

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-
ALIMENTARI

CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN

SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

TITOLO DELLA TESI

Impiego di fermentati vegetali per migliorare il profilo aromatico del pane

Tesi in

MICROBIOLOGIA AVANZATA E PREDITTIVA

Relatore:

Dott.ssa Giulia Tabanelli

Candidato:

Leonardo Iuliani

Correlatori:

Dott.ssa Chiara Montanari

Matricola N°:

981416

Dott.ssa Silvia Lorenzini

Anno Accademico 2021/22

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1. Il pane: cenni storici.....	1
1.2. Tecnologie di produzione del pane	2
1.3. Componenti aromatiche del pane	5
1.3.1. Produzione componenti aromatiche durante la lievitazione	6
1.3.2. Produzione componenti aromatiche durante la cottura.....	9
1.4. Tipi di lievitazioni	13
1.4.1. Lievito di birra.....	13
1.4.2. Lievito acido.....	14
1.4.3. Lievito misto	15
1.5. Microrganismi coinvolti	15
2. FORTIFICAZIONE E ARRICCHIMENTO	18
2.1. Fortificazione dei pani	21
3. FERMENTAZIONE DEI VEGETALI	26
3.1. Fermentazione degli alimenti.....	26
3.2. Colture starter	27
3.2.1. Requisiti nella selezione delle colture starter	29
3.3. Fermentazione di prodotti vegetali.....	30
3.4. Batteri lattici	31
3.4.1. Metabolismo dei LAB	34
3.5. Principali batteri lattici impiegati nelle fermentazioni vegetali	36
3.5.1. <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	36
3.5.2. <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	37
3.6. Lieviti	38
3.6.1. Metabolismo dei lieviti	41
3.7. Principali lieviti impiegati nelle fermentazioni vegetali	43
3.7.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
3.7.2. <i>Hanseniaspora uvarum</i>	44
3.8. Applicazioni dei fermentati vegetali	44
4. MATRICI UTILIZZATE.....	46

4.1. Mirtillo: composizione, benefici e profilo aromatico	46
4.2. Peperone: composizione, benefici e profilo aromatico	48
5. OBIETTIVI.....	50
6. MATERIALI E METODI.....	53
6.1. Preparazione dei fermentati di peperone e mirtillo	53
6.2. Preparazione dei pani	54
6.3. Analisi svolte	55
6.3.1. Analisi microbiologiche	56
6.3.2. Analisi del pH e dell'acidità titolabile	58
6.3.4. Determinazione degli acidi organici	59
6.3.5. Determinazione dei composti volatili	60
6.3.6. Test sensoriale	61
7. RISULTATI.....	62
7.1. Caratterizzazione di puree fermentate con ceppi selezionati	62
7.2. Caratterizzazione degli impasti e dei pani ottenuti con l'aggiunta delle puree.....	70
8. CONCLUSIONI.....	87
9. BIBLIOGRAFIA	90

1. INTRODUZIONE

1.1. Il pane: cenni storici

Fin dall'antichità nell'area del Mediterraneo, l'alimento cardine alla base della dieta dell'uomo è stato il pane, il quale ha sempre avuto anche un ruolo prioritario all'interno delle relazioni sociali e nelle celebrazioni religiose di molti popoli. Dal 3 ottobre 1968 è presente, il "Giorno internazionale del pane", dedicato a questo alimento inteso come simbolo principale del cibo e come difesa primaria contro la fame. Il pane è un prodotto alimentare fermentato ottenuto dalla formatura a cui segue una lievitazione, e successiva cottura in forno di un impasto di farina, di cereali e acqua. Inizialmente il processo di lievitazione era ancora sconosciuto, infatti i vari pani prodotti dai diversi popoli erano tutti non lievitati. Sembra che i primi cereali utilizzati per la panificazione siano stati il miglio e l'orzo (Palmieri, 2007). Quest'ultimo, però, contiene una ridotta quantità di glutine che comporta quindi una lievitazione limitata. Infatti, questo spiega il perché l'ostia prodotta dai cristiani avesse la forma di un dischetto piatto. Il primo popolo a porre le basi della lievitazione e della panificazione furono gli Egizi, i quali scoprirono, per caso, che un impasto di acqua e farina, dimenticato in un luogo caldo, andava incontro ad un processo di fermentazione, diventando soffice, voluminoso e acido, e dopo la cottura risultava essere fragrante e buono. I Greci, successivamente, acquisirono una grande abilità nella preparazione di pane e focacce che condividevano con olio e latte: sono stati proprio loro i primi a produrre pane aromatizzato con pepe, erbe aromatiche, miele e frutta. Sin dall'antichità, però, il pane non veniva prodotto solo ed unicamente con lo scopo di ridurre la fame, ma anche per celebrare e propiziare la fertilità dei raccolti, tant'è che ad Atene veniva celebrata una festa annuale in onore di due divinità, Demetra e Kore, durante la quale venivano preparati dei pani con sesamo e miele raffiguranti organi femminili. Successivamente la Grecia esportò la produzione di pane anche in Sicilia, che diventò il granaio principale dell'antica Grecia e, inseguito, anche dell'Impero

Romano. Furono proprio i Romani ad avere un ruolo essenziale nello sviluppo di nuove tecnologie di panificazione, in quanto sostituirono le vecchie macine in pietra, azionate da schiavi o animali con il mulino, utilizzando l'acqua corrente come forza motrice (Palmeri, 2007). Il pane è così legato alla vita dell'uomo diventandone parte integrante. L'equilibrio di ogni società si è mantenuto, per millenni, sui raccolti e sul controllo centralizzato delle farine e sulla loro equa distribuzione tra la gente. Ciò si può dedurre dal fatto che, ogni qual volta le carestie riducevano drasticamente le quantità di farina, nascevano rivolte popolari; questo è anche raccontato dallo scrittore Alessandro Manzoni nei *Promessi sposi*, dove nel 1628, ci fu la rivolta del pane attuata dai milanesi, a seguito dell'aumento del prezzo delle farine stesse provocato dalla carestia presente in quel periodo. Anche la Rivoluzione francese ebbe, tra le diverse cause, quella della carenza di pane. Un'importante rivoluzione nel settore della panificazione si ebbe durante il periodo del Rinascimento. Nel pane, che fino a quel periodo era lievitato naturalmente, venne aggiunto il lievito di birra. Questo portò alla nascita di numerose tipologie di pane, sia salati che dolci, caratterizzati dall'aggiunta di numerosi ingredienti, come olive, erbe aromatiche, uvetta, cioccolato, anice e molti altri.

1.2. Tecnologie di produzione del pane

Secondo la legislazione italiana (L.580/67, art.14; mod. DL 27.01.92 n°109 e L.146/94 art 44; DPR 502/98, art 2) è denominato pane “il prodotto ottenuto dalla cottura totale o parziale di una pasta, convenientemente lievitata, preparata con sfarinati di grano o di altri, acqua e lievito, con o senza aggiunta di sale comune (cloruro di sodio)”. Nella produzione del pane è, inoltre, consentito l'impiego di farine di cereali maltati, estratti di malto, alfa e beta amilasi ed altri enzimi naturalmente presenti negli sfarinati, paste acide essiccate, farine pregelatinizzate di frumento, glutine, amidi alimentari, zuccheri (art. 3 e 4, DPR 30 novembre 1998 n. 502).

Sul mercato sono presenti numerosi prodotti da forno che si differenziano per

metodo di cottura, tipologia di lievitazione ecc., però alcuni ingredienti possono essere considerati comuni tra le diverse tipologie di pane: farina o semola, l'acqua, sale, e lievito.

La farina è l'elemento strutturale: determina la formazione della maglia glutinica, che presenta una struttura tridimensionale dove viene intrappolato l'amido. Questa rete tridimensionale viene prodotta a seguito dei processi di impastamento, seguite dall'aggiunta di acqua e di apporto energetico. Il glutine presente nella farina conferisce all'impasto delle caratteristiche di viscosità ed elasticità, che consentono alla rete proteica di allungarsi e deformarsi sotto la pressione dei gas di fermentazione e allo stesso tempo di trattenerli, determinando un aumento del volume dell'impasto. La maglia glutinica va poi incontro ad un irrigidimento della struttura a seguito della denaturazione proteica, determinata dal processo di cottura. Questo permette il mantenimento della forma e del volume del pane. Un altro ingrediente essenziale è l'acqua, in quanto è l'elemento plasticizzante dell'impasto e determina la formazione del glutine durante l'impastamento. L'acqua, inoltre, permette l'idratazione dei granuli di amido e degli altri composti presenti all'interno dell'impasto, regola le attività enzimatiche e permette la gelatinizzazione dell'amido durante la cottura del pane. Il sale, anche se alcuni tipi di pane non lo contengono, è presente nella maggior parte dei prodotti da forno. Ha una funzione sensoriale e rafforza la struttura dell'impasto attraverso interazioni con la frazione proteica. Il lievito, agente della lievitazione, promuove conseguentemente la produzione di anidride carbonica (CO₂). Inoltre, possono essere presenti altri ingredienti minori come l'estratto di malto o farine maltate che arricchiscono l'impasto di amilasi, cioè enzimi che idrolizzano l'amido presente nell'impasto in zuccheri semplici, più facilmente utilizzabili dai lieviti: determinando così un più rapido avvio della lievitazione. Un altro ingrediente secondario, che di solito viene aggiunto, è l'acido ascorbico che favorisce la formazione di ponti di solfuro tra le proteine del glutine, conferendo una maggiore forza all'impasto (Farris et al., 2012). Dal punto di vista tecnologico, la produzione del pane

prevede una successione di operazioni volte ad aumentare il volume dell'impasto, renderlo più soffice e arricchirlo di componenti aromatiche. Le principali fasi del processo di panificazione sono di seguito riportate nella figura 1.1.



Figura 1.1: Operazioni unitarie per il processo di panificazione (Farris et al., 2012).

L'impastamento è la prima fase della panificazione, durante la quale avviene la miscelazione ed omogeneizzazione di tutti gli ingredienti, specialmente il lievito utilizzato. Inoltre, determina, la formazione di una pasta elastica e tenace, di una struttura glutinica e si ha anche l'inclusione di aria all'interno dell'impasto. Negli anni passati veniva effettuata a mano, mentre negli ultimi anni si impiegano macchine impastatrici.

La lievitazione permette la produzione di anidride carbonica da parte dei lieviti, e di conseguenza l'aumento del volume dell'impasto, ma anche la sintesi di

acidi organici e gas che modificano il profilo sensoriale del prodotto. Poi avviene anche l'acidificazione dell'impasto legata alla formazione di acido carbonico a partire dall'anidride carbonica, che va a caratterizzare il gusto del prodotto finito (Farris et al., 2012).

La formatura è l'operazione unitaria che determina la forma finale del prodotto. Infine, vi è la cottura dove l'impasto aumenta il suo volume, questo è legato all'espansione dei gas e si ha la gelatinizzazione dell'amido e quindi la definizione della struttura. La cottura è molto importante perché va a definire il profilo sensoriale del prodotto finito (Farris et al., 2012).

1.3. Componenti aromatiche del pane

Il processo di panificazione comporta la produzione di diversi composti volatili organici (volatile organic compounds – VOC) che sono responsabili del profilo sensoriale del prodotto finito. L'aroma è una proprietà molto importante in quanto svolge un ruolo chiave nell'accettazione del pane stesso da parte dei consumatori. Il sapore generale del pane è il risultato di molte interazioni tra i composti volatili e non volatili, presenti sia nella crosta, che nella mollica. La maggior parte dei composti, che caratterizzano il profilo sensoriale del pane, sono prodotti a seguito della reazione di Maillard (Poinot et al., 2008). La formazione dei composti aromatici avviene principalmente durante le fasi di lievitazione e cottura del pane.

1.3.1. Produzione componenti aromatiche durante la lievitazione

Durante la fase di lievitazione, condotta di solito a temperature intorno ai 30°C, si vanno a formare la maggior parte dei composti volatili presenti nella mollica. I disaccaridi apportati dalla farina (o aggiunti per facilitare la fermentazione) vengono convertiti in zuccheri semplici, quali glucosio e fruttosio, che a loro volta, tramite le fermentazioni condotte da lieviti e batteri lattici (LAB), vengono trasformati in CO₂ (che permette l'aumento del volume dell'impasto) ed etanolo (Prost et al., 2020). I lieviti, come *Saccharomyces cerevisiae*, sono in grado di trasformare il 95% dei glucidi fermentescibili presenti nella farina in etanolo, la maggior parte del quale evapora durante la cottura del pane, ed anidride carbonica. Il restante 5% può partecipare a reazioni di fermentazione secondaria come la glicolisi dell'acido piruvico che porta alla formazione di alcoli a catena corta, acidi grassi a catena corta, esteri e composti carbonilici (figura. 1.2).

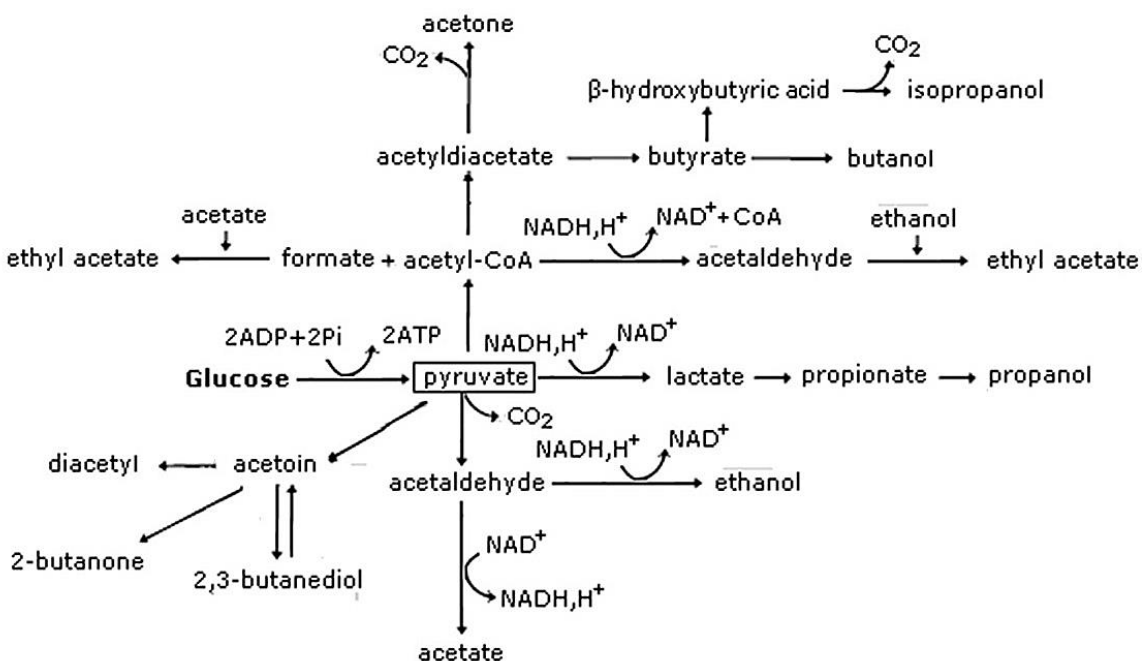


Figura 1.2: Composti volatili prodotti durante la fermentazione attraverso la glicolisi dell'acido piruvico (Pico et al., 2015)

Gli alcoli di peso molecolare maggiore sono ottenuti da un'altra reazione di fermentazione secondaria chiamata via di Ehrlich (figura 1.3)

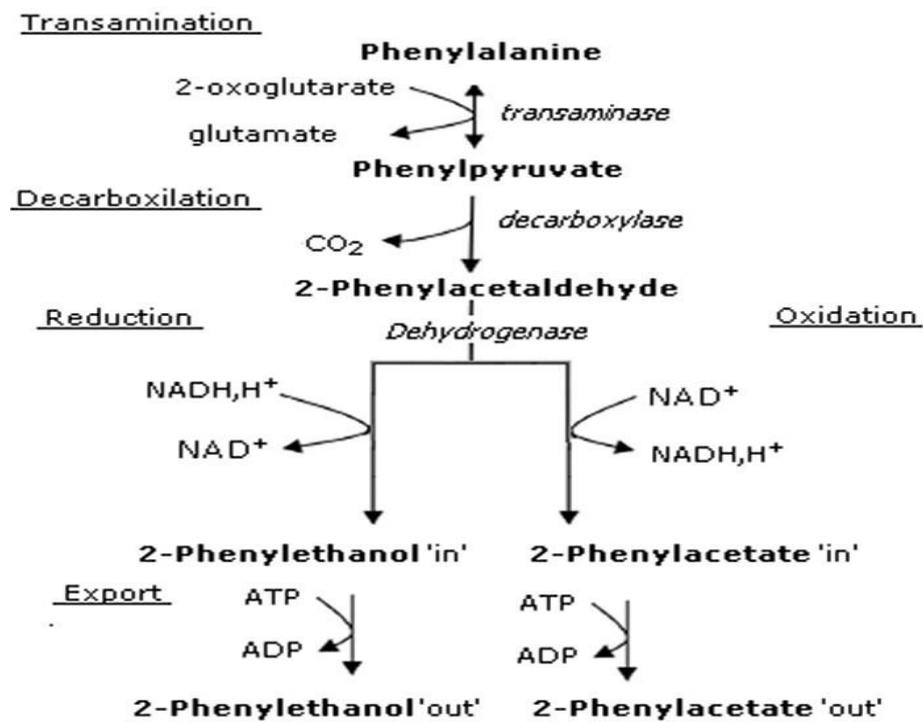


Figura 1.3: Composti volatili derivati dalla fenilalanina attraverso la via di Ehrlich durante la fermentazione (Pico et al., 2015).

I composti volatili prodotti dalle reazioni di Ehrlich nel pane sono: 3-metilbutanolo, 3-metil-1-butanolo (alcol isoamilico) e 3-metilbutanoato da leucina; 2-metilpropanolo, 2-metilpropanolo (isobutanolo) e 2-metilpropanoato da valina; 2-metilbutanale, 2-metil-1-butanolo e 2-metilbutanoato da isoleucina; 2-feniletanale, 2-feniletanolo e 2-feniletanoato da fenilalanina; e 3-(metiltio)-propanale (metionale), 3-(metiltio)-1-propanolo (metionolo) e 3-(metiltio)-propanoato da metionina (Pico et al., 2015).

La produzione di queste molecole è legata alla presenza di *S. Cerevisiae*, perché senza la sua presenza i composti di aroma maggiormente presenti erano 2,4-(E,E)-decadienale, 2-(E)-nonaenale e metionale. Mentre quando *S. Cerevisiae* viene aggiunto si vanno a creare tutte le molecole precedentemente riportate. Ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che 2,4-(E,E)-decadienale e 2-(E)-nonaenale sono prodotti di ossidazione dei lipidi (figura 1.4), mentre 3-metil-1-butanolo, 2-metil-1-butanolo, 2,3- il butandione (diacetile), il metionale e il 2-

feniletano sono prodotti di fermentazione della via di Ehrlich. Pertanto, quando non c'è aggiunta di lievito, l'ossigeno è più disponibile (la popolazione di lievito presente nella farina è piccola) e viene utilizzato dagli enzimi lipossigenasi per generare queste aldeidi dall'ossidazione dei lipidi (Frasse et al., 1993; Poinot et al., 2008). Tuttavia, con l'aggiunta di *S. cerevisiae*, i lieviti utilizzano l'ossigeno disponibile durante l'impasto per crescere, aumentandone così la popolazione. Di conseguenza aumentano anche i prodotti della loro fermentazione anaerobica, come gli alcoli della via di Ehrlich e le aldeidi, e si ha un aumento nell'impasto anche di esteri, chetoni, lattoni. Quando c'è la fermentazione diretta con aggiunta di lieviti, i composti più abbondanti nel pane finale sono gli alcoli, principalmente 3-metil-1-butanol e 2-feniletanol. La composizione volatile nella mollica del pane a lievitazione con lievito naturale è simile a quella del pane con solo lievitazione da parte di lieviti di birra. Tuttavia, la quantità è maggiore nel pane prodotto tramite lievito naturale. Il 2,3-butandione (diacetile) è uno dei composti formati sia dai LAB che dai lieviti, è maggiore negli impasti con LAB omo-fermentativi rispetto a quelli etero-fermentativi. Il suo contenuto nel pane è maggiore perché si forma anche dalla degradazione di Strecker durante la cottura (Pico et al., 2015). Successivamente gli altri fenomeni che avvengono sono da imputare all'azione degli enzimi, i quali, tramite la loro attività, dissociano gli amminoacidi in aldeidi, che a loro volta possono essere trasformati in alcoli o acidi organici, i quali vanno poi a definire l'aroma della mollica. L'attività enzimatica dipende da alcuni fattori esterni come la temperatura, l'umidità e il pH (Prost et al., 2020). Nello specifico si parla di lipossigenasi che trasformano l'acido linoleico e linolenico principalmente in esanale ed esenale. Attraverso successive reazioni vengono generate altre aldeidi come l'acetaldeide. L'ossidazione delle aldeidi porta alla formazione di acidi ed esteri (figura 1.4) e le lipossigenasi utilizzano l'ossigeno per trasformare i lipidi in aldeidi e chetoni. Quindi un basso contenuto di lieviti nel pane determina una maggiore disponibilità di ossigeno per le lipossigenasi

e di conseguenza un aumento della produzione di molecole volatili derivanti dall'ossidazione dei lipidi (Pico et al., 2015).

