di sottoprodotti di molitura ed ottenuti da fermentazione spontanea, ad eccezione di 2 componenti di grano tenero ed uno di grano duro, hanno mostrato questo rapporto ottimale.

Le successive prove di fermentazione di sottoprodotti dell'industria molitoria, considerati singolarmente e fermentati con un consorzio microbico selezionato e composto da diversi LAB e lieviti, hanno permesso di individuare 2 componenti da grano tenero ed uno da grano duro ottimali in termini di acidificazione e rapporto ottimale tra LAB e lieviti ottenuti dopo 24h ottimali per la formulazione del prefermento. Questi prefermenti hanno mantenuto un'ottima stabilità microbiologica anche quando incubati per successivi periodi. Questo è molto importante nell'ottica di un futuro scaling-up industriale; infatti a livello industriale è comune conservare gli ingredienti prefermentati anche per diversi giorni.

I dati ottenuti hanno permesso di formulare 3 differenti miscele di sottoprodotti ottimali per la preparazione di prefermenti oltre ad un consorzio microbico composto da batteri lattici quali *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus curvatus* e lieviti come *Saccharomyces cerevisiae* ottimale da un punto di vista di cinetiche di acidificazione, stabilità nel tempo e caratteristiche organolettiche del prefermento. Anche i dati ottenuti nell'ultima hanno dimostrato come tutte e tre le miscele di sottoprodotti fermentate dal consorzio microbico selezionato abbiano permesso di ottenere dei prefermenti accettabili da un punto di vista organolettico, ottenuti in tempi brevi (entro le 24h) e stabili microbiologicamente per successivi periodi di stoccaggio.

Nonostante le buone potenzialità dei pre-fermenti ottenuti in questa sperimentazione, prima di una possibile applicazione di questi saranno necessarie diverse prove riguardanti l'ottimizzazione della loro produzione in termini di quantità di acqua addizionata, il livello di inoculo del consorzio microbico, la temperatura di fermentazione. Tutto ciò potrebbe consentire di ridurre i tempi di fermentazione dando un notevole vantaggio nell'ottica di un impiego industriale. Inoltre, ulteriori analisi sui prefermenti, come la determinazione delle molecole volatili, e analisi funzionali come l'attività antiossidante, la presenza di peptidi bioattivi, il contenuto fenolico totale, dovranno essere considerate. Infine, prove di panificazione per valutare le quantità ottimali di pre-fermento da utilizzare, saranno necessarie in quanto sicuramente il processo di lievitazione e cottura sarà certamente influenzato dall'aggiunta di pre-fermenti con diverse caratteristiche in termini di popolazione microbica, acidità e caratteristiche organolettiche.

## Bibliografia

- Direttiva 2008/98/Ce Del Parlamento Europeo E Del Consiglio del 19 novembre 2008
- Rapporto FAO <http://www.fao.org/3/i3347e/i3347e.pdf>
- S. Romani, R. Lanciotti, 2019, Corso “Valorizzazione dei sottoprodotti nell’industria alimentare A.A. 2018-2019” del C.d.L. Scienze e Tecnologie Alimentari LM-70 UNIBO.
- R. Lanciotti, 2020, Corso “Microbiologia delle Fermentazioni A.A. 2019-2020” del C.d.L. Scienze e Tecnologie Alimentari LM-70 UNIBO.
- G. Pinnavaia, 2018, Corso “Tecnologie dei cereali e derivati A.A. 2018-2019” del C.d.L. Scienze e Tecnologie Alimentari LM-70 UNIBO.
- B. Carrai, 2010, Arte bianca. Materie prime, processi e controlli, Cap. 1, Cap. 2, Cap. 3.
- A. Surget, C. Barron, 2005. Histologie du grain. 145, 3–7.
- M. Chandrasekaran editore 2013, Valorization of Food Processing By-Products, Cap. 7, Cap. 8, Cap. 9, Cap. 10, Cap. 12, Cap 19.
- G. A. Farris, M. Gobbetti, E. Neviani, M. Vincenzini, 2012, Microbiologia dei prodotti alimentari, Cap. 16.
- J P. Trigo, Elisabete M. C. Alexandre, Jorge A. Saraiva & Manuela E. Pintado 2020. High value-added compounds from fruit and vegetable by-products – Characterization, bioactivities, and application in the development of novel food products, critical reviews in food science and nutrition, vol. 60, no. 8, 1388–1416.
- M. Prückler, S. Siebenhandl-Ehn, S. Apprich, S. Höltinger, C. Haas, E. Schmid, W. Kneifel, 2014, Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization, LWT - Food Science and Technology 56, 211-221.