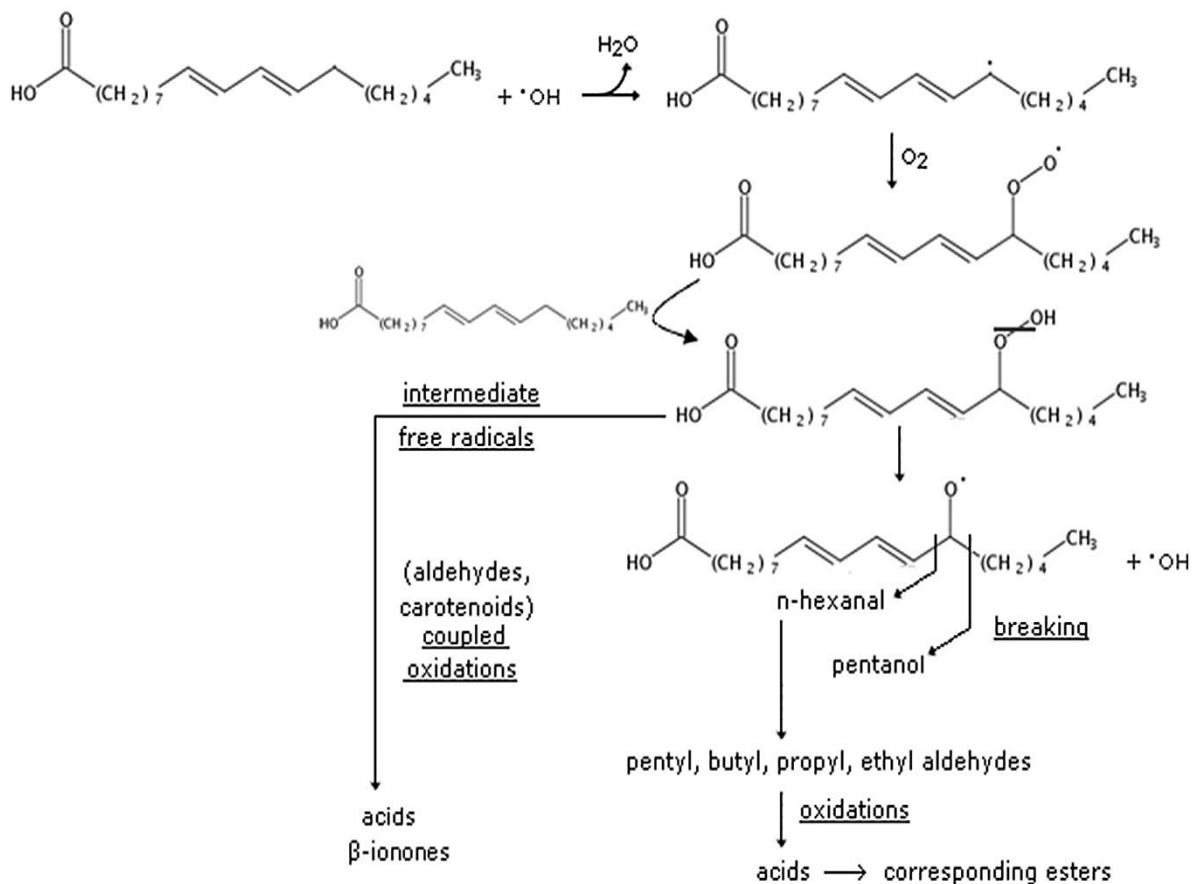


Figura 1.4: Composti volatili generati dall'ossidazione lipidica dell'acido linoleico (Pico et al., 2015).

1.3.2. Produzione componenti aromatiche durante la cottura

Una fase del processo molto importante per la definizione del profilo sensoriale del pane è la cottura. Questa determina la produzione di numerosi composti aromatici, dato che origina reazioni che coinvolgono la maggior parte dei precursori formati nelle fasi precedenti di lievitazione e maturazione. Le reazioni più importanti sono:

- Reazione di Maillard
- Caramellizzazione degli zuccheri

La reazione di Maillard è una delle principali reazioni che caratterizza il profilo sensoriale della crosta del pane, andando a produrre furani ed in elevate concentrazioni pirroline e pirazine. Si parla di una reazione di imbrunimento non enzimatico (NEB) che coinvolge amminoacidi e zuccheri, che porta alla formazione di pigmenti marroni, chiamati melanoidine, ed un gran numero di composti volatili, a seguito di trattamenti termici (figura 1.5) che vanno a caratterizzare l'aroma del pane.

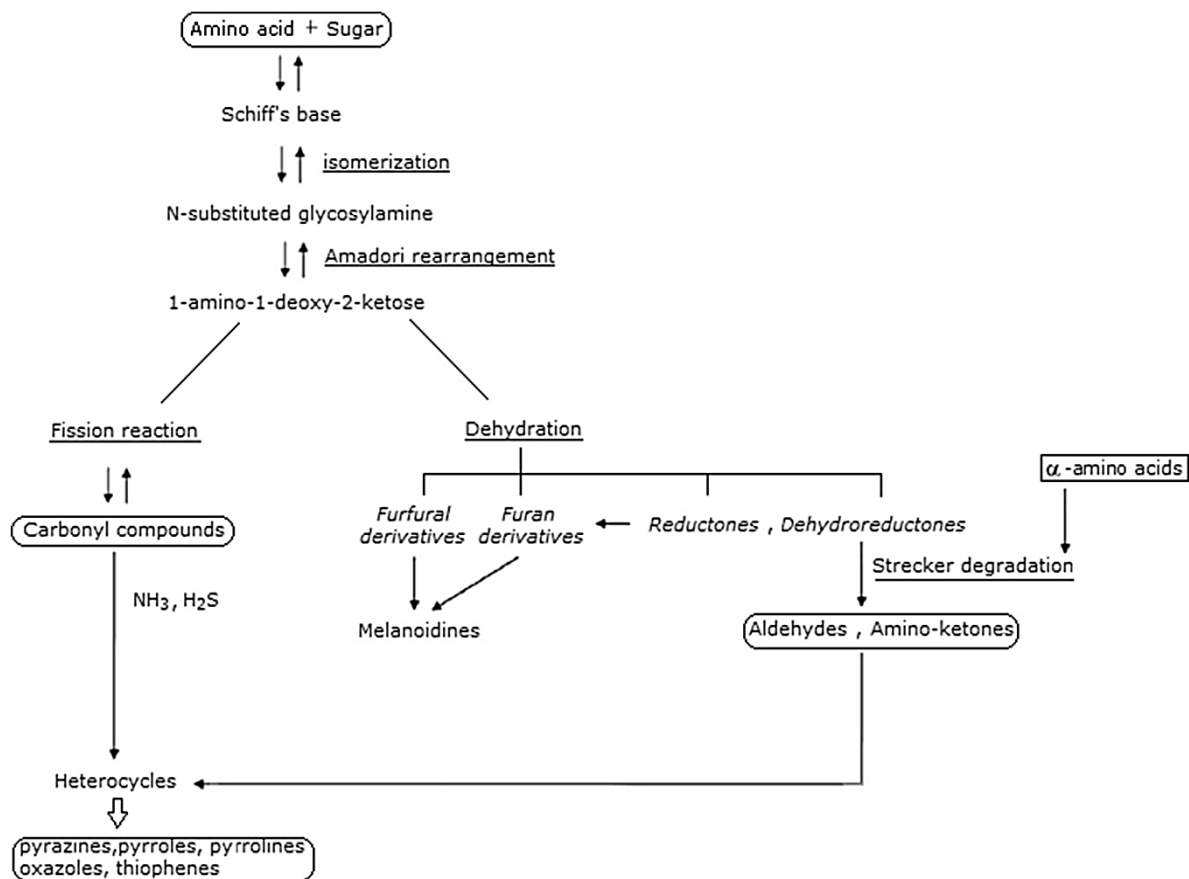


Figura 1.5: Prodotti della reazione di Maillard (Pico et al., 2015).

Inizialmente vi è la formazione delle immine secondarie, dette basi di Schiff, che si formano dalla condensazione del gruppo carbonilico (aldoso o chetoso) presente negli zuccheri e il gruppo amminico degli amminoacidi. La prima fase termina con la formazione dei composti di Amadori, che sono la base di partenza della seconda fase. Una fase molto importante della reazione di Maillard è la degradazione di Strecker dove gli amminoacidi reagiscono con i deidroriduttoni per formare aldeidi (corrispondenti all'amminoacido iniziale). Quindi il tipo di zucchero influenza la velocità di reazione, mentre il tipo di amminoacido determina il tipo di composti che si vanno a formare. Lisina, leucina e isoleucina producono aromi piacevoli, mentre quello che deriva dalla metionina è sgradevole. Per quanto riguarda gli zuccheri, lo xilosio è il più reattivo, seguito dal glucosio e dal maltosio. Tra i prodotti della reazione di Maillard, il 2-acetil-1-pirolina (AP) è considerato il composto aromatico principale della crosta del pane e conferisce un aroma di tostato. Questa molecola ha un forte impatto aromatico ed è presente anche in altri prodotti come riso, popcorn e altri alimenti di origine cereale. Può essere prodotto sia dall'amminoacido prolina (figura 1.6), che dall'ornitina (figura 1.7), derivante a sua volta dalla citrullina (Schieberle, 1990).

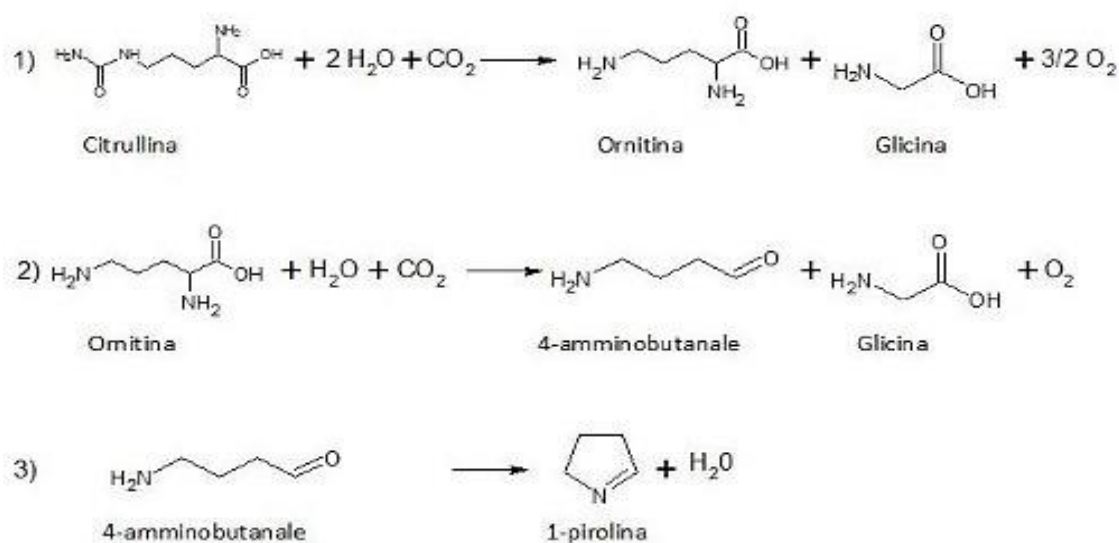


Figura 1.6: Meccanismo di formazione di AP a partire da prolina (Adams & De Kimpe, 2006).

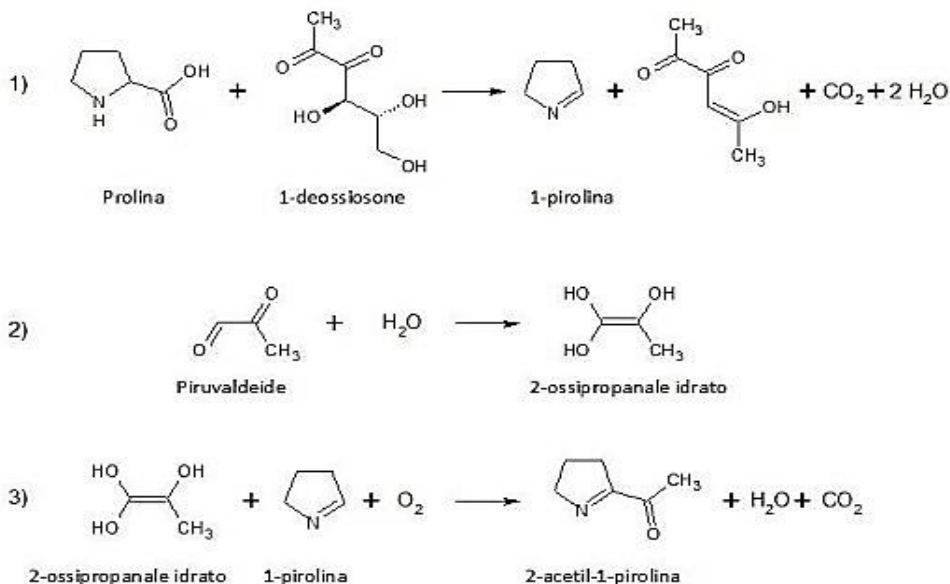


Figura 1.7: Meccanismo di formazione di AP a partire da Ornitina (Adams & De Kimpe, 2006).

Altri composti aromatici importanti sono l'acido 3-metilbutirrico, il 2-metilbutanale, il 3-metilbutanale, il metionale (tutti e quattro sono generati anche dalla via di Ehrlich), il 2,3-butandione (prodotto anche dalla fermentazione), il 4-idrossi-2,5-dimetil-3(2H)-furanone e il 2-metil-propanale (Pico et al., 2015).

Un altro processo importante nella definizione del profilo aromatico del pane è la caramellizzazione degli zuccheri. È un tipo di imbrunimento non enzimatico che avviene a temperature superiori a 100°C e coinvolge gli zuccheri aldosi e chetosi, senza la partecipazione degli amminoacidi. La reazione avviene più facilmente se lo zucchero di partenza è il fruttosio, in quanto il glucosio, essendo un aldoso, è meno reattivo (Pico et al., 2015). La caramellizzazione è desiderabile per ottenere un sapore simile al caramello, ma soprattutto per lo sviluppo del colore marrone che caratterizza la crosta del pane e di tutti i prodotti da forno in generale. Nello specifico, durante la caramellizzazione, il tipico aroma che si sviluppa è dovuto alla degradazione termica degli zuccheri, determinato dalla formazione di sostanze volatili a basso peso molecolare, mentre il caratteristico colore bruno è legato a reazioni di polimerizzazione che producono composti ad alto peso molecolare. I composti principali della frazione volatile responsabili dell'aroma sono il diacetil-2,3-butendione, esteri,

lattoni, furani (che conferiscono aroma di nocciola) e maltolo (nota tostata) (Villamiel et al., 2006).

1.4. Tipi di lievitazioni

Il pane può essere definito come un prodotto dove sono distinguibili due regioni: la crosta, caratterizzata da una maggiore croccantezza, colore più bruno e un aroma caratteristico e la mollica, caratterizzata da colore chiaro e da una struttura soffice e alveolata, nella quale è presente una fase dispersa gassosa presente negli alveoli, che viene a formarsi durante la lievitazione. Il pane può essere distinto in pane lievitato e non lievitato. Nel pane lievitato molte delle caratteristiche sensoriali dipendono dall'attività fermentativa dei microrganismi. A sua volta la produzione di pane lievitato può essere effettuata in tre diversi modi:

- Lievito di birra
- Lievito acido
- Lievito misto (lavorazione con il lievito di birra e con lievito acido).

1.4.1. Lievito di birra

Il lievito di birra, o anche definito lievito compresso, è costituito da *Saccharomyces cerevisiae* in forma solida o liquida, ed è aggiunto fino al 5%. Il pane prodotto con solo lievito di birra è caratterizzato da un processo di raffermamento (processo di retrogradazione dell'amido) più rapido, perché i batteri lattici producono una serie di composti emulsionanti (come la glicerina) che impediscono ai granuli dell'amido di perdere l'acqua assorbita, rallentando quindi la loro retrogradazione. La produzione con il lievito di birra può essere condotta tramite un metodo diretto e un indiretto. Il primo è caratterizzato da un unico impasto, mentre il secondo è caratterizzato dalla presenza di un pre-impasto. Quest'ultimo può essere di due tipi: la biga (solido) che può andare incontro ad una maturazione a temperatura ambiente, o a temperature di refrigerazione per un tempo più prolungato. L'utilizzo della biga è mirato quindi

a intensificare l'aroma e ad ottenere alveoli più grandi e irregolari. Il secondo tipo, invece, è il poolish (liquido), si addiziona lievito di birra ad un mezzo liquido dove questo sviluppa più rapidamente e di conseguenza si riduce il tempo di fermentazione. Il suo utilizzo è mirato, oltre che a diminuire i tempi di produzione, ad ottenere una maggiore croccantezza e alveoli più piccoli e regolari. Vi è una fase di maturazione o riposo a temperatura controllata che è finalizzata a consentire i processi enzimatici, guidati dagli enzimi della farina: le alfa-amilasi convertono l'amilosio e l'amilopectina in destrine; le beta-amilasi liberano maltosio dalle destrine; poi ci sono le proteasi che liberano amminoacidi dalle proteine (Farris et al., 2012).

1.4.2. Lievito acido

Il lievito acido, anche chiamato lievito madre, caratterizza la lievitazione naturale. Questo è tipico di diversi pani artigianali e alcuni pani speciali come panettone, colomba e altri. È costituito da impasto formato da farina, acqua, sale e lasciato fermentare senza l'aggiunta di microrganismi deliberatamente aggiunti dall'uomo. La fermentazione avviene ad opera di lieviti e batteri lattici endogeni della farina stessa. Sia a livello artigianale che industriale, la preparazione del lievito acido è tuttora un processo empirico, che consiste essenzialmente nell'eseguire una serie di rinfreschi, a partire da un impasto di acqua e farina lasciato poi fermentare spontaneamente. In questo modo si avrà una selezione di batteri lattici e lieviti, secondo un rapporto di 100:1 (la carica microbica è circa 1×10^9 UFC/g per i batteri e 1×10^7 UFC/g per i lieviti) (Farris

et al., 2012). I batteri lattici determinano un'acidificazione dell'impasto che caratterizza i pani prodotti tramite questa tecnica (Farris et al., 2012).

PARAMETRI	LIEVITO DI BIRRA	LIEVITO NATURALE
MICROORGANISMI	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lieviti e LAB in rapporto circa 1:100
pH	5,3-5,8	3,8-4,6
ACIDO LATTICO	0,005-0,04%	0,4-0,8%
ACIDO ACETICO	0,005-0,04%	0,1-0,4%
SHELF-LIFE	Raffermamento rapido, ammuffimento veloce	Raffermamento lento, ritardo sviluppo microbico
SENSORIALE	Alveolatura piccola e regolare, sapore non acido	Alveolatura irregolare, sapore acidulo

Tabella 1.1: Confronto pane ottenuto tramite lievito di birra e lievito naturale (Farris et al., 2012).

1.4.3. Lievito misto

La produzione di pani tramite la lievitazione mista prevede l'impiego combinato di lievito madre e starter di *S. cerevisiae*. Questa tecnica permette di velocizzare il processo di lievitazione, in quanto l'utilizzo di solo lievito madre comporta tempi di lievitazione dell'impasto maggiori. Inoltre, si impiega il lievito misto quando si ha a disposizione un lievito madre abbastanza datato, il che comporta una carica microbica, di batteri lattici, non sufficiente da permettere una lievitazione corretta (Farris et al., 2012).

1.5. Microrganismi coinvolti

Il microrganismo più importante per la produzione di pani attraverso il lievito di birra è costituito da *S. cerevisiae*, ma il suo utilizzo spazia anche per la produzione di vini e birra. È un microrganismo anaerobio facoltativo, ossia il ricavo di energia può essere ottenuto o tramite un processo aerobico o tramite un processo anaerobico. I prodotti terminali del suo metabolismo sono l'anidride carbonica e l'etanolo. L'anidride carbonica permette la lievitazione dell'impasto, la quantità di acido lattico e acetico prodotta è nettamente inferiore

rispetto a quella dei LAB, per questo il pH finale del pane prodotto tramite lievito di birra risulterà più alto, questo però comporta alcuni aspetti negativi, come il rapido ammuffimento del prodotto.

I batteri lattici rappresentano, insieme ai lieviti, i microrganismi con il maggiore numero di applicazioni nella produzione di prodotti alimentari. Sono batteri Gram-positivi, possono presentare una morfologia differente, bacilli o cocci, sono non sporigeni e catalasi negativi. Per lo più sono anaerobi, ma alcuni sono aerotolleranti. Dalla fermentazione degli zuccheri producono prevalentemente acido lattico. In funzione di questo, i LAB si distinguono in omo-fermentanti ed etero-fermentanti: i primi producono principalmente acido lattico dalla fermentazione degli esosi, gli etero-fermentanti invece, producono oltre all'acido lattico anche anidride carbonica, etanolo e acido acetico, che influenzano positivamente l'aroma ed il flavour dei prodotti (Axelsson, 2004). A differenza del lievito di birra, il lievito naturale presenta una funzione addizionale a quella lievitante, ovvero acidifica l'impasto, grazie proprio alla presenza dei LAB prevalentemente etero-fermentanti. Anche con l'utilizzo di lievito di birra si registra una lieve acidificazione, in quanto i lieviti producono attraverso vie secondarie, piccole quantità di acido lattico e acido acetico; tuttavia, i valori di pH raggiunti durante la lievitazione con le due tipologie di lievito non sono paragonabili. Le principali specie di LAB etero-fermentanti presenti sono: *Levilactobacillus brevis*, *Fructilactobacillus fructivorans* e *Limosilactobacillus fermentum*, poi ci sono anche delle specie omo-fermentanti come *Lactiplantibacillus plantarum* (Gobbetti et al., 1995). Il ruolo principale dei batteri lattici è la produzione degli acidi organici e di anidride carbonica, prodotti tramite degradazione dei glucidi. La quantità di anidride carbonica prodotta dai batteri lattici etero-fermentanti è variabile a seconda dei ceppi, comunque si tratta sempre di una quantità minore rispetto a quelle prodotte dai lieviti. I batteri lattici oltre ai glucidi semplici, degradano anche altri composti dell'impasto, come proteine, amido e acidi organici. Gli acidi principali prodotti dai batteri lattici sono acido lattico e acido acetico. La loro presenza gioca un

ruolo importante durante le fasi evolutive dell'impasto. L'acidità condiziona lo sviluppo microbico e l'attività dei sistemi enzimatici della farina, questo determina la maggiore shelf-life dei pani prodotti tramite lievito acido. Un fattore importante è il rapporto tra acido lattico e acido acetico, il quale non deve discostarsi troppo dal valore ottimale di 3:1. Questo perché i due acidi hanno un effetto diverso sulla maglia glutinica: l'acido lattico la rende più elastica; quindi, capace di aumentare il volume durante la produzione di anidride carbonica senza rompersi; mentre l'acido acetico rende le maglie del glutine più rigide. Poi ci sono altri acidi organici che vengono prodotti dai batteri lattici, ma presenti in concentrazioni inferiori (es. acido propionico, butirrico, isobutirrico, valerico) ma che sono comunque importanti per l'aroma del prodotto (Bianco & Marucchi, 1991).

2. FORTIFICAZIONE E ARRICCHIMENTO

Il continuo aumento della popolazione mondiale e la modernizzazione delle richieste dei consumatori hanno determinato il bisogno di creare nuove tipologie di prodotti alimentari, maggiormente convenienti, pronti per il consumo, sicuri e sempre più accessibili. Questo ha portato alla nascita di numerosi alimenti basati su un gusto accattivante, come quello degli snack pronti, preparati con l'aggiunta di uno o più aromi sintetici, esaltatori di sapidità, grassi ecc. Inoltre, l'accettabilità del prodotto può essere migliorata sottoponendolo ad ulteriori trattamenti di lavorazione, creando così degli alimenti "ultra-processati". Questi, però, hanno un effetto negativo sul valore nutrizionale del prodotto e insieme ad altri fattori, come uno stile di vita sedentario e una dieta squilibrata, possono aumentare il rischio di malattie croniche. Questa relazione tra cibo e salute umana ha attirato l'attenzione di numerosi nutrizionisti, tecnologi alimentari, governi e dei consumatori stessi, tant'è che negli ultimi anni si è osservato un cambiamento di tendenza, andando a produrre sempre più alimenti salutari e alimenti funzionali (cioè alimenti ricchi di molecole con proprietà benefiche per l'organismo e che presentano un'azione preventiva sulla salute). Inoltre, alcuni di questi presentano una relazione positiva tra la loro assunzione e il rischio di malattie croniche come il cancro, malattie cardiovascolari, diabete e disturbi gastrointestinali (Saleh et al., 2019). Per questo negli ultimi anni si è alla ricerca di nuove strategie per il potenziamento di micronutrienti, composti bioattivi ecc. Sono state anche sviluppate numerose tecnologie di lavorazione, tramite fermentazione e trattamenti enzimatici per migliorare la bioaccessibilità e la biodisponibilità dei nutrienti e composti bioattivi degli alimenti. Negli ultimi anni si è cercato anche di produrre prodotti arricchiti e fortificati per andare a fronteggiare la malnutrizione nei paesi sottosviluppati. I prodotti fortificati sono alimenti in cui vengono aggiunti dei composti, con un effetto benefico sulla salute, inizialmente non presenti nell'alimento originale, mentre l'arricchimento

consiste nell'aggiungere ad un alimento i nutrienti persi durante il processo produttivo. Un esempio di fortificazione è il "Golden Rice", una varietà di riso prodotta attraverso una modificazione genetica che ha permesso di introdurre la via di biosintesi del precursore beta-carotene della vitamina A. Questo alimento era destinato per i paesi sottosviluppati come India, Africa e le regioni povere della Cina, dove la carenza di vitamina A nella popolazione ha portato a numerose problematiche per la salute in particolare, la deficienza di vitamina A è responsabile di circa 2 milioni di morti all'anno e 500.000 casi di cecità irreversibile (Beyer, 2010). Frutta e verdura sono alimenti ricchi di composti bioattivi come acidi fenolici, flavonoidi, antociani, carotenoidi e vitamine, che possono quindi essere aggiunti all'interno dei prodotti alimentari ad integrazione di questi composti. Possono essere utilizzati a tal scopo una serie di sottoprodotti di frutta e verdura come ad esempio bucce, residui di polpa, semi e noccioli, che presentano un valore di composti bioattivi simile, e in certi casi anche superiore, alle sostanze fitochimiche e alla fibra alimentare. Pertanto, la loro aggiunta all'interno di alcuni alimenti può aiutare a raggiungere l'assunzione raccomandata delle sostanze prima citate. Di solito, prodotti come le mele non destinate alla vendita diretta, perché presentano difetti o perché cadute dall'albero a seguito di disastri meteorologici, vengono macinati, trattati e successivamente utilizzati come ingrediente all'interno di biscotti arricchiti di fibre. Altri esempi possono essere le polveri di zucca, ricche in carotenoidi, pectina, composti fenolici e terpenoidi, che vengono aggiunte nella preparazione di estrusi pronti per il consumo. Risultano essere interessanti, in questo settore, i sottoprodotti della lavorazione del pomodoro, quali buccia e semi, che contengono diversi composti bioattivi, come l'acido ascorbico, beta-carotene, licopene, fenoli e minerali. Queste sostanze fitochimiche presentano un elevato potere antiossidante e inoltre, possono concorrere nella prevenzione di alcune malattie associate allo stress ossidativo. L'estratto di tè verde contiene numerosi composti polifenolici, principalmente le catechine, con proprietà antiossidanti. Pertanto, questi estratti possono essere utilizzati negli alimenti ad

alto contenuto lipidico per ritardare l'ossidazione dei lipidi e per migliorare la shelf-life di vari prodotti alimentari (Saleh et al., 2019). Il meccanismo di azione dei polifenoli, e in generale degli antiossidanti, si basa sulla prevenzione della formazione dei radicali liberi all'interno dell'organismo e di conseguenza la diminuzione del livello di stress ossidativo. Alimenti che presentano sia un alto contenuto di polifenoli sia di fibre (capacità di ridurre le assunzioni di carboidrati semplici e grassi) sono le verdure, di conseguenza alimenti fortificati con quest'ultime non solo avranno il vantaggio di fornire proprietà bioattive, ma aiuteranno anche a ridurre l'apporto calorico nelle diete ipercaloriche (Alashi et al., 2019). Inoltre, i polifenoli sono in grado di chelare gli ioni metallici. Quest'ultimi, in piccole quantità, sono molto importanti nella nostra dieta, per la normale funzione fisiologica dell'organismo; tuttavia, la loro elevata quantità può determinare un'accelerazione dell'ossidazione lipidica. Pertanto, l'aggiunta di verdure negli alimenti fortificati comporta un aumento dell'attività chelante nei confronti degli ioni metallici (Alashi et al., 2019).

2.1. Fortificazione dei pani

Il pane è un prodotto consumato in tutto il mondo e presenta dei prezzi accessibili. Il suo processo di produzione è relativamente economico e ben noto, e non è difficile da implementare. Inoltre, presenta un buon sapore che gli consente una grande possibilità di variazione, tale da garantire un'ampia accettazione da parte del consumatore (Betoret & Rosell, 2020).

Ingredient	Form of addition	Quantity	Results of selected ingredients in enriched breads	Reference
Kinako (new soybean), chia	Kinako flour and chia seed	10% and 2%	Polyunsaturated fatty acids (mg/100 g total lipids): <ul style="list-style-type: none"> Wheat bread: 54.59 Enriched bread: 57.77 	Giaretta, Lima, and Carpes (2018)
Flaxseed and lupine	Flour	88% wheat 10% lupine grit 2% flaxseed expeller	Total polyphenols (GAE/100 g dm): <ul style="list-style-type: none"> Wheat bread: 53.5 Enriched bread: 89.3 	Wandersleben et al. (2018)
Lentils and carob	Carob seed and green lentil flour	5%–6%, 10%–12%, 24%	Total polyphenols (mg/100 g): <ul style="list-style-type: none"> Wheat bread: 471.2 Enriched bread with carob: 371.5–487.7 Enriched bread with raw carob: 505.6–653.1 Enriched bread with germ carob: 457.2–645.8 Enriched bread with lentils: 773.5–1,212.2 	Turfani et al. (2017)
Faba bean	Flour	30% faba bean flour or sourdough	Protein efficiency ratio: <ul style="list-style-type: none"> Wheat bread: 18.5 Enriched bread with faba bean: 24.7 Enriched bread with faba sourdough: 26.8 	Coda et al. (2017)
Quinoa Buckwheat Rice	Flour	12.5%, 25%, 37.5%, 50%	Protein content (g/100 g dm): <ul style="list-style-type: none"> Control bread: 7.6 Enriched breads: 7.81–8.18 	Turkut, Cakmat, Kumcuogly, and Tavman (2016)
Lupine	Flour	10% lupine	Protein content (g/100 g):	Lopez and Goldner (2015)
Buckwheat	Wholegrain buckwheat flour	50%	Increase in wheat bread and enriched bread: <ul style="list-style-type: none"> Total phenolic content: 3.33–143 mg GAE/100 g dm Rutin and quercetin: nd–7.73 mg/100 g dm Antioxidant activity: 25.2–3.23 IC50 mg/ml 	Stokic et al. (2015)
Buckwheat	Flour	10%, 20%, 30%	Total phenolic content (mg/kg dw): <ul style="list-style-type: none"> Wheat bread: 613.6 Enriched bread: 817.3–1,199 Antioxidant activity DPPH ($\mu\text{mol Trolox equivalent}/100 \text{ g dw}$): <ul style="list-style-type: none"> Wheat bread: 1,312.1 Enriched bread: 2,227–4,349 Antioxidant activity ABTS ($\mu\text{mol Trolox equivalent}/100 \text{ g dw}$): <ul style="list-style-type: none"> Wheat bread: 999 Enriched bread: 1,837–4,189 	Verardo et al. (2018)
Folate	Swiss chard and spinach fresh vegetable	20–40 g/100 g	Folate content ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$): <ul style="list-style-type: none"> White bread: 19.90 Swiss chard enriched bread: 36.17–57.87 Spinach enriched bread: 47.47–53.53 Whole grain bread: 37.35 Swiss chard enriched bread: 31.10–75.47 Spinach enriched bread: 33.05–49.52 	López-Nicolás et al. (2014)
Flaxseed	Flour	5%–10%–15% flaxseed	Protein content (g/100 g): <ul style="list-style-type: none"> Wheat bread: 10.55 Enriched bread: 12.01–21.61 	Marpalle, Sonawane, and Arya (2014)

Tabella 2.1: Fortificazione del pane con diversi composti (Betoret & Rosell, 2020).

Per questo il pane costituisce uno degli alimenti principali nel quale si può effettuare un processo di fortificazione di nutrienti, attraverso l'utilizzo di vegetali. Inizialmente la fortificazione si è concentrata sui composti specifici, soprattutto di vitamine e minerali, andando a utilizzare per lo più legumi o altri vegetali simili. Questo per andare incontro a determinate esigenze di alcune fasce di popolazione che presentavano, o presentano alcune problematiche. Un esempio può essere la fortificazione di prodotti a base di cereali con acido folico, questi prodotti sono destinati alle donne in gravidanza, per migliorare l'assunzione di folati, utili a ridurre il rischio di problematiche che possono insorgere durante la gestazione (Rader et al., 2000). Ultimamente invece, si sta cercando di produrre numerosi alimenti (comuni nella dieta delle persone) fortificati, che non sono destinati a fasce specifiche della popolazione, ma bensì ideate per tutta la popolazione in generale, al fine di migliorare e preservare lo stato di salute. Negli ultimi anni c'è stato un aumento della tendenza a incorporare frutta e verdura nel pane, tra la frutta più utilizzata si distinguono gli agrumi e le bacche, proprio perché presentano un alto contenuto di acido ascorbico, flavonoidi e antociani, mentre per la fortificazione vegetale si utilizzano per lo più alghe, per il loro profilo di acidi grassi, zucca e peperoni,

per l'alto contenuto di carotenoidi, ma anche spinaci e bietola per la presenza di acido folico e fibre (Betoret & Rosell, 2020).

Ingredient	Form of addition	Quantity	Final product	Determinations	Reference
Pear and navel	Fresh fruit not peeled	200 g of fruit + 500 g of water + 40 g sugar—300 g of liquid with 300 g of flour to form the sourdough	White pan breads	Sourdough: ph, acidity, leavening properties, LAB and yeast identification Bread: volume, texture, free amino acid content	Yu, Wang, Qian, Zhang, and Qi (2018)
Quercetin	Powder	0, 0.05%, 0.10%, and 0.20%	Bread	Specific volume, texture, color, moisture content, and pH HPLC quercetin ABTS, DPPH, total phenolic content, antiglycation capacity	Lin and Zhou (2018)
Apricot kernels	Flour	4%, 8%, 12%, 24%	Wheat bread	Bread composition, hydration and textural properties, color and consumer acceptance	Dhen, Rejeb, Boukhris, Damergi, and Gargouri (2018)
Grapefruit	Fresh segments Dried segments	0, 10%, 20%, 30% 0, 2.5%, 5%, 7.5%	White bread Brown bread	Sensory evaluation Estimation of sugars Estimation of reducing sugars Total phenolic content Estimation of carotenoids Estimation of flavonoids Naringin content Total starch Resistant starch Predicted glycemic index	Reshmi et al. (2017)
Baobab fruit, green tea, grape seed, resveratrol	Extract	0.2%–3.75%	White bread and enriched bread	In vitro digestion Release of reducing sugars In vivo study Test meals Glycemic response Insulin response Satiety	Coe and Ryan (2018)
Banana peels	Powder	5%–10%	Wheat flat bread and enriched bread	Physicochemical, composition, minerals, water-holding capacity, oil-holding capacity, sensory evaluation	Eshak (2016)
Sea-buckthorn (<i>Hippophae rhamnoides</i> L.) Elderberry (<i>Sambucus nigra</i> L.) Hawthorn (<i>Crataegus</i> L.) Rowan (<i>Sorbus aucuparia</i> L.)	Freeze-dried fruits	5%	Wheat bread	Dry matter, protein, fat, ash Total dietary fiber Starch digestibility Total polyphenols ABTS FRAP	Borczak et al. (2016)
Guava	Flour	10%–20%	Wheat bread	Free and bound phenolic compounds in wheat and guava flours Bread crust melanoidins Antioxidant activity	Alves and Perrone (2015)

Tabella 2.2: Fortificazione del pane tramite frutta (Betoret & Rosell, 2020).

Questi pani fortificati possono essere quindi considerati dei possibili alimenti funzionali. Fortificare il pane con frutta e verdura significa incorporare un gran numero di composti bioattivi che possono migliorare direttamente le proprietà funzionali del pane stesso. Inoltre, il consumo di alimenti che presentano un determinato composto bioattivo può fornire maggiori benefici rispetto al consumo di uno specifico composto bioattivo assunto singolarmente, questo sia

per quanto riguarda la percentuale di assunzione del nostro corpo, ma anche perché molti composti risultano più efficaci quando vengono assunti insieme ad altri. Ad esempio, l'esperidina risulta più efficace quando è somministrata in combinazione con la vitamina C (Betoret & Rosell, 2020). Inoltre, la combinazione di tutti i composti bioattivi presenti in frutta e verdura è responsabile della loro elevata attività antiossidante. Vanno considerati però tutti gli aspetti meccanici, biochimici e i vincoli termici del processo di panificazione per determinare la quantità di composto bioattivo presente nel prodotto finito. La degradazione o la trasformazione di un composto bioattivo durante il processo di panificazione può essere influenzato da diversi parametri: la fonte di origine, la quantità di acqua aggiunta, la quantità di aria incorporata durante la miscelazione e impastamento, la diminuzione del pH durante la fermentazione e soprattutto l'aumento di temperatura durante la cottura (Betoret & Rosell, 2020). Un altro parametro che può essere determinante è la tipologia di matrice vegetale che viene aggiunta nell'impasto, Danza et al. 2014 hanno dimostrato che l'aggiunta del peperone giallo disidratato sotto forma di polvere non determina una perdita significativa sul contenuto di carotenoidi (zeaxantina, capsantina, luteina e β -carotene) nel pane. Reshmi et al., 2017 hanno invece studiato la fortificazione del pane bianco e nero con spicchi di pomelo secchi e freschi, trovando una migliore ritenzione di flavonoidi con l'aggiunta di spicchi secchi. Questa elevata capacità delle matrici disidratate di mantenere inalterata, o quasi, la presenza di composti bioattivi potrebbe essere spiegata dalla loro minore interazione con l'ossigeno, a causa della loro struttura più dura e rigida. Tuttavia, sono necessarie ulteriori ricerche e studi per confermare l'impatto della forma dell'ingrediente nella ritenzione dei composti bioattivi (Betoret & Rosell, 2020). Inoltre, un altro fattore molto importante da considerare è il processo termico finale. La cottura del pane influisce sulla concentrazione di questi composti bioattivi, che vengono aggiunti nel pane tramite l'utilizzo di frutta e verdura, andandola a ridurre. Tuttavia, l'aggiunta di una quantità elevata di composti antiossidanti comporta, anche a seguito della

cottura, una quantità maggiore di tali composti bioattivi nel pane fortificato rispetto al pane tal quale. In ogni caso, tutti i composti bioattivi presentano una loro stabilità termica differente che ne determina la loro concentrazione nel prodotto finito (Betoret & Rosell, 2020).