- D. C. Elliott, R. J. Orth, J. Gao, T. A. Werpy, D. E. Eakin, A. J. Schmidt, et al., 2002, Biorefinery concept development based on wheat flour milling. In J. Crockett, & C. L. Peterson (Eds.), Bioenergy 2002. Pacific Regional Biomass Energy Program, Boise.
- M. A. Neves, T. Kimura, N. Shimizu, K. Shiiba, 2006. Production of alcohol by simultaneous saccharification and fermentation of low-grade wheat flour. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 481-490.
- A. A. Koutinas, R. Wang, G. M. Campbell, C. Webb, 2006. A whole crop biorefinery system: a closed system for the manufacture of non-food products from cereals. In B. Kamm, P. R. Gruber, & M. Kamm (Eds.), *Biorefineries-industrial processes and products* 165-19.
- S. Apprich, Ö. Tirpanalan, J. Hell, M. Reisinger, S. Böhmendorfer, S. Siebenhandl-Ehn et al. 2013. Wheat bran-based biorefinery 2: valorisation of products. *LWT e Journal of Food Science and Technology*.
- M. Anil, 2012. Effects of wheat bran, corn bran, rice bran and oat bran supplementation and the properties of pide. *Journal of Food Processing and Preservation*, 276-283.
- M. Schmiele, L. Z. Jaekel, S. M. C. Patricio, C. J. Steel, Y. K. Chang, 2012. Rheological properties of wheat flour and quality characteristics of pan bread as modified by partial additions of wheat bran or whole grain wheat flour. *International Journal of Food Science and Technology*, 2141-2150.
- , K. Poutanen, L. Flander, K. Katina, 2009. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology*, 693-699.
- M. Gómez, S. Jiménez, E. Ruiz, B. Oliete, 2011. Effect of extruded wheat bran on dough rheology and bread quality. *LWT e Food Science and Technology*, 2231-2237.
- H. W. Lopez, V. Krespine, C. Guy, A. Messenger, C. Demigne, C. Remesy, 2001.

- Prolonged fermentation of whole wheat sourdough reduces phytate level and increases soluble magnesium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2657-2662.
- V. Offiaha, V. Kontogiorgos, K. O. Faladea, 2019 Extrusion processing of raw food materials and by-products: A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59:18, 2979-2998.
- C. Fritsch, A. Staebler, A. Happel, M. Angel Cubero Márquez, I. Aguiló-Aguayo, M. Abadias, M. Gallur, I. Maria Cigognini, A. Montanari, M. Jose López, F. Suárez-Estrella, N. Brunton, E. Luengo, L. Sisti, M. Ferri, G. Belotti, 2017, Processing, Valorization and Application of Bio-Waste Derived Compounds from Potato, Tomato, Olive and Cereals: A Review *Sustainability*, 9, 1492.
- S. Kumar Sharma, S. Bansal, M. Mangal, A. Kumar Dixit, R. K. Gupta, A.K. Mangal, 2016, Utilization of Food Processing By-products as Dietary, Functional, and Novel Fiber: A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56:10, 1647-1661.
- R. Acquistucci, V. Melini, M. Carbonaro, Enrico Finotti, 2013, Bioactive molecules and antioxidant activity in durum wheat grains and related millstream fractions, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64:8, 959-967.
- V. Iancu, I. Aprodu, I. Banu, 2019, *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI – Food Technology*, 43(2), 21-32.
- S. Jiang, L. Li, L. Li, X. Zheng, Z. Li, X. Song 2020, The products from fermentation of wheat bran fiber by *Auricularia polytricha* strain and the effects of the products on rheological properties of dough sheet, *FoodSci Nutr.*; 8:1345–1354.
- D. Taneyo Saa, R. Di Silvestroa, L. Nissena, G. Dinellia, A. Gianottia, 2018 Effect of sourdough fermentation and baking process severity on bioactive fiber compounds in immature and ripe wheat flour bread *LWT - Food Science and Technology* 89 322–328

- M. Oshiro, R. Momoda, M. Tanaka, T. Zendo, J. Nakayama, 2019, Dense tracking of the dynamics of the microbial community and chemicals constituents in spontaneous wheat sourdough during two months of backslopping *Journal of Bioscience and Bioengineering* VOL. 128 No. 2, 170-176.
- M. Gobbettia, M. De Angelis, R. Di Cagno, M. Calasso, G. Archetti, C. Giuseppe Rizzello, 2019, Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation *International Journal of Food Microbiology* 302 103–113.
- C. I. Clarke, E. K. Arendt, 2005, A review of the application of sourdough technology to wheat breads, *Advances in food and nutrition research* vol 49 Elsevier 1043-4526.
- F. Minervini, M. De Angelis, R. Di Cagno, M. Gobbetti, 2014, Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough, *International Journal of Food Microbiology* 171 136–146.
- C.J. Zhao, A. Schieber, M. G. Gänzle, 2016, Formation of taste-active amino acids, amino acid derivatives and peptides in food fermentations – A review, *Food Research International* 89 39–47.
- G. Yazar, S. Tavman, 2012, Functional and Technological Aspects of Sourdough Fermentation with *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Food Eng Rev* 4:171–190.
- C. Axel, E. Zannini, E. K. Arendt, 2017, Mold spoilage of bread and its biopreservation: A review of current strategies for bread shelf life extension, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57:16, 3528-3542.
- K. Katinaa, E. Arendtb, K.-H. Liukkonena, K. Autioa, L. Flandera K. Poutanena, 2005, Potential of sourdough for healthier cereal products, *Trends in Food Science & Technology* 16 104–112.
- H. A. Sakandar, R. Hussain, S. Kubow, F. A. Sadiq, W. Huang, M. Imran, 2019, Sourdough bread: A contemporary cereal fermented product, *J Food Process Preserv.*

- M. Gobbetti, M. De Angelis, R. Di Cagno, A. Polo, C.G. Rizzello, 2019, The sourdough fermentation is the powerful process to exploit the potential of legumes, pseudo-cereals and milling by-products in baking industry, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-15.