3. FERMENTAZIONE DEI VEGETALI

3.1. Fermentazione degli alimenti

La fermentazione è uno dei metodi più antichi e sostenibili di conservazione e preparazione degli alimenti, conferendo una varietà di attributi sensoriali, come sapori, consistenze e valori nutrizionali. La fermentazione è il processo di trasformazione di substrati organici, come proteine, carboidrati, lipidi o altre tipologie di materiale organico, attraverso l'azione di diversi enzimi prodotti da diversi microrganismi. Tramite questi processi i microrganismi riescono a ricavare energia, che in parte viene immagazzinata come ATP (adenosina trifosfato) senza il coinvolgimento di un agente ossidante esogeno (come l'ossigeno); tuttavia la resa energetica delle fermentazioni è molto inferiore rispetto all'ossidazione aerobica dello stesso substrato (Di Cristo et al., 2019). Le funzioni della fermentazione negli alimenti sono molteplici:

- Conservazione e miglioramento della sicurezza: la conservabilità e la sicurezza del prodotto sono legati alla presenza dei microrganismi, che grazie al loro processo fermentativo producono diverse sostanze (come acidi organici, etanolo, diacetile e batteriocine), tra queste ci sono alcune con proprietà antimicrobiche nei confronti di microrganismi degradativi e patogeni. Alcuni microrganismi sono in grado anche di degradare composti tossici, come le micotossine.
- Miglioramento del valore nutrizionale: questa capacità di alcuni microrganismi è legata alla sintesi di amminoacidi essenziali e vitamine (importanti per l'alimentazione umana), che si ritrovano all'interno dell'alimento.
- Aumento della digeribilità: alcuni microrganismi sono caratterizzati da attività proteasica e peptidasica, grazie alla produzione di enzimi specifici. Questi enzimi vanno a scindere alcune macromolecole, producendo molecole di dimensioni ridotte, rendendo l'alimento più digeribile

- Definizione del profilo sensoriale: alcuni microrganismi presenti all'interno dell'alimento, durante la loro attività fermentativa, producono alcune sostanze volatili e non, che definiscono la qualità organolettica del prodotto finito.

La caratterizzazione della materia prima è importante per la selezione dei microrganismi fermentativi. I fattori che influenzano la loro selezione sono il pH, il rapporto carbonio/azoto (C/N), la concentrazione di zucchero e sale, la presenza di antimicrobici e i fattori ambientali. Ad esempio, nei vegetali il rapporto C/N è sbilanciato dalla parte del carbonio per la presenza di elevate quantità di zuccheri, quindi la fermentazione spontanea è legata principalmente ai lieviti, i batteri lattici sono molto più esigenti dal punto di vista nutrizionale e necessitano di peptidi e amminoacidi, mentre i lieviti sono in grado di sintetizzare gli amminoacidi a partire dall'azoto inorganico (Zambonelli et al., 2001). La fermentazione spontanea consiste nell'avviare il processo fermentativo senza aggiungere starter o colture iniziali, ma andando a sfruttare esclusivamente i microrganismi endogeni e i substrati fermentescibili presenti. Questo tipo di fermentazione però, non è facilmente controllabile, e di conseguenza può essere responsabile della formazione di off-odour e off-flavour, ovvero di composti con un impatto aromatico indesiderato che possono inoltre, generare alterazioni e difetti organolettici nel prodotto finito. Inoltre, la fermentazione spontanea non permette una standardizzazione e un controllo sulla produzione degli alimenti. In aggiunta, i cambiamenti della temperatura e di altri fattori ambientali (come degli ambienti di lavoro non idonei) possono modificare le specie predominanti e di conseguenza portare a delle alterazioni delle attività di crescita, e possibili fermentazioni pericolose (Moschetti et al., 2013).

3.2. Colture starter

Nell'industria alimentare moderna è pratica comune utilizzare colture starter selezionate impiegate allo scopo di avviare un processo fermentativo e

assicurarne un esito tecnologico positivo. L'impiego quindi di colture starter selezionate permette di avviare velocemente il processo di trasformazione, rendere i tempi compatibili con i cicli produttivi aziendali e standardizzare il processo produttivo, il quale porta all'ottenimento di prodotti con specifici attributi organolettici, nutrizionali e funzionali. Le colture starter possono essere suddivise in due diverse categorie: colture naturali e colture selezionate o industriali. Le prime sono composte da una popolazione microbica complessa ed eterogenea formata da generi, specie e ceppi differenti. Queste colture rispecchiano le caratteristiche ambientali delle zone da cui vengono isolate, sono difficilmente ripetibili in un altro luogo. Presentano però un limite, in quanto non permettono di raggiungere traguardi produttivi sicuri, costanti, prevedibili e riproducibili, per questo è molto diffuso l'utilizzo di colture starter selezionate. Queste ultime sono caratterizzate, invece, dalla presenza di poche specie e ceppi e vengono preparate in laboratorio. I microrganismi di queste colture sono generalmente isolati a partire dalle colture naturali, vengono selezionati sulla base di proprietà tecnologiche; ad esempio, scegliendo quei microrganismi che hanno una capacità fermentativa elevata, che producono molecole importanti per la definizione del profilo sensoriale ecc. In commercio sono presenti in diverse forme: liquida, congelata e liofilizzata. La preparazione di queste colture avviene presso delle industrie specializzate, le quali operano alla:

- selezione dei ceppi;
- scelta del substrato e delle condizioni di sviluppo;
- separazione della biomassa;
- sospensione in substrati con crioprotettori (come il glicerolo);
- congelamento o liofilizzazione.

Gli starter selezionati vengono mantenuti in condizioni ottimali di crescita e per questo, rispetto alle colture naturali, possono mostrare una minore capacità di adattamento a diverse condizioni operative. Questo può essere anche legato alla

presenza nel substrato di inibitori naturali, lisozima, residui di antibiotici ecc. (Farris et al., 2012).

3.2.1. Requisiti nella selezione delle colture starter

I requisiti da considerare nella selezione dei ceppi da utilizzare come starter si possono suddividere in tre gruppi:

- A) Criteri di biosicurezza: le colture devono essere valutate sicure dall'EFSA. Devono essere considerate come GRAS (Generally Recognized as Safe), non devono quindi contenere microrganismi patogeni e non vi deve essere la produzione di metaboliti tossici, mutageni o carcinogenici per la salute del consumatore (ad esempio ammine biogene). Inoltre, non devono veicolare contaminanti microbici o pericolosi e non devono trasmettere caratteri di antibiotico resistenza.
- B) Criteri tecnologici: la questione che il microrganismo sia sicuro non implica il fatto che possiede le caratteristiche tecnologiche richieste. Attualmente la tendenza è quella di selezionare starter fatti "su misura" dall'azienda considerata e in funzione del prodotto che si vuol ottenere, in quanto la selezione dei giusti starter può costituire uno strumento di miglioramento della qualità del prodotto, di incremento delle proprietà nutritive dello stesso o più in generale permettere una distinzione dai competitor del medesimo settore. Per questa ragione, la coltura starter utilizzata deve sopravvivere alle condizioni di processo e non solo, ma deve esplicare le specifiche attività richieste. Un requisito molto importante, inoltre è la resistenza al passaggio di scala, ovvero quando una produzione passa dall'artigianalità alla produzione industriale, la coltura starter non deve perdere le proprie peculiarità.

C) Criteri di convenienza: le colture starter selezionate devono essere in grado di svilupparsi facilmente in un substrato economico; infatti, le nuove tendenze si orientano verso il riutilizzo dei sottoprodotti per la produzione di biomasse microbiche. Inoltre, devono essere facilmente separabili dal substrato di produzione e semplici sia da impiegare che da conservare (Farris et al., 2012).

Tipologia di coltura	Vantaggi	Svantaggi
Colture miste naturali o artigianali	Semplici da preparare; economiche. Hanno uno stretto rapporto con la tipicità del prodotto. Insensibili ai fagi.	Scarsa riproducibilità delle performance tecnologiche. Difficoltà di controllo e miglioramento. Mancata standardizzazione del processo e del prodotto
Colture miste selezionate a composizione non definita	Maggiore riproducibilità delle performance tecnologiche rispetto alle colture miste naturali. Scarsa sensibilità ai fagi se moltiplicate in condizioni non sterili.	Possibilità di fluttuazioni nelle performance tecnologiche in seguito a variazioni nella composizione. Dipendenza da fornitori esterni.
Colture miste a composizione definita	Estrema riproducibilità delle performance tecnologiche. Semplicità di controllo delle performance tecnologiche e dei problemi relativi alle infezioni fagiche	Maggiori costi rispetto alle colture miste. Dipendenza da fornitori esterni. Maggiore sensibilità alle infezioni fagiche e necessità di maggiori controlli in fase di riproduzione.

Tabella 3.1: Differenze tra colture starter selezionate e colture naturali (Farris et al., 2012)

3.3. Fermentazione di prodotti vegetali

Gli alimenti fermentati a base vegetale hanno un elevato valore nutrizionale e funzionale, e già di per sé sono fonte di nutrienti, come vitamine, minerali, fibre prebiotiche, acidi fenolici, flavonoidi, fitoestrogeni e peptidi bioattivi; inoltre, rappresentano un'alternativa naturale per evitare lo spreco di frutta e verdura, poiché sono matrici con un alto grado di deperibilità. La fermentazione può contribuire a migliorare la biodisponibilità di tutti i nutrienti presenti e le caratteristiche sensoriali di frutta e verdura. Esse presentano una popolazione microbica la cui composizione dipende dalle caratteristiche di ciascuna matrice vegetale e dalla loro provenienza geografica. La microflora è costituita

principalmente da batteri lattici e lieviti che, di solito, sono responsabili della fermentazione spontanea dei vegetali, contribuendo alla loro stabilità e conservabilità. Molti di questi microrganismi autoctoni sono stati isolati e utilizzati come starter per la produzione di vegetali fermentati e permettono di avere una maggiore efficienza durante il processo di produzione e migliori proprietà funzionali. Nella maggior parte dei casi, i microrganismi autoctoni hanno proprietà probiotiche, e consentono quindi di trasformare il prodotto fermentato in alimento funzionale (Torres et al., 2020).

Torres et al., 2020 hanno dimostrato che alcuni prodotti vegetali come carote, fagiolini e zucchine, dopo processi di fermentazione, presentavano una concentrazione significativamente più alta di vitamina C, composti fenolici e betalaine, con un conseguente miglioramento dell'attività antiossidante e miglioramento nella tolleranza allo stress ossidativo nel tempo. Sempre su questi vegetali si è notato inoltre, un incremento della concentrazione di glucosinolati antitumorali. Diversi vegetali e frutta fermentati hanno mostrato un potenziale per il miglioramento o la protezione dall'obesità. Protezione legata principalmente agli effetti ipoglicemizzanti e ipolipemizzanti riportati negli alimenti vegetali fermentati (Torres et al., 2020)

3.4. Batteri lattici

I LAB sono un gruppo di microrganismi piuttosto omogeneo sotto il profilo fisiologico, in relazione all'attività fermentativa, al comportamento verso l'ossigeno e per le esigenze nutritive. Proprio per tale motivo in passato venivano designati in una sola famiglia, le *Lactobacillaceae*, anche se si diversificavano a livello microbiologico. Infatti, i LAB possono avere sia una forma allungata (bastoncellare) che sferica (coccica). Sono batteri Gram-positivi, catalasi negativi (eccetto alcune specie del genere *Pediococcus*) asporigeni, non mobili, non patogeni e non tossigeni. Inoltre, sono microaerofili ed acido tolleranti, talvolta acidofili. Presentano esigenze nutrizionali complesse, in quanto necessitano per lo sviluppo aminoacidi, vitamine e altri

nutrienti. Sono tra i microrganismi più presenti all'interno di preparazioni alimentari fermentate e non. Trovano largo impiego sia nella produzione di vegetali fermentati, sia nella produzione di derivati del latte, carne, prodotti da forno ecc., contribuendo in vari modi nel determinare le loro caratteristiche e la loro stabilità. Storicamente il loro utilizzo risale a molti anni fa, dove già si producevano prodotti basati sulla loro attività fermentativa. Questi processi di trasformazione furono molto probabilmente scoperti per caso ed erano praticati senza conoscere le basi fermentative. Però tramite metodi empirici, inconsapevolmente si sono create le condizioni in grado di selezionare i microrganismi utili, mentre altri sono stati inibiti. Dopo millenni di empirismo di conservazione di alimenti, si arrivò al 1878 dove avvenne il primo isolamento in coltura pura da parte di Lister, che andò a identificare l'attuale *Lactococcus lactis*. Successivamente nel 1890 ci fu il primo utilizzo della coltura starter per la produzione di formaggi, dando il via all'industrializzazione delle fermentazioni alimentari. Oggi le funzioni dei LAB sono molteplici, si effettua una distinzione anche tra colture starter e colture protettive, anche se in realtà potrebbe trattarsi della stessa coltura applicata per scopi diversi in condizioni diverse (Farris et al., 2012). Per le colture starter le attività metaboliche di interesse tecnologico (capacità acidificante, proteolisi, aromatizzanti ecc.) hanno un'importanza principale, mentre per le colture protettive svolgono un ruolo primario le azioni antimicrobiche. La prima classificazione accettata dei batteri lattici risale al 1919 e venne definita dal chimico batteriologo danese Orla Jensen, il quale li suddivise in base alla morfologia cellulare, al comportamento verso la temperatura e ai prodotti di fermentazione. Attualmente i principali generi di batteri lattici sono:

- Batteri lattici ascrivibili al genere *Lactobacillus*, ma recentemente riclassificati in 23 generi che presentano però caratteristiche comuni: sono batteri di forma bastoncellare, di dimensioni molto variabili e sono Gram positivi. Dal punto di vista nutritivo presentano esigenze complesse (hanno bisogno di elevate quantità di carboidrati, proteine e vitamine),

però riescono a crescere in diversi habitat con bassa tensione di ossigeno. Presentano un metabolismo sia omo-fermentante, che etero-fermentante. I batteri appartenenti a questo genere sono definiti acido-resistenti perché producono una elevata concentrazione di acido lattico. Questa loro caratteristica determina una notevole diminuzione del valore del pH del prodotto in cui si trovano e permette di inibire molti dei microrganismi competitori. Le loro proprietà fisiologiche e biochimiche (come la capacità di degradare proteine, produzione di composti antimicrobici) influiscono positivamente sulle caratteristiche organolettiche, di conservabilità e salutistiche di diversi alimenti (Farris et al., 2012).

- *Pediococcus*: sono cocchi per lo più omo-fermentanti con cellule a tetradi. I batteri appartenenti a questo genere si trovano frequentemente in colture starter. Partecipa a diversi processi fermentativi di vegetali, ad esempio è importante per la fermentazione del cavolo, durante la produzione dei crauti. Nei prodotti lattiero caseari, come nei formaggi a lunga stagionatura, svolgono un ruolo molto importante in quanto sono in grado di svilupparsi tardivamente (Farris et al., 2012).
- *Enterococcus*: sono cocchi ovoidali con cellule spesso disposte a due o in catena. Negli anni passati venivano classificati nel genere *Streptococcus*. I batteri appartenenti a questo genere sono di norma presenti all'interno dell'intestino umano e animale, proprio per questo vengono utilizzati come indice di contaminazione fecale. Svolgono un ruolo molto importante nella stagionatura di diversi formaggi perché sono presenti all'interno del latte (Farris et al., 2012).
- *Lactococcus*: sono cocchi o cocchi ovoidali e in precedenza venivano classificati nel genere *Streptococcus*. Alcuni ceppi di questo genere sono in grado di crescere a temperatura di circa 7°C. Sono utilizzati spesso nel settore lattiero caseario come colture starter per la produzione di formaggi. Vengono utilizzati per le loro capacità acidificanti e per la

produzione di composti aromatici, importanti nei formaggi (Farris et al., 2012).

- *Streptococcus*: sono cocchi e presentano un metabolismo fermentativo con alta produzione di acido lattico. Batteri di questo genere (che presentano un'origine fecale) all'interno di alimenti, sono considerati indici di scarse condizioni igieniche (Farris et al., 2012).
- *Leuconostoc*: sono cocchi ovoidali caratterizzati da metabolismo etero-fermentante. Sono batteri che si riscontrano spesso su alimenti vegetali. Alcuni ceppi di questo genere sono responsabili del deterioramento di alimenti refrigerati confezionati sottovuoto (Farris et al., 2012).
- *Oenococcus*: questo genere è simile al genere *Lactobacillus*. I batteri sono caratterizzati da un metabolismo etero-fermentante. Alcuni batteri sono molto importanti per le produzioni vinarie, per questo sono utilizzati anche come starter (Farris et al., 2012).
- *Weisella*
- *Carnobacterium*: sono etero-fermentanti obbligati e sono molto importanti perché sono produttori di batteriocine, molto importanti verso microrganismi patogeni e alternati (Farris et al., 2012).
- *Vagococcus*: è un genere che è stato descritto recentemente (nel 1990) in seguito a degli studi basati sull'RNA16s. I batteri appartenenti a questo genere presentano dei flagelli che gli permettono di essere mobili (Farris et al., 2012).
- *Tetragenococcus*

(Klaenhammer et al., 2005; Farris et al., 2012)

3.4.1. Metabolismo dei LAB

Nei processi di fermentazione dei batteri lattici, i carboidrati vengono usati come fonte di nutrienti, e di conseguenza vengono scissi tramite i processi di glicolisi. Successivamente l'acido piruvico ottenuto viene trasformato nei

prodotti finali della fermentazione. In relazione al diverso metabolismo dei carboidrati i batteri lattici sono suddivisi in tre diverse categorie metaboliche:

- Omo-fermentanti obbligati: Fermentano solo gli esosi, mediante la glicolisi o via EMP (Embden-Meyerhof-Parnas), con produzione di piruvato, che viene poi ridotto ad acido lattico, l'unico prodotto della loro attività fermentativa, tramite la lattato deidrogenasi. Contemporaneamente avviene la ri-ossidazione del NADH. Attraverso questa via vengono prodotti, per ogni mole di glucosio fermentato, due moli di acido lattico e si ottiene anche una resa energetica pari a due moli di ATP. Gli omo-fermentanti presentano un enzima chiave, che è l'aldolasi, e tramite questo scindono lo zucchero a sei atomi di carbonio in due triosi.
- Etero-fermentanti obbligati: questi batteri sono caratterizzati dall'assenza dell'enzima aldolasi, per questo fermentano esosi mediante la via 6-PG/PK (6-fosfogluconato/fosfochetolasi), con produzione di acido lattico, etanolo, acido acetico e anidride carbonica. Oltre al glucosio e maltosio, alcuni LAB eterofermentanti sono in grado di fermentare i carboidrati pentosi (ad esempio xilosio, ribosio e arabinosio), sempre tramite la via 6-PG/PK. Rispetto la fermentazione di carboidrati esosi, quella dei pentosi è una fermentazione più conveniente dal punto di vista energetico, e questo determina ripercussioni positive sui tempi di fermentazione.
- Etero-fermentanti facoltativi: questi batteri sono simili a quelli eterofermentanti ma si differenziano per la presenza dell'enzima aldolasi; quindi, riescono a fermentare il lattosio attraverso la via omofermentante, inoltre fermentano gli esosi mediante la via EMP e i pentosi mediante la via 6-PG/PK (6-fosfogluconato/fosfochetolasi), con produzione, rispettivamente, di acido lattico, acido acetico, acido formico ed etanolo.

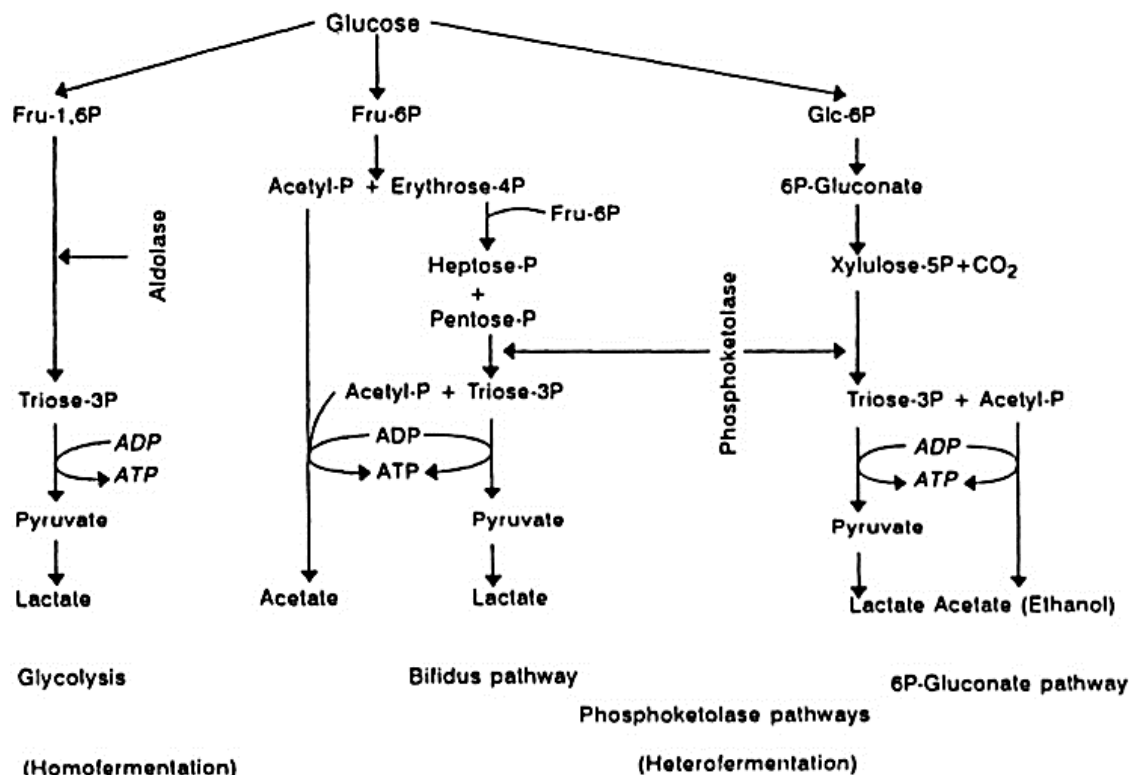


Figura 3.1: Metabolismo omo-fermentante ed etero-fermentante (Fellows, 2017)

Come conseguenza dei prodotti finali del metabolismo dei carboidrati, i batteri lattici contribuiscono essenzialmente a determinare l'acidificazione del prodotto (Farris et al., 2012).

3.5. Principali batteri lattici impiegati nelle fermentazioni vegetali

3.5.1. *Lactiplantibacillus plantarum*

Lactiplantibacillus plantarum riesce a fermentare un'ampia gamma di carboidrati, e a metabolizzare acidi fenolici tramite esterasi, decarbossilasi e attività reduttasiche. Cresce a temperature comprese tra i 15 e 45°C (Zheng et al., 2020). È considerata una specie etero-fermentante facoltativa (Martino et al., 2016). *Lactiplantibacillus plantarum* è stato isolato da diversi cibi fermentati, tra cui verdure fermentate (ad esempio olive fermentate), carni, latticini e cereali fermentati, ma è stato anche riscontrato in habitat associati agli insetti, inoltre, è in grado di colonizzare il tratto gastrointestinale dei vertebrati. *L. plantarum* è stato ampiamente usato come specie modello per lo studio del metabolismo, ecologico e genetico, dei lattobacilli. Inoltre, è importante dal punto di vista commerciale perché costituisce una coltura starter per molteplici

fermentazioni alimentari e viene applicato come coltura probiotica (Zheng et al., 2020), questo perché sono commensali umani naturalmente presenti, i loro potenziali effetti benefici sull'uomo sono stati recentemente segnalati come in grado di promuovere la crescita giovanile (Martino et al., 2016). Si riconoscono due sottospecie: *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* e *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* (Zheng et al., 2020). *L. plantarum* presenta un genoma variabile e flessibile che gli permette di crescere e sopravvivere efficientemente in vari ambienti. Questa caratteristica sembra derivare dalla sua flessibilità metabolica, dall'espressione genica e dalla stabilità delle proteine (Martino et al., 2016). Pertanto, sembra avere acquisito e conservato capacità funzionali che gli consentono di colonizzare efficacemente diversi habitat, rappresentando così un esempio di specie batterica ubiquitaria che si caratterizza per la sua dinamicità e flessibilità (Martino et al., 2016). *L. plantarum* presenta anche un'attività antimicrobica legata alla produzione di diversi composti con attività antimicrobica come le batteriocine. Queste sono in grado di inibire lo sviluppo di diversi microrganismi degradativi e patogeni, come ad esempio *Listeria monocytogenes* (Mills et al., 2011).

3.5.2. *Leuconostoc mesenteroides*

Leuconostoc mesenteroides è un batterio lattico di forma coccica, con attività fermentativa eterolattica e viene usato principalmente nella fermentazione lattiero-casearia industriale, ma viene isolato spesso anche in prodotti vegetali come frutta e verdura, proprio per questo determina l'avvio di fermentazioni vegetali spontanee (Holland & Liu, 2011). Oltre che nei prodotti lattiero caseari o nei sottaceti, le colture starter di *Leuc. mesenteroides* sono utilizzate anche in alcune fermentazioni riguardanti impasti di panificazione. Si sviluppa maggiormente a temperature comprese tra 10 e 30°C, ma essendo un mesofilo la sua temperatura ottimale di crescita è di 30°C. Il range di pH entro il quale questo batterio si sviluppa è compreso tra 4,5 e 7. È stato visto che *Leuc. mesenteroides* presenta un'attività antimicrobica nei confronti di *Listeria* spp.

compresa *L. monocytogenes* (Chentouf & Zineb, 2013). *Leuc. mesenteroides* è coinvolto nel processo di fermentazione spontanea dei vegetali. Durante questa attività fermentativa vengono prodotte diverse molecole, tra cui CO₂ ed acidi organici, i quali sono responsabili dell'abbassamento del pH e conseguentemente anche dell'inibizione di microrganismi patogeni e agenti di spoilage. L'anidride carbonica prodotta va a sostituire l'ossigeno, creando così un ambiente anaerobio che facilita la crescita dei lattobacilli. Inoltre, l'eliminazione dell'ossigeno permette ai vegetali di preservare il loro colore, evitando l'ossidazione (Fellows, 2017).

3.6. Lieviti

I lieviti sono un gruppo di funghi unicellulari in grado di moltiplicarsi per gemmazione o scissione. La gemmazione è il metodo di riproduzione più frequente e prevede una mitosi a carico della cellula madre; mentre la scissione è un metodo meno frequente, e viene utilizzato da una piccola quantità di lieviti. La loro attività metabolica è caratterizzata dalla capacità di utilizzo di zuccheri grazie a meccanismi riduttivi e ossidativi. I lieviti presentano una elevata capacità di adattamento e sono presenti in diversi ambienti, soprattutto sulla superficie di prodotti vegetali come frutta e verdura, per questo sono microrganismi di grande interesse nel settore alimentare (Farris et al., 2012). Alcuni generi e specie trovano quindi diverse applicazioni nell'industria alimentare grazie alle loro capacità fermentative. Vengono impiegati nella produzione di birra, vino e aceto ma anche nella trasformazione di prodotti ortofrutticoli, nei prodotti da forno, carne e prodotti lattiero caseari. I lieviti vengono utilizzati per modificare l'attività dell'acqua, evitando così lo sviluppo di microrganismi patogeni e degradativi; per modificare la texture di diversi prodotti (ad esempio per produrre prodotti lattiero caseari spalmabili) e per definire il profilo sensoriale, in quanto produttori di diversi composti aromatici. I lieviti coinvolti in processi alimentari sono per la maggior parte mesofili, anche se alcune specie sono caratterizzate dalla capacità di sviluppare anche a

basse temperature. I lieviti di interesse alimentare sono per la maggior parte ascomiceti e si dividono in lieviti asporigeni e sporigeni. Lieviti asporigeni:

- *Brettanomyces*: i lieviti appartenenti a questo genere sono presenti maggiormente sui frutti e sono caratterizzati dall'elevata produzione di acido acetico (Farris et al., 2012).
- *Candida*: presenta un numero elevato di specie, e presentano attività lipolitiche e proteolitiche. Alcune specie sono importanti per la fermentazione di frutti, come l'uva (Farris et al., 2012).
- *Cryptococcus*: sono lieviti che non fermentano gli zuccheri. Si trovano spesso sui prodotti vegetali e sul terreno (Farris et al., 2012).
- *Rhodotorula*: le colonie di questo lievito sono facilmente distinguibili perché presentano un colore arancione. Il colore è legato alla presenza di alcuni pigmenti che evitano il passaggio di alcune lunghezze d'onda della luce che possono danneggiare la cellula. Sviluppa anche a basse temperature e si può ritrovare su carne e pesce, e in questi casi ha un effetto negativo sulla colorazione (Farris et al., 2012).
- *Trichosporon*: non fermenta i carboidrati, ma presenta un'elevata attività ossidativa. Spesso si trova nel terreno ma alcune specie possono essere riscontrate sulla cute animale e umana (Farris et al., 2012).

Lieviti sporigeni:

- *Debaryomyces*: è un lievito ampiamente diffuso nei prodotti caseari, dove persiste anche durante le fasi di stagionatura, questo grazie alle sue caratteristiche di alofilia (è in grado di sviluppare fino al 20-25% di NaCl) e di crescita a bassi valori di attività dell'acqua (circa fino a 0,65). La specie più diffusa nel settore alimentare è *Debaryomyces hansenii* (Farris et al., 2012).
- *Hanseniaspora*: i lieviti di questo genere presentano una forma apiculata. Si trova spesso su diversi tipi di frutta, e successivamente determina anche fenomeni di fermentazione (Farris et al., 2012).

- *Kluyveromyces*: è largamente diffuso nel settore alimentare, soprattutto nel settore caseario dove rappresenta il lievito predominante. In enologia viene anche utilizzato come starter (Farris et al., 2012).
- *Pichia*: i lieviti appartenenti a questo genere non sono in grado di fermentare e assimilare il lattosio. Di solito forma uno strato di film sugli alimenti dove si sviluppa (Farris et al., 2012).
- *Saccharomyces*: comprende diverse specie molto importanti per le produzioni alimentari. Presenta un'elevata attività fermentativa, poiché fermenta diversi carboidrati (Farris et al., 2012).
- *Saccharomyces*: le cellule vegetative sono di grandi dimensioni, caratterizzate da una forma apiculata ed estremità arrotondate. Alcune specie sono importanti perché presentano una resistenza ai comuni antimicrobici utilizzati in agricoltura, inoltre sono anche alcol-resistenti (Farris et al., 2012).
- *Schizosaccharomyces*: lievito diffuso in diversi frutti, è osmofilo e ha una resistenza a diversi antibiotici (Farris et al., 2012).
- *Torulopsis*: lievito simile al genere *Saccharomyces*. Durante la fermentazione produce un'elevata quantità di esteri e altri composti aromatici che sono importanti nella definizione del profilo sensoriale del prodotto (Farris et al., 2012).
- *Wickerhamomyces*: molto importante per le sue capacità di competizione con muffe indesiderate (Farris et al., 2012).
- *Yarrowia*: lievito che si riscontra comunemente su frutta e verdura, ma anche su carne e pollame. È un lievito aerobio obbligato e riesce a utilizzare diversi grassi come fonte di carbonio. Produce diversi enzimi idrolitici (Farris et al., 2012).
- *Zygosaccharomyces*: i lieviti appartenenti a questo genere causano deterioramento negli alimenti ad elevata acidità (ad esempio salse e conserve sott'aceto). Sono caratterizzati da un'estrema resistenza alla

pressione osmotica, alle alte concentrazioni di anidride solforosa e all'alta gradazione alcolica (Farris et al., 2012).

3.6.1. Metabolismo dei lieviti

Il metabolismo dei lieviti può essere sia ossidativo che fermentativo, quindi, in alcuni casi la stessa specie è in grado sia di effettuare la respirazione in aerobiosi sia la fermentazione in anaerobiosi. Molti lieviti hanno solo metabolismo respiratorio e possono ossidare oltre agli zuccheri fermentescibili, pentosi, alcoli (etanolo, metanolo), acidi organici (acido acetico, acido lattico, acido ossalacetico) ed altri composti presenti nel substrato (diidrossiacetone). Nel caso dei lieviti che sono in grado sia di fermentare che respirare, a discriminare la via metabolica che intraprendono, non è solo la presenza di ossigeno, ma anche altri fattori come ad il contenuto zuccherino della matrice. Quando la concentrazione di zuccheri è elevata (circa 200 g/L), gli enzimi della respirazione vengono inibiti promuovendo così la fermentazione (effetto Crabtree). L'attività fermentativa dei lieviti è limitata agli zuccheri prevalentemente monosaccaridi esosi, come glucosio e fruttosio. Infatti, i lieviti in grado di fermentare fermentano sempre il glucosio, il fruttosio e il mannosio. Il galattosio, però, viene fermentato solo da alcuni, anche se la capacità di fermentarlo può essere acquisita. I disaccaridi, come il lattosio, maltosio e melibriosio, sono fermentati da quei lieviti che sintetizzano i corrispondenti enzimi idrolitici. I polisaccaridi in genere non vengono utilizzati, perché per poter essere fermentati devono essere prima idrolizzati. Solo alcuni ceppi di *S. cerevisiae* sono in grado di fermentare le destrine.

I principali prodotti ottenuti dalla fermentazione degli zuccheri sono:

- Etanolo: è sicuramente il più rappresentativo tra i metaboliti prodotti dal lievito durante la fermentazione alcolica (sia in assenza che in presenza di ossigeno). Il quale viene prodotto a seguito della riduzione dell'acetaldeide necessaria per la riossidazione del coenzima NADH H⁺.

- Esteri: dall'acetaldeide si forma anche acido acetico che a sua volta viene trasformato in Acetil CoA. Questo è un attore importantissimo del processo di esterificazione, ovvero nel percorso di sintesi degli esteri (aromi fruttati).
- Acidi grassi: In presenza di ossigeno, ovvero all'inizio della fermentazione, l'Acetil CoA viene trasformato in acidi grassi. Questi sono utilizzati dal lievito per rinforzare le membrane cellulari durante la crescita. L'apporto iniziale di ossigeno è quindi molto importante per creare cellule sane e forti con membrane cellulari resistenti. Cellule con membrane deboli permettono la fuoriuscita di composti indesiderati durante la fermentazione, generando difetti nel profilo organolettico del prodotto. Quando l'ossigeno finisce, l'Acetil CoA in eccesso viene "catturato" dall'enzima Alcol O-acetiltransferasi. Questo catalizza la reazione di esterificazione (dalla combinazione degli acidi con gli alcoli si ottengono gli esteri). Se l'ossigenazione è scarsa, la produzione di acidi grassi si interrompe precocemente facendo sì che una quantità maggiore di Acetil CoA entri nel percorso di esterificazione aumentando così la produzione di esteri.
- Diversi tipi di acidi: acido acetico, acido lattico, acido succinico, acido propionico, acido isobutirrico, acido isovalerico e capronico.
- Diacetile: composto conosciuto per il tipico aroma di burro. Viene prodotto per ossidazione dell'acetolattato, un composto derivato dal piruvato utile per la sintesi degli amminoacidi. Parte di questo acetolattato fuoriesce dalla cellula e si trasforma in diacetile per ossidazione. Fortunatamente il diacetile rientra successivamente nella cellula per essere trasformato in butanediolo, un composto con una soglia di percezione molto più alta del diacetile.
- Glicerolo
- Tioli: vengono prodotti durante la sintesi degli amminoacidi che avviene all'interno della cellula.

- Aldeidi: questi composti aromatici sono dei precursori degli alcoli superiori. La reazione è a doppio senso, quindi le aldeidi possono formarsi anche nel percorso inverso per ossidazione degli alcoli superiori. Un esempio è l'acetaldeide.
- Alcoli superiori: si formano partendo dalle aldeidi, quindi anche la loro concentrazione è legata alla disponibilità di amminoacidi (Zambonelli et al., 2001).

3.7. Principali lieviti impiegati nelle fermentazioni vegetali

3.7.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Il genere *Saccharomyces* comprende numerose specie che sono considerate molto importanti nelle produzioni alimentari. *S. cerevisiae* è il lievito più commercializzato ed utilizzato come starter per la produzione di diversi alimenti (Farris et al., 2012). Generalmente, la parola “lievito”, senza nessun'altra precisazione, sottintende proprio questa specie. La peculiarità di questo genere è quella di fermentare rapidamente numerosi tipi di carboidrati. *S. cerevisiae* rappresenta la prima cellula eucariote di cui è stato completamente sequenziato il genoma, ed è utilizzato a livello mondiale come modello per studi genetici e molecolari della cellula eucariote stessa (Farris et al., 2012). *S. cerevisiae* è stato una componente essenziale della civiltà umana per il suo ampio uso nella fermentazione di cibi e bevande. Presenta una forma ovale o ellittica e diametro compreso tra 5 e 10 micrometri, si moltiplica attraverso gemmazione. Questo microrganismo tollera alte concentrazioni di etanolo (che lui stesso produce), per quanto riguarda le temperature di crescita, sono comprese tra 5 e 40°C, ma presenta un optimum di crescita tra 25°C e 35°C. Come la maggior parte dei lieviti riesce a crescere in modo ottimale a valori di pH compresi tra 4,5 e 6,5. *S. cerevisiae* presenta un metabolismo anaerobio facoltativo, cioè il ricavo di energia può essere ottenuto o tramite un processo aerobico o tramite un processo anaerobico. Questo lievito è in grado di fermentare gli esosi (ad esempio il D-

glucosio, il D-fruttosio e il D-mannosio), ma grazie all'azione di enzimi riesce a fermentare anche il saccarosio (tramite l'enzima invertasi) e il maltosio (grazie all'enzima maltasi); a differenza di questi ultimi, il lattosio non può essere fermentato. *S. cerevisiae* è molto presente in natura, si trova spesso anche sulla buccia di una grande varietà di frutta e verdura (ad esempio uva) ed è una delle specie prevalentemente isolate da vegetali fermentati (Farris et al., 2012). La fermentazione può avvenire sia da uno sviluppo spontaneo della microflora della materia prima, sia dall'aggiunta di una coltura di lievito puro. Dal punto di vista metabolico e quantitativo, gli alcoli superiori sono il gruppo più importante di composti che *S. cerevisiae* produce durante la fermentazione. La loro biosintesi è condotta attraverso il catabolismo degli aminoacidi, attraverso una via nota come via di Ehrlich (Parapouli et al., 2020).

3.7.2. *Hanseniaspora uvarum*

Appartenente al genere *Hanseniaspora*, che comprende lieviti sporigeni, riconoscibili dalla tipica forma apiculata determinata dalla gemmazione bipolare della cellula. È un lievito molto diffuso e preponderante su tutti i tipi di frutti, dove, una volta avviato il processo di macerazione (quindi mettendo a contatto la superficie esterna con la polpa), comunemente dà inizio al processo di fermentazione. In particolare, è abbondante sulla superficie dell'uva, e di conseguenza anche nel mosto d'uva, e corrisponde al lievito maggiormente presente prima che la specie *Saccharomyces* inizia il processo di fermentazione alcolica. È un lievito poco alcol-tollerante e sensibile ai composti antimicrobici, in particolare all'anidride solforosa (Farris et al., 2012). Presenta delle caratteristiche tecnologiche importanti nell'industria alimentare, infatti *H. uvarum* inibisce la crescita di alcune tipologie di muffe che sono responsabili del deterioramento di frutta, nello specifico di *Botrytis cinerea*, che nel gergo comune è conosciuta come “muffa grigia”, e *Penicillium* spp. che è responsabile del marciume delle frutta (Albertin et al., 2016).

3.8. Applicazioni dei fermentati vegetali

I fermentati di frutta e verdura possono essere aggiunti come ingredienti nella formulazione di prodotti da forno arricchiti. Queste matrici fermentate, in funzione del loro stato, se liquido o solido, possono essere addizionate agli alimenti in diversi modi: nel caso di un prodotto solido questo lo si inserisce direttamente all'interno dell'impasto, oppure si può ottenere una purea che verrà impiegata totalmente o in parte come sostituto dell'acqua di idratazione. Nel caso di una matrice liquida invece, l'acqua di fermentazione, a seguito di filtrazione, verrà impiegata sempre in sostituzione totale o parziale dell'acqua di idratazione. Utilizzando la purea o l'acqua di filtrazione, si permette di migliorare soprattutto il profilo aromatico del prodotto finito (Di Cristo et al., 2019).

4. MATRICI UTILIZZATE

4.1. Mirtillo: composizione, benefici e profilo aromatico

Il mirtillo è il nome comune dato alla bacca di colore blu-viola ottenuto dalla pianta *Myrtillus* del genere *Vaccinium* e inclusa nella categoria dei frutti di bosco. È un frutto che appartiene alla famiglia delle *Ericaceae*, piante arbustive perenni, originarie di diverse regioni d'Europa e degli Stati Uniti, in Italia è presente sull'intero arco alpino e in diverse zone degli Appennini. La presenza delle api all'interno di queste zone è molto importante per la produzione di mirtilli poiché alcune cultivar non sono autofertili e necessitano di un'impollinazione incrociata (Fachinello, 2008). I frutti si raccolgono a fine stagione estiva, quando raggiungono la piena maturazione. I mirtilli vengono utilizzati nella cosmesi grazie alle proprietà lenitive e protettive, ma soprattutto nella cucina e nel campo alimentare, grazie al loro valore nutrizionale, in quanto sono frutti ipocalorici, con un buon contenuto di sali minerali (come calcio, fosforo, potassio e magnesio) e di vitamine (A, B, C, E e β -carotene); ma ciò che rende così importante questo frutto è l'elevato contenuto di composti fenolici (come antociani). La maggior parte dei composti fenolici si accumula maggiormente a livello della buccia, mentre una piccola parte è presente nella polpa e nei semi. I composti fenolici presentano alcune attività biologiche: attività antiossidante, attività antinfiammatoria, proprietà antiobesità e azioni neuroprotettive. Gli antociani maggiormente presenti nel mirtillo sono monoarabinosidi, monoglucosidi e monogalattosidi di cianidina, petunidina, peonidina, delfidina e malvidina, ma oltre agli antociani sono presenti anche altri composti fenolici, e loro glicosidi, come catechina, epicatechina, quercitina (Norberto et al., 2013). Queste proprietà nutraceutiche, associate al sapore unico e al crescente interesse dei consumatori verso alimenti salutistici, hanno determinato un aumento del consumo di mirtilli e di prodotti dove sono contenuti, proprio per questo è diventata la seconda specie di frutto di bosco più importante dopo la fragola. Il sapore e l'aroma sono due delle caratteristiche

più importanti per determinare la qualità dei mirtilli. L'aroma del mirtillo dipende dall'interazione di decine di composti organici volatili, che vengono sintetizzati dal frutto durante la maturazione. Nonostante il forte effetto della maturazione, il profilo aromatico del mirtillo dipende anche dalle diverse specie presenti: alcune specie sono caratterizzate da un'elevata produzione di esteri (come acetato di metile, acetato di etile o butanoato di metile), mentre altre presentano un'elevata concentrazione di altri composti come (E)-2-esenale, esanale e (Z)-3-esenolo, linalolo, nerolo e geraniolo. Tutti i composti aromatici del mirtillo vengono classificati in tre classi principali: i VOC che non variano significativamente tra cultivar e maturazione, e sono rilevabili solo a basse concentrazioni; i VOC che vengono sintetizzati per lo più da mirtilli acerbi e che di conseguenza si riducono durante la maturazione del frutto; i VOC sintetizzati esclusivamente negli ultimi stadi di maturazione. Durante la maturazione, le concentrazioni di composti volatili a basso peso molecolare tendono a diminuire mentre le concentrazioni di quelli a peso molecolare più elevato aumenta. La maggior parte dei composti comunemente considerati responsabili dell'aroma del mirtillo sono quelli sintetizzati nello stato di maturazione avanzato e comprendono: linalolo, la maggior parte dei monoterpeni, (Z)-2-esen-1-olo ed esanale, (E)-2-esenolo che conferiscono sapore dolce e pungente, mentre (E)-2-esenale conferisce un gusto fresco, floreale, dolce e pungente. Una frazione dei composti aromatici importante sono i monoterpeni come il linalolo, che è associato ad un sapore fruttato e agrumato e viene prodotto durante le fasi finali di maturazione, e l'eucaliptolo che si trova nei frutti acerbi e di conseguenza diminuisce durante la maturazione. Una frazione del profilo aromatico del mirtillo è composta anche da quattro acidi volatili (acido esanoico, acido ottanoico, acido nonanoico e acido decanoico), tre sesquiterpeni (d-elemene, (E)-cariofillene e ossido di cariofillene), un norisoprenoide (β -damascenone) e un lattone (butirrolattone). Sono importanti anche tutti quei composti, presenti in piccole quantità, ma che hanno una soglia di odore basso, come per esempio gli esteri. Una grande frazione di questi esteri,

come acetato di etile, isovalerato di metile, isovalerato di etile, 2-metilbutanoato di metile, sono sintetizzati esclusivamente nell'ultima fase di maturazione e amplificati nei frutti stramaturi (Farneti et al., 2017).

4.2. Peperone: composizione, benefici e profilo aromatico

Il peperone è il nome comune dato al frutto ottenuto da alcune varietà della specie *Capsicum annuum*, appartenente alla famiglia delle *Solanaceae*. Il genere *Capsicum* prende il nome dal latino *capsa*, cioè “scatola”, questo perché presenta una somiglianza ad un contenitore che racchiude i semi. La pianta, che produce il peperone, è un arbusto a portamento eretto e presenta dei fiori bianchi. La pianta è originaria del continente americano ed è stata esportata in Europa insieme al pomodoro nel XVI secolo dalle spedizioni spagnole e portoghesi. Seppur proveniente dallo stesso genere di piante, il peperone si differenzia dal peperoncino poiché non contiene al suo interno la capsaicina, una molecola responsabile del senso di piccantezza e bruciore tipico del peperoncino. Negli ultimi anni il maggiore interesse della popolazione per la salute e per una dieta sana ed equilibrata ha portato a far crescere di popolarità una vasta gamma di varietà di peperoni, questo perché hanno un contenuto calorico ridotto e presentano un alto contenuto di vitamina C e carotenoidi. Durante la maturazione i peperoni subiscono una conversione dei pigmenti esistenti; il colore verde del frutto è dovuto principalmente alla presenza di clorofilla e ai carotenoidi tipici del cloroplasto, mentre il colore rosso finale è legato alla maggiore presenza di altri carotenoidi, come capsantina e capsorubina. Inoltre, ai peperoni rossi è associata la più alta quantità di provitamina A (Marìn et al., 2004). Tutti questi composti presenti all'interno del peperone apportano al corpo umano diversi benefici. Infatti, al loro consumo sono associati diversi effetti positivi, ad esempio effetti antinfiammatori, legati alla presenza di carotenoidi, proprietà antitumorali, grazie alla presenza di diverse vitamine, e riduzione dei radicali liberi e dello stress ossidativo. Gli stessi carotenoidi, vitamina C ed E, luteina possono fornire benefici nel ridurre

il rischio di patologie oculari legate all'età (Marìn et al., 2004). L'aroma caratteristico del peperone può essere attribuito alla presenza di composti aromatici quali, esteri, alcoli, aldeidi, chetoni, terpeni, acidi, furani, pirazine e composti contenente lo zolfo. Uno di questi è il 2-isobutil-3-metossipirazina, molecola principalmente responsabile del distinto aroma del peperone, poi è presente il 2,3-butandione che ha una nota di caramello, l'1-penten-3-one associato alla nota piccante e pungente; i composti esanali responsabili del sapore di erba; il (E)-2-esenale responsabile della dolcezza e l'ottanale che conferisce note fruttate (Akhtar et al., 2021; Muscolo et al., 2020). Inoltre, anche i terpenoidi sono di grande importanza nel determinare la qualità aromatica dei peperoni (Muscolo et al., 2020).

5. OBIETTIVI

Nonostante negli ultimi anni ci sia stato un importante sviluppo di prodotti alimentari ottenuti da varie materie prime, i cereali e i loro derivati (in particolare i prodotti da forno) svolgono ancora oggi un ruolo centrale nell'alimentazione umana, soprattutto nei paesi in via di sviluppo (Saleh et al., 2019). Sul mercato è presente, infatti, un'ampia varietà di prodotti ottenuti da diversi cereali che però, durante il processo produttivo, subiscono una serie di trattamenti (pulizia, macinazione, cottura, ecc..) che vanno a ridurre il contenuto di composti bioattivi nel prodotto finito. Di conseguenza, il consumo di alimenti processati (invece della corrispondente materia prima) determina una riduzione dell'assunzione di tali nutrienti nella dieta (Ragae et al., 2014). Tra questi nutrienti possiamo annoverare ad esempio le fibre, gli antiossidanti e i composti fenolici. La presenza di questi composti nella dieta è molto importante perché apportano una serie di benefici al nostro organismo. L'importanza dell'assunzione di fibra alimentare non è da collegare solamente al corretto funzionamento dell'intestino e alla prevenzione di tutte quelle patologie ad esso associate, ad esempio il cancro al colon, ma anche alla riduzione del rischio di altre malattie, come quelle cardiovascolari. Una corretta assunzione di fibra nella dieta permette di prevenire, o per lo meno di controllare, l'insorgenza del diabete e dell'obesità. Inoltre, la fibra sembrerebbe interferire positivamente sul controllo di alcuni parametri ematologici, quali la glicemia e la colesterolemia. Nello specifico, la riduzione della glicemia post-prandiale sembrerebbe essere collegata al fatto che la fibra solubile andrebbe a rallentare lo svuotamento dell'intestino, che porterebbe a ridurre, di conseguenza, la digestione e l'assorbimento di glucidi, andando così a ridurre il picco glicemico. Anche le sostanze fenoliche e polifenoliche, largamente diffuse nei vegetali, giocano dei ruoli di prevenzione nel nostro organismo, come per quanto riguarda l'insorgenza di malattie cardiovascolari. Ma questi nutrienti sono molto importanti anche per le loro capacità antiossidanti. Permettono infatti di andare

a contrastare i radicali liberi, e altri agenti ossidanti, che possono andare a danneggiare la componente lipidica e proteica. I composti fenolici possono ridurre il danno ossidativo (Cozzani e Dainese, 2006).

Date queste premesse, nutrizionisti e tecnologici alimentari stanno studiando alcune strategie per aumentare il contenuto di queste sostanze ad effetto benefico nei prodotti da forno. La maggior parte di questi nutrienti è contenuta negli strati superficiali della cariosside (crusca) e nel germe, che però spesso vengono rimossi per aumentare la stabilità delle farine ottenute e ridurre i fenomeni di irrancidimento. Un approccio alternativo può essere l'aggiunta di materiali di origine vegetale, tra cui frutta e verdura, semi, piante e/o loro estratti, legumi ecc. (Saleh et al., 2019). Per quanto riguarda frutta e verdura, il loro utilizzo può rappresentare una serie di vantaggi: in primo luogo, sono in genere ricchi di fibre, micronutrienti e polifenoli (composti fenolici e flavonoidi), per cui la fortificazione di un prodotto da forno con queste materie prime può, in modo indiretto, ridurre l'apporto calorico, oltre che fornire composti ad azione protettiva (Alashi et al., 2019). Inoltre, frutta e vegetali sono largamente distribuiti e disponibili e, poiché facilmente deperibili, il loro utilizzo in queste produzioni potrebbe favorire anche una riduzione degli sprechi, permettendo ad esempio anche l'impiego di prodotti non più commercializzabili perché prossimi alla scadenza, ma ancora dotati di buone caratteristiche qualitative. Diverse ricerche si sono già focalizzate sulla produzione di pani addizionati di frutta, tra cui ad esempio bucce di arance e mirtilli (le prime ricche di vitamina C, i secondi in polifenoli, tra cui antocianine e flavonoidi), banane, uva, pera, mela, albicocca, ecc. (Betoret e Rosell, 2019). Per quanto riguarda i vegetali, invece, alcuni esempi riguardano l'impiego di zucca, pomodori, peperoni (per via dell'elevato contenuto di antiossidanti), spinaci e bietole, per aumentare il contenuto in fibre del prodotto finale. Queste matrici vengono aggiunte a concentrazioni variabili (0-10%), prevalentemente sottoforma di prodotto fresco (purea/pezzi) o polveri. Un altro aspetto molto interessante è che diversi studi hanno dimostrato come la fermentazione sia in

grado di aumentare il valore nutrizionale di alcuni alimenti, favorendo ad esempio una maggiore biodisponibilità di nutrienti o aumentando il contenuto di composti bioattivi. Questo, nel caso dei prodotti da forno, è dovuto anche all'interazione fra gli enzimi endogeni delle farine e gli enzimi microbici. La fermentazione è quindi un'altra strategia efficace per aumentare il potenziale effetto benefico degli alimenti, favorendo anche la formazione di profili aromatici più ricchi e quindi la differenziazione e caratterizzazione del prodotto. In questa tesi, alcuni di questi approcci sono stati combinati tra loro per valutarne l'effetto sulle caratteristiche chimico-fisiche e sul profilo sensoriale di pane. Nello specifico, sono state utilizzate due puree ottenute da due matrici vegetali risospese e omogeneizzate in acqua (peperone e mirtillo) che sono state utilizzate durante l'impastamento in sostituzione dell'acqua usata per impastare la farina, al fine di arricchirne il profilo sensoriale e il contenuto in sostanze potenzialmente funzionali. Inoltre, è stato valutato anche l'effetto della fermentazione di queste due puree ad opera di microrganismi selezionati. Infatti, un primo lavoro di screening, effettuato dal gruppo di microbiologia dell'Università di Firenze e non oggetto di questa tesi, si era focalizzato sullo studio e la caratterizzazione di fermentati spontanei di vegetali e frutta, al fine di isolare i ceppi microbici responsabili del processo fermentativo ed individuare i migliori candidati da utilizzare come colture starter. Da questo studio sono state quindi selezionate le due matrici oggetto di questa tesi e i quattro microrganismi (*Leuconostoc mesenteroides* L223, *Lactiplantibacillus plantarum* L88, *Saccharomyces cerevisiae* Y267 e *Hanseniaspora uvarum* Y309), dotati delle migliori performances, che sono stati utilizzati in questa sperimentazione per ottenere i fermentati vegetali (sottoforma di puree) addizionati nella produzione di pane. I diversi prodotti ottenuti sono stati analizzati per monitorare diversi aspetti chimico-fisici, strutturali (sviluppo dell'impasto e durezza del pane) ed aromatici (profilo in metaboliti volatili mediante gas-cromatografia). È stato infine condotto anche un test di assaggio

per valutare l'accettabilità da parte di un potenziale consumatore di questi prodotti arricchiti.

6. MATERIALI E METODI

6.1. Preparazione dei fermentati di peperone e mirtillo

I fermentati di peperone e mirtillo sono stati preparati seguendo una specifica metodica riportata in figura 6.1. I campioni vegetali, dopo essere stati pesati e tagliati a pezzi, sono stati posti all'interno di un barattolo in vetro, precedentemente sterilizzato, e addizionati con acqua di rubinetto (temperatura ambiente) in un rapporto 2:1 (ovvero due parti di acqua e una parte di vegetale). Successivamente, è stato aggiunto il 10% di zucchero (saccarosio) sul peso totale dell'acqua. Al fine di garantire la corretta solubilizzazione dello zucchero, i campioni sono stati posti in agitazione. In seguito, sono stati inoculati i due ceppi di batteri lattici, nello specifico di *Leuconostoc mesenteroides* L223 e *Lactiplantibacillus plantarum* L88, con una carica microbica di 10^8 UFC/mL, e i due ceppi di lieviti, *Saccharomyces cerevisiae* Y267 e *Hanseniaspora uvarum* Y309, con una carica microbica di 10^7 UFC/mL. Questi ceppi corrispondono agli stessi che sono stati precedentemente isolati dai mirtilli e peperoni fermentati spontaneamente. I campioni così inoculati sono stati fatti fermentare in termostato a 30°C, opportunamente agitati. Giornalmente sono stati monitorati i valori di pH, l'acidità totale titolabile (TTA), la concentrazione di zuccheri e la carica microbica. Una volta terminata la fermentazione (quindi quando risultano essere esauriti gli zuccheri), i fermentati sono stati frullati fino ad ottenere una purea e conservati in frigo per poi essere utilizzati in sostituzione dell'acqua per l'impasto del pane.

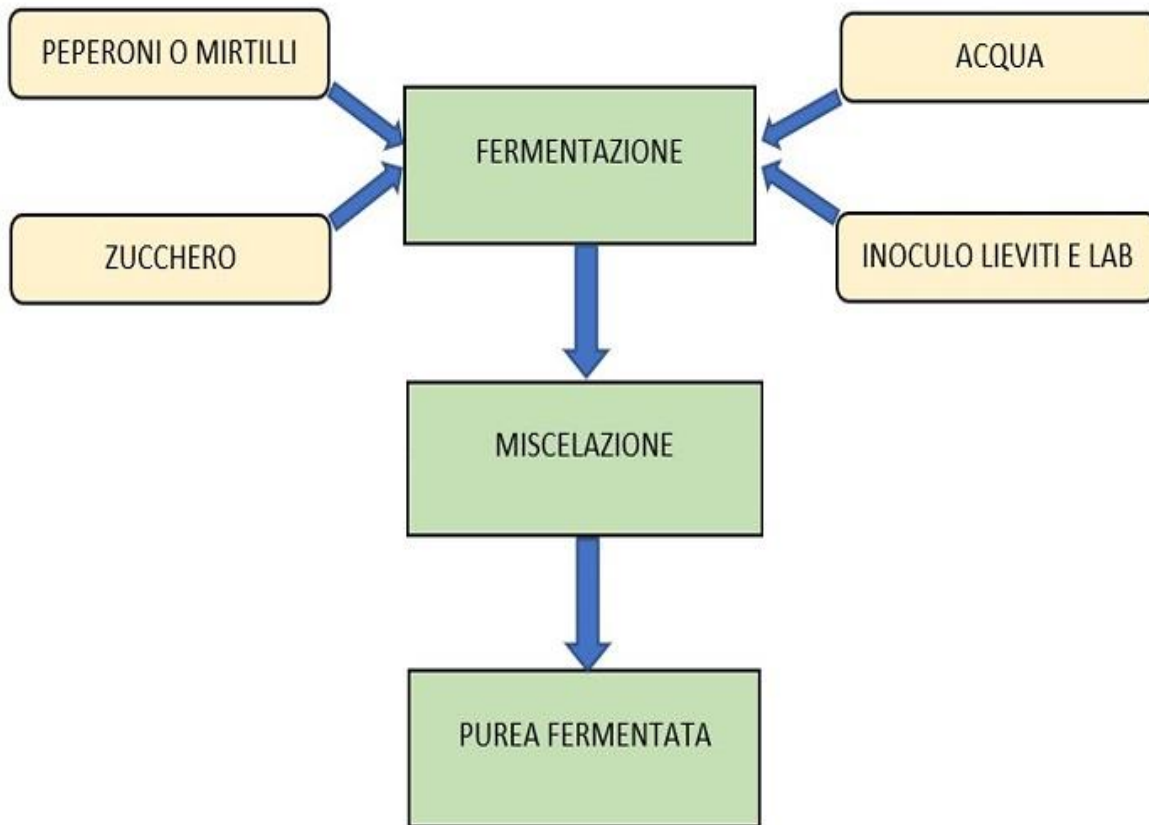


Figura 6.1: Diagramma di flusso del processo produttivo delle puree fermentate.

6.2. Preparazione dei pani

I pani con puree fermentate di peperoni e mirtili sono stati prodotti utilizzando 1kg di farina addizionato dell'1.5% di lievito di birra e dell'1% di sale. Nel caso del controllo, è stata aggiunta per impastare 700 g di acqua mentre, nel caso dei pani arricchiti, sono state aggiunte 700 g di puree fermentate o meno.

Nel seguente diagramma di flusso (figura. 6.2) è riportato, a titolo di esempio, il processo produttivo per l'ottenimento dei pani addizionati di purea fermentata.

Una volta ottenuto l'impasto, lo si lascia riposare per circa 30 minuti. Successivamente, c'è la fase di riposo seguita dalla fase di lievitazione, condotta a 28°C per circa 1 ora e mezza. Infine, vi è la cottura a 200°C, con un tempo variabile da 12 a 30 minuti in funzione della pezzatura.

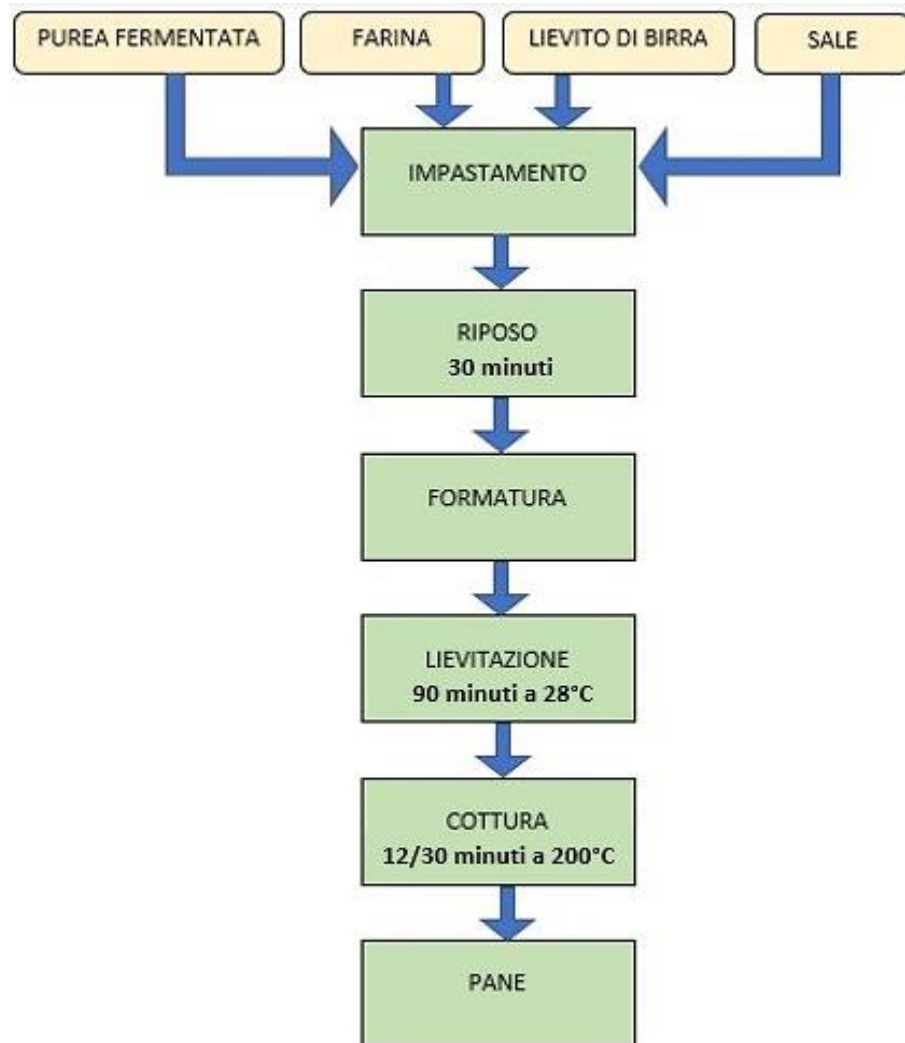


Figura 6.2: Diagramma di flusso del processo produttivo del pane addizionato di purea fermentata.

6.3. Analisi svolte

Le analisi svolte sono state le seguenti:

1. Analisi microbiologiche
2. Analisi pH e acidità titolabile
3. Valutazione dello sviluppo e del colore del pane
4. Determinazione acidi organici
5. Determinazione composti volatili
6. Test sensoriale

6.3.1. Analisi microbiologiche

Sono stati eseguiti dei campionamenti microbiologici per valutare la microflora presente negli impasti in tempi differenti. Durante i diversi punti di campionamento sono stati prelevati circa 10 g di campione in seguito diluiti con 90 mL di soluzione fisiologica sterile (acqua distillata contenente lo 0,9% di cloruro di sodio), al fine di ottenere una diluizione di 1:10. A questo punto, il campione è stato opportunatamente omogeneizzato per circa due minuti in Stomacher (modello Lab Blender Seward, London, UK) e si è ottenuta così la prima diluizione. Da quest'ultima si sono eseguite le successive diluizioni seriali al fine di ottenere dati affidabili dal conteggio in piastra.

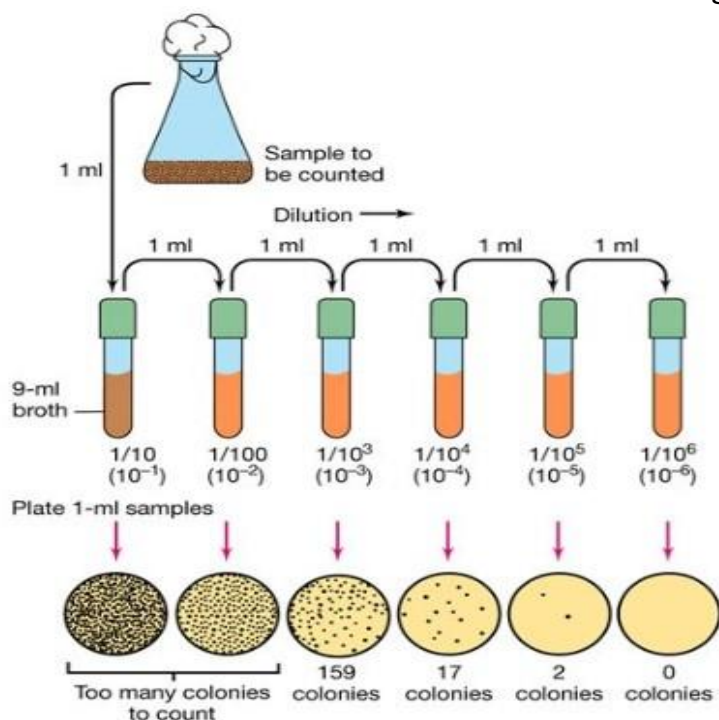


Figura 6.3: diluizioni seriali del campione.

Il campionamento è stato eseguito per spatolamento superficiale o per immersione impiegando terreni selettivi per la ricerca dei microorganismi di interesse.

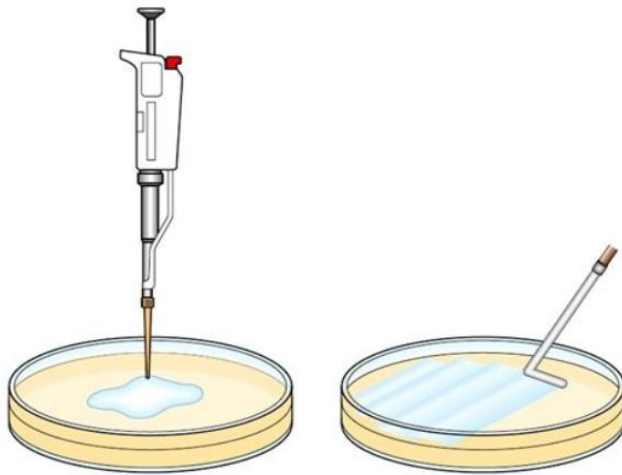


Figura 6.4: Tecnica di campionamento per spatolamento superficiale su piastra.

Nello specifico, nell'ambito di questa sperimentazione sono stati utilizzati i seguenti terreni di colture

- YPD Agar (Yeast Extract Peptone Dextrose Broth), per la determinazione dei lieviti, a cui è stato addizionato il cloramfenicolo per inibire la crescita dei batteri. Le piastre, ottenute per spatolamento superficiale, sono state poi incubate a 28°C per 72 ore. Nella Tabella 5.3 è riportata la composizione del terreno.

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE
Peptone	10 g/L
Estratto di lievito	5 g/L
Glucosio	20 g/L
Agar	20 g/L
Cloramfenicolo	0,2 g/L

Tabella 6.1: composizione terreno YPD.

- mMRS Agar (modified De Man, Rogosa, Sharpe) per la determinazione dei batteri lattici, a cui è stato aggiunto il cicloesimide per inibire lo sviluppo di lieviti. Le piastre, ottenute per immersione, sono state incubate a 32°C per 48 ore. In Tabella 5.4 è riportata la composizione del terreno.

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE	COMPONENTE	CONCENTRAZIONE
Peptone	10 g/L	MgSO ₄	0,2 g/L
Lab-lemco	2 g/L	MnSO ₄	0,05 g/L
Estratto lievito	7 g/L	FeSO ₄	0,01 g/L
Glucosio	7 g/L	Cisteina	1 g/L
Fruttosio	7 g/L	Tween 80	1mL/L
Maltosio	7 g/L	Agar	20 g/L
Acetato di sodio	5 g/L	Cicloesimide	0,5 g/L
K ₂ HPO ₄	2,5 g/L		

Tabella 6.2: composizione terreno mMRS.

6.3.2. Analisi del pH e dell'acidità titolabile

La determinazione del pH è stata eseguita tramite il pHmetro Basic 20 (Crison Instruments, Barcellona, Spain) sul campione diluito 1:1 (10 g di campione a cui sono stati aggiunti 10 mL di acqua distillata e successivamente omogenizzati in Stomacher). La misura è stata eseguita in triplo. Per la determinazione dell'acidità titolabile è stata effettuata una titolazione. Infatti, essa si esprime il volume (mL) di idrossido di sodio (NaOH) 0,1 N, necessaria per neutralizzare, ad un pH di 8,5, la soluzione ottenuta dall'omogeneizzazione di 10 mL di campione e 90 mL di acqua deionizzata.

6.3.3. Valutazione dello sviluppo del pane

La caratterizzazione del pane, in particolare del suo sviluppo, consiste nella determinazione del peso, del volume, del volume specifico, del colore e compattezza. Per quanto riguarda l'aumento del volume, è stato determinato attraverso il metodo "Sesame Replacement Method (AACC International, 2001 10-05.01)". In un becher da 250 mL sono stati inseriti 50 g di impasto e, successivamente, inserito in termostato a 30°C. L'incremento del volume

(misurato in percentuale %) è stato calcolato come differenza tra il volume iniziale e il volume post lievitazione, diviso il volume iniziale dell'impasto. Il volume specifico, definito come il reciproco della densità, è stato determinato facendo il rapporto tra il volume e il peso del pane (mL/g). Il colore del pane è stato determinato attraverso l'utilizzo di un colorimetro a riflettanza Minolta Chroma Meter CR-400, Minolta Italia S.p.A., Milano, Italia). L'analisi è stata svolta sia sulla crosta, che sulla mollica, la misura è stata ripetuta cinque volte (su cinque punti differenti della crosta e mollica) su delle fette di pane aventi un'altezza di 1 cm e successivamente è stata eseguita una media. Prima di effettuare l'analisi, il colorimetro è stato calibrato andando a utilizzare una piastrella in ceramica bianca standard e un illuminante C.

6.3.4. Determinazione degli acidi organici

Tramite l'impiego della cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) (Varian Inc, Palo Alto, CA, USA) è stato possibile quantificare gli zuccheri fermentescibili totali e la quantità di metaboliti microbici prodotti, come glicerina, acido acetico, etanolo e acido lattico presenti nei campioni. Prima dell'iniezione, i campioni sono stati sottoposti a centrifugazione in eppendorf. La fase mobile è costituita da acido solforico 0,013 N, mentre il flusso è pari a 0,6 mL/min. La colonna impiegata (Varian Inc, Palo Alto, CA, USA) è connessa a un detector con indice di rifrazione e UV ($\lambda=210$). Infine, i dati sono stati raccolti e analizzati usando il software Galaxie. L'analisi quantitativa è stata eseguita impiegando delle curve standard di ciascun composto.

6.3.5. Determinazione dei composti volatili

L'analisi dei VOC è stata determinata con una micro-estrazione in fase solida tramite l'ausilio del gas-cromatografo abbinato allo spettrometro di massa (SPME-GC-MS).

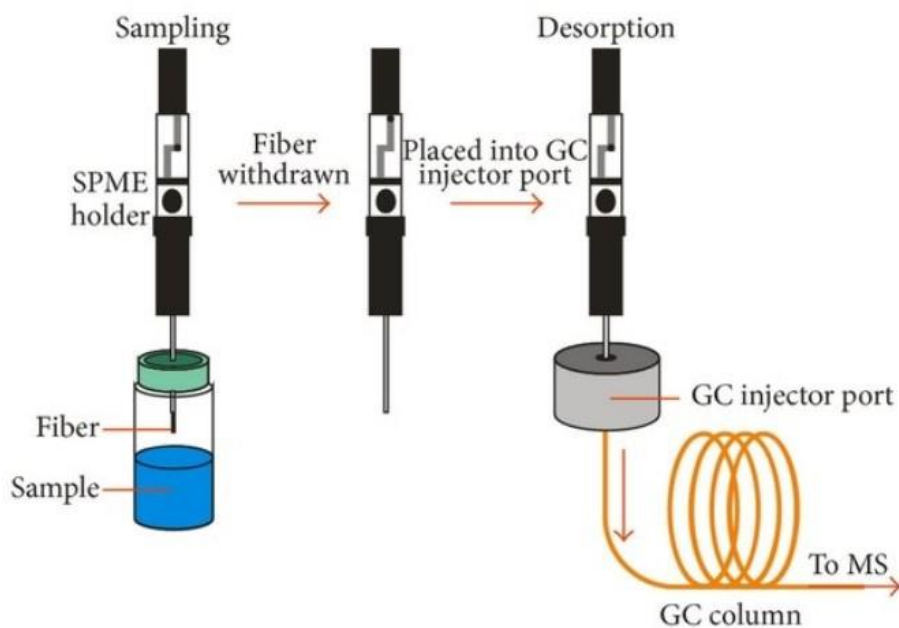


Figura 6.5: Diagramma dell'analisi con micro-estrazione in fase solida, gascromatografia-spettrometria di massa.

Lo strumento impiegato è stato il gas-cromatografo Agilent Technologies 7890A con spettrometro di massa 5975C dello stesso produttore, dotato di una colonna capillare (50 m x 0.32 mm x 1.2 μ m) Chrompack CP-Wax 52 CB (Chrompack, Middelburg, Olanda). La frammentazione ionica è avvenuta tramite impatto elettronico a 70eV ed il gas di trasporto impiegato è stato l'elio. I campioni sono stati aliquotati inserendo 3 g di pane in vials di vetro sterili da 10 mL, sigillati tramite un tappo PTFE. I campioni così preparati sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'analisi. Prima dell'analisi, ad ogni vial sono stati aggiunti 10 μ L di standard interno, una soluzione di 10000 ppm di 4-metil-2-pentanololo (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania). Inizialmente, i campioni sono stati sottoposti ad una fase di condizionamento a 45°C per 10 minuti. Successivamente, tramite l'impiego di una fibra di silice fusa ricoperta da una fase polimerica mista di Divinylbenzene/

Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS StableFlex, 50/30 μm , Supelco, Bellefonte, PA, USA), sono state adsorbite le molecole volatili presenti nello spazio di testa delle vials per 40 minuti ad una temperatura di 45°C. Una volta conclusa questa operazione, la fibra è stata inserita nell'iniettore del gas-cromatografo per 10 minuti, durante i quali le molecole volatili sono state desorbite all'interno della colonna. L'identificazione delle molecole è stata eseguita tramite comparazione con gli spettri di massa di molecole pure, presenti nella libreria NIST 2005. La composizione del profilo in molecole volatili è stata espressa come rapporto tra l'area del picco di ogni molecola e l'area del picco dello standard interno. Per ogni campione le analisi sono state effettuate in triplo.

6.3.6. Test sensoriale

L'analisi sensoriale ha determinato se l'impiego di fermenti vegetali ha comportato l'ottenimento di prodotti diversi tra loro e di definirne il gradimento. Ai 15 assaggiatori non addestrati sono stati forniti alcuni campioni di pane e ogni membro ha avuto a disposizione una scheda di gradimento, sulla quale ha giudicato il campione tramite una scala edonica a sette punti (da 1 "poco" a 7 "molto"). I descrittori scelti per l'analisi sono stati alcuni possibili attributi legati al gusto del pane (dolce, acido, salato, fruttato, fermentato).

7. RISULTATI

7.1. Caratterizzazione di puree fermentate con ceppi selezionati

Nella prima parte del lavoro di questa tesi, sono state ottenute e studiate le puree fermentate ricavate a partire da peperone e mirtillo, da utilizzare successivamente per l'impasto della farina nella produzione del pane. Lo scopo era quello di valutarne l'effetto sulle caratteristiche chimico-fisiche e sul profilo sensoriale del pane ottenuto,

Per avviare la fermentazione sono stati inoculati due ceppi di batteri lattici (*Lactiplantibacillus plantarum* L88 e *Leuconostoc mesenteroides* L223) e due ceppi di lieviti (*Saccharomyces cerevisiae* Y267 e *Hanseniaspora uvarum* Y309), selezionati sulla base delle loro caratteristiche in una fase precedente del progetto di ricerca. La concentrazione iniziale dei microorganismi nella purea era 8 log UFC/g per i batteri lattici e circa 6.5 log UFC/g per i lieviti.

Durante le fasi di ricerca che hanno preceduto questa tesi, effettuate in collaborazione con il gruppo di microbiologia dell'Università di Firenze, alcune puree di frutta e verdura fermentate spontaneamente erano state caratterizzate ed impiegate come fonte di isolamento per ceppi di interesse industriale e tecnologico al fine di individuare i migliori candidati da utilizzare come colture starter. I ceppi *Leuc. mesenteroides* L223, *L. plantarum* L88, *S. cerevisiae* Y267 e *H. uvarum* Y309 erano risultati caratterizzati dalle migliori performances e sono stati selezionati come starter nella seconda parte dello studio, oggetto di questo lavoro di tesi, per ottenere i fermentati vegetali (sottoforma di puree) da aggiungere nella produzione di pane. Per ottenere le puree, i peperoni e i mirtilli sono stati preparati e addizionati di acqua (in un rapporto di 1:2) e di saccarosio (10% sul peso dell'acqua) e sono stati posti a 30°C per la fase di fermentazione. La fermentazione è stata protratta fino all'esaurimento dello zucchero inizialmente aggiunto e il tempo richiesto è stato di 5 giorni per la purea di mirtillo e di 3 giorni per la purea di peperone. Le puree sono state analizzate per

le loro caratteristiche chimico-fisiche, la presenza delle principali popolazioni microbiche e il profilo in molecole d'aroma.

	Purea fresca a base di peperoni	Purea fresca a base di mirtilli	Purea fermentata a base di peperoni	Purea fermentata a base di mirtilli
pH	6.50 ±0.10	3.66 ±0.07	3.54±0.13	3.50±0.08
Acido lattico (g/L)	n.d.	n.d.	4.09±0.46	1.63±0.55
Acido acetico (g/L)	n.d.	n.d.	0.19±0.09	0.49±0.12
Glicerolo (g/L)	n.d.	n.d.	1.80±0.10	2.87±0.23
Etanolo (%v/v)	n.d.	n.d.	4.63±0.12	5.27±0.42
LAB (log UFC/g)	3.71±0.15	1.93±0.33	8.43 ±0.11	7.87 ±0.13
Lieviti (log UFC/g)	3.80±0.18	2.54 ±0.25	7.09 ±0.20	7.17 ±0.15

Tabella 7.1: Caratteristiche chimico fisiche e microbiologiche delle puree fresche e fermentate con i ceppi selezionati (n.d.: non determinato).

Il pH iniziale dei due preparati vegetali era piuttosto diverso (6.50 e 3.66 per peperone e mirtillo, rispettivamente) ma al termine della fermentazione i valori nelle due puree sono risultati piuttosto simili, vale a dire all'incirca 3.50 (Tab. 7.1). Il basso valore di pH di partenza nella purea di mirtilli spiega la concentrazione di batteri lattici relativamente limitata riscontrata nel prodotto finale, pari a circa un quarto se confrontata con quella della purea di peperoni. D'altro canto, il pH iniziale dei mirtilli risultava decisamente proibitivo per *Leuc. mesenteroides* ed è quindi ipotizzabile che lo sviluppo osservato dipenda essenzialmente dalle cinetiche di *L. plantarum*. Il più rilevante sviluppo di batteri lattici nel peperone è sicuramente responsabile del maggiore accumulo di acido lattico registrato in questo campione (4.09 g/l vs. 1.63 g/l del mirtillo). Nel mirtillo, dunque, le maggiori attività metaboliche sono imputabili ai lieviti, come ipotizzabile anche dal maggiore contenuto in glicerolo ed etanolo riscontrato. In effetti, anche l'acido acetico è superiore nella purea fermentata di mirtillo ma bisogna considerare che, in particolare, *H. uvarum* riesce a produrre considerevoli quantità di questo acido organico dalla fermentazione degli zuccheri. I processi fermentativi hanno apportato anche importanti

variazioni nel profilo in molecole volatili delle puree fermentate se confrontate con il campione non inoculato. I risultati sul profilo volatile sono stati riportati in Tabella 7.2 per la purea di peperone e in Tabella 7.3 per la purea di mirtillo. In ogni tabella i valori sono espressi come rapporto tra l'area del picco del composto considerato e l'area di uno standard interno (4-metil, 2-pentanol, aggiunto volontariamente al campione alla concentrazione di 3.3 mg/kg) e come percentuale relativa di ogni composto sul totale delle aree dei composti identificati.

Composti	Area /area standard		%	
	P PEP	PF PEP	PPEP	PF PEP
2-Esanale	0.61	n.d.	0.90	n.d.
Ottanale	0.15	5.29	0.22	0.02
Nonanale	1.47	19.69	2.17	0.07
Decanale	0.89	16.68	1.32	0.06
Benzaldeide	0.91	26.24	1.34	0.09
Benzenacetaldeide	0.00	50.31	0.00	0.17
ALDEIDI	4.03	118.21	5.95	0.41
2,3-Butandione	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Metil Isobutil Chetone	22.85	74.38	33.70	0.26
2-Nonanone	n.d.	10.69	n.d.	0.04
3-etil-Cicloesanone	4.02	49.83	5.93	0.17
2-metil-3-decan-5-one	6.36	101.12	9.39	0.35
6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-one	0.31	54.75	0.46	0.19
CHETONI	33.54	290.76	49.48	1.01
Alcol etilico	0.99	6057.21	1.47	21.00
1-Propanolo	n.d.	12.31	n.d.	0.04
1-Propanolo	n.d.	72.62	n.d.	0.25
2-metil-Alcol isoamilico	n.d.	1307.96	n.d.	4.54
1-Eptanolo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1-Esanolo	6.23	147.60	9.19	0.51
2-etil-2-Nonanolo	n.d.	10.47	n.d.	0.04
1-Ottanolo	0.88	108.00	1.30	0.37
1-Nonanolo	0.80	27.27	1.18	0.09
Alcol feniletico	0.83	852.27	1.23	2.96
ALCOLI	9.74	8595.71	14.36	29.81
Acetato di etile	n.d.	680.42	n.d.	2.36
Butirrato di etile	n.d.	38.64	n.d.	0.13
Acetato di isoamile	1.76	1213.63	2.60	4.21
Etil esanoato	0.54	2651.04	0.79	9.19
Etil eptanoato	n.d.	25.57	n.d.	0.09
Lattato di etile	n.d.	59.54	n.d.	0.21
2-Etilsil-acetato	n.d.	253.30	n.d.	0.88
Ottanato di etile	1.45	4844.75	2.13	16.80

Isopentil esanoato	n.d.	107.21	n.d.	0.37
Acetato di ottile	n.d.	57.64	n.d.	0.20
Etile nonanoato	n.d.	127.25	n.d.	0.44
Etile decanoato	n.d.	3505.27	n.d.	12.15
Isoamil ottanoato	n.d.	129.98	n.d.	0.45
Succinato di etile	n.d.	70.67	n.d.	0.25
Etile 9-decanoato	n.d.	1206.55	n.d.	4.18
Salicilato di metile	0.44	32.60	0.65	0.11
Acetato di feniletile	0.37	289.57	0.55	1.00
Isoamil decanoato	n.d.	68.50	n.d.	0.24
Idrocinnamato di etile	n.d.	53.07	n.d.	0.18
Miristato di etile	n.d.	202.94	n.d.	0.70
Laurato di isoamile	n.d.	44.31	n.d.	0.15
Palmitato di etile	n.d.	855.59	n.d.	2.97
ESTERI	4.56	16518.04	6.73	57.28
Acido acetico	1.28	133.62	1.89	0.46
Acido esanoico	n.d.	20.06	n.d.	0.07
2-metil-Acido esanoico	0.90	1432.25	1.33	4.97
Acido ottanoico	0.54	621.15	0.79	2.15
Acido nonanoico	0.74	31.19	1.09	0.11
Acido n-decanoico	1.01	642.46	1.50	2.23
Acido 9-decanoico	n.d.	42.12	n.d.	0.15
Acido decanoico	n.d.	103.81	n.d.	0.36
ACIDO	4.47	3026.67	6.60	10.50
Stirene	0.65	10.48	0.96	0.04
1-etil-1-metil-Cicloesimide	n.d.	52.65	n.d.	0.18
ALTRI	0.65	63.12	0.96	0.22
Beta-Mircene	n.d.	4.89	n.d.	0.02
Ciclogeraniolene	7.77	84.25	11.46	0.29
Linalolo	0.61	100.20	0.90	0.35
Citronellolo	2.42	36.64	3.57	0.13
TERPENI	10.80	225.99	15.93	0.78

Tabella 7.2: Profilo in molecole volatili delle puree di peperone fermentato e non.

Per quanto concerne la purea di mirtillo (Tab. 7.3), il profilo in molecole volatili della purea non fermentata appariva più complesso rispetto al peperone. In particolare, erano riscontrabili delle aldeidi, rappresentate soprattutto da esanale e 2-esanale, e degli alcoli (esanolo). Tuttavia, anche in questo caso la fermentazione ha arricchito in modo sostanziale il profilo in molecole volatili, ed il composto con il maggior peso relativo è risultato essere ancora l'etanolo (27.24%). Di nuovo, l'alcol isoamilico (10.54%) e l'alcol fenilico (5.31) erano presenti in quantità rilevanti. In ogni caso gli alcoli rappresentavano il 45.38%

dei composti volatili totali. Al pari di quanto osservato per il peperone, anche nel mirtillo si osservava un rilevante accumulo di esteri, in particolare, etil ottanoato (12.80%), etil esanoato (5.93%), ed etil decanoato (5.78%). Nel loro complesso gli esteri rappresentavano una rilevante quantità del totale dei composti volatili determinati (38.07%), che tuttavia risultava inferiore alla loro presenza osservata nella purea di peperone. Anche la concentrazione di acidi (6.73%) era inferiore a quanto osservato nella purea fermentata di peperone, essendo costituita prevalentemente da acido esanoico (3.63%) e acido acetico (1.14%). Gli altri componenti, in particolare aldeidi e chetoni, risultavano presenti in quantità ridottissime (rispettivamente 0.51% e 1.18% del totale). Un discorso a parte meritano i terpeni, che, nel caso della purea di mirtillo fermentata rappresentano il 6.82% del totale, costituiti in gran parte da linalolo (4.06%) e, in misura minore, dal citronellolo (0.97%).

Questi profili in molecole di aroma delle puree testimoniano la prevalenza delle attività metaboliche dei lieviti rispetto a quelle dei batteri lattici. Questo fatto non è solo desumibile dagli accumuli importanti di etanolo ma, soprattutto, dall'imponente attività esterasica rilevata che è particolarmente significativa nei lieviti (sia riconducibili alla specie *S. cerevisiae* che *H. uvarum*). Inoltre, anche l'attività glicosidasi, che porta alla liberazione di terpeni, osservata soprattutto nella purea fermentata di mirtillo, è sicuramente più diffusa tra i lieviti che non tra i batteri lattici. D'altro canto, come già osservato, nel caso del mirtillo, il pH iniziale è sicuramente più favorevole all'attività di queste due specie fungine. Cionondimeno, soprattutto nel caso del peperone, il contributo al profilo aromatico determinato dai batteri lattici, cresciuti a concentrazioni superiori a 8 log UFC/g, non deve essere trascurato, anche se è difficile individuare alcune molecole attribuibili specificatamente al loro metabolismo.

Composti	Area /area standard		%	
	P MIR	PF MIR	PMIR	PF MIR
Esanale	69.83	3.66	8.30	0.02
2-Esenale	222.70	7.22	26.48	0.03
Ottanale	2.01	10.64	0.24	0.05
Nonanale	4.52	20.31	0.54	0.09
Decanale	2.03	11.04	0.24	0.05
Benzaldeide	6.93	40.85	0.82	0.18
Benzeneacetaldeide	n.d.	21.86	n.d.	0.10
ALDEIDI	308.02	115.58	36.62	0.51
2,3-Butandione	n.d.	17.04	n.d.	0.08
Metil Isobutil Chetone	14.31	40.58	1.70	0.18
3-Penten-2-one, 4-methyl-	2.50	n.d.	0.30	n.d.
2-Nonanone	0.00	9.06	n.d.	0.04
3-etil-Cicloesanone	9.24	55.36	1.10	0.24
2-metil-3-decan-5-one	18.70	94.83	2.22	0.42
6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-one	4.64	49.25	0.55	0.22
CHETONI	49.39	266.11	5.87	1.18
Alcol etilico	8.84	6161.85	1.05	27.24
1-Propanolo	n.d.	13.70	n.d.	0.06
2-metil-1-Propanol	n.d.	30.75	n.d.	0.14
Alcol isoamilico	n.d.	2383.47	n.d.	10.54
1-Esanolo	185.27	236.36	22.03	1.04
3-Esen-1-olo	21.06	15.09	2.50	0.07
1-Eptanolo	4.14	29.39	0.49	0.13
2-etil-1-Esanolo	4.31	13.61	0.51	0.06
2-Nonanolo	1.13	19.36	0.13	0.09
1-Ottanolo	9.35	76.03	1.11	0.34
1-Nonanolo	8.50	58.51	1.01	0.26
Alcol benzilico	1.70	25.79	0.20	0.11
Alcol feniletilico	2.48	1201.56	0.30	5.31
ALCOL	246.78	10265.45	29.34	45.38
Acetato di etile	n.d.	841.15	n.d.	3.72
Butirrato di etile	n.d.	25.49	n.d.	0.11
Acetato di isoamile	1.27	519.97	0.15	2.30
Pentanoato di etile	n.d.	14.82	n.d.	0.07
Metil esanoato	2.72	16.64	0.32	0.07
Etil esanoato	1.30	1340.37	0.15	5.93
Isoamile isovalerato	n.d.	61.59	n.d.	0.27
Etileptanoato	n.d.	20.72	n.d.	0.09
Metile ottanoato	n.d.	60.75	n.d.	0.27
Ottanoato di etile	3.55	2895.13	0.42	12.80
Isopentile esanoato	n.d.	79.98	n.d.	0.35
Metile decanoato	n.d.	19.27	n.d.	0.09
Decanoato di etile	n.d.	1308.36	n.d.	5.78
Isoamil ottanoato	n.d.	67.49	n.d.	0.30
Succinato di etile	n.d.	47.09	n.d.	0.21
Etile 9-decenoato	n.d.	165.75	n.d.	0.73

Benzoato di etile	n.d.	64.84	n.d.	0.29
Salicilato di metile	1.73	49.12	0.21	0.22
Acetato di fenile	n.d.	347.49	n.d.	1.54
Isoamil decanoato	n.d.	90.68	n.d.	0.40
Idrocinnamato di etile	n.d.	223.62	n.d.	0.99
Miristato di etile	n.d.	58.71	n.d.	0.26
Laurato di isoamile	n.d.	27.73	n.d.	0.12
Palmitato di etile	n.d.	266.47	n.d.	1.18
ESTERI	10.57	8613.23	1.26	38.07
Acido acetico	3.07	258.52	0.36	1.14
2-metil-Acido esanoico	n.d.	28.51	n.d.	0.13
Acido esanoico	57.64	820.67	6.85	3.63
Acido ottanoico	2.77	194.21	0.33	0.86
Acido nonanoico	5.20	18.99	0.62	0.08
Acido n-decanoico	3.48	152.25	0.41	0.67
Acido dodecanoico	n.d.	49.46	n.d.	0.22
ACIDI	72.16	1522.61	8.58	6.73
Stirene	1.03	117.51	0.12	0.52
1-etil-1-metile, cicloesano	11.81	178.59	1.40	0.79
ALTRI	12.85	296.10	1.53	1.31
beta-mircene	1.68	8.53	0.20	0.04
D-Limonene	13.36	22.84	1.59	0.10
beta-fellandrene	1.36	9.98	0.16	0.04
Ciclogeraniolo	23.49	116.65	2.79	0.52
Linalolo	66.61	918.14	7.92	4.06
Citronellolo	5.63	219.13	0.67	0.97
Geraniolo	21.83	95.57	2.60	0.42
p-Ment-1-en-9-olo	4.44	68.82	0.53	0.30
Eugenolo	2.94	83.52	0.35	0.37
TERPENI	141.34	1543.19	16.80	6.82

Tabella 7.3: Profilo in molecole volatili delle puree di mirtillo fermentato e non.

Le molecole volatili determinate sono state anche raggruppate in classi chimiche sulla base delle loro caratteristiche, ed in particolare in aldeidi, chetoni, alcoli, esteri, acidi, terpeni ed altri, il cui peso relativo è sintetizzato nella figura 7.1.

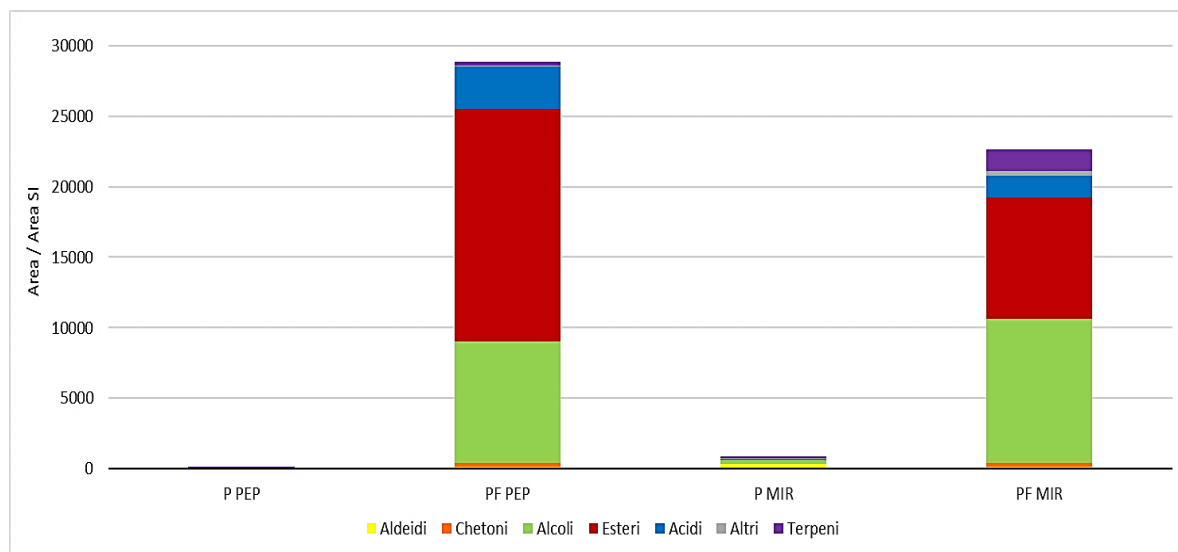


Figura 7.1: Classi dei composti volatili presenti nelle puree di peperoni e mirtilli fermentati e non.

Come si può osservare, la purea di peperoni non fermentata presentava un profilo volatile molto ridotto in cui il maggiore componente era costituito da metil-isobutil-chetone (22.85), seguito da un terpene, il ciclogeraniolene (7.77) e da 2-metil-3-decen-2-one e 2-etil-1-esanolo (entrambi con valori attorno a 6.5). Il profilo diventava molto complesso dopo la fermentazione. Come era facile attendersi, l'etanolo, risultato della fermentazione alcolica operata dai lieviti, risultava la molecola quantitativamente più importante, rappresentando circa il 21% del totale dei composti volatili. Rilevante era anche la presenza di due alcoli secondari quali l'alcol isoamilico (4.54%) e l'alcol fenilico (2.96%). Complessivamente gli alcoli rappresentavano il 29.81% dei composti volatili totali. Quasi doppio (57.28%) era l'apporto degli esteri, prevalentemente esteri dell'etanolo, i cui principali rappresentanti erano l'etilottanoato (16.80%), l'etildecanoato (12.15%), l'etilesanoato (9.19%), l'isoamilacetato (4.21%) e l'etil 9-decenoato (4.18%). Il terzo gruppo da un punto di vista quantitativo era quello degli acidi (10.50%), costituiti

prevalentemente da acidi grassi a corta catena come l'acido esanoico (4.97%), l'acido ottanoico (2.15%) e l'acido decanoico (2.23%). Le altre classi di molecole (aldeidi, chetoni e terpeni) complessivamente costituivano frazioni decisamente minoritarie della componente volatile e, per quanto incrementassero durante la fermentazione, assumevano comunque un'importanza relativa. Si può comunque sottolineare l'incremento rilevante di alcuni terpeni (linalolo e ciclogeraniolene) dipendenti probabilmente dall'attività glicosidasi associata alla comunità microbica responsabile della fermentazione.

7.2. Caratterizzazione degli impasti e dei pani ottenuti con l'aggiunta delle puree

Le puree di mirtillo e di peperone, fermentate e non, sono state utilizzate in sostituzione dell'acqua per impastare la farina durante la panificazione secondo lo schema presentato nel capitolo inerente i materiali e metodi. Al termine del processo di fermentazione dell'impasto e dopo la cottura del pane è stata analizzata la composizione in molecole volatili dei campioni. Come controllo è stato preso in considerazione un pane tradizionale impastato con acqua. Inoltre, sul prodotto crudo (impasto ad inizio e fine lievitazione) sono state fatte alcune valutazioni chimico-fisiche (pH, acidità titolabile, aumento % di volume) e sono state analizzate le concentrazioni di acidi organici, etanolo e glicerolo a fine lievitazione, dopo cioè 90 minuti dall'impastamento e dall'aggiunta di lievito di birra.

Dai dati in tabella 7.4 si nota come il pH negli impasti a fine lievitazione sia più basso nei campioni addizionati di purea rispetto al controllo, con valori minori nel caso del mirtillo, caratterizzato da una maggiore acidità (3.66 vs. 6.50 della purea di peperoni). Come prevedibile, l'utilizzo della purea fermentata determina una ulteriore riduzione del pH, e la variazione dovuta al processo fermentativo guidato è più evidente nel caso del peperone, che partiva da valori

di pH più alti rispetto al mirtillo. I risultati di TTA riflettono questo andamento, poiché i valori più alti sono riscontrati nei campioni addizionati di puree fermentate.

Per quanto riguarda lo sviluppo di volume, il campione di controllo e gli impasti addizionati di puree non fermentate hanno mostrato uno sviluppo di volume simile tra loro, e maggiore se confrontato con quello ottenuto negli impasti in cui sono state utilizzate le puree fermentate. Questo è imputabile alla maggiore acidità delle puree fermentate, che può limitare lo sviluppo di volume degli impasti a causa di una più lenta crescita dei lieviti. Infatti, questo gruppo microbico è caratterizzato da una crescita più lenta a pH di circa 4.6 (quello che caratterizza gli impasti ottenuti con l'aggiunta delle puree fermentate) rispetto a pH superiore a 5, caratterizzante gli impasti di controllo e quelli addizionati di puree non fermentate.

	Controllo	Impasto + P Mirtillo	Impasto + PF Mirtillo	Impasto + P Peperone	Impasto + PF Peperone
pH iniziale	5.5±0.10	5.14±0.06	4.64±0.06	5.76±0.04	4.60±0.01
pH finale	5.65±0.10	4.95±0.08	4.59±0.06	5.47±0.04	4.46±0.17
TTA iniziale	1.32±0.06	2.58±0.01	3.20±0.15	1.98±0.19	3.43±0.18
TTA finale	3.14±0.76	3.05±0.30	3.68±0.31	2.64±0.36	3.99±0.47
ΔVol %	240±10.0	225±21.2	175±7.1	245±7.1	175±21.2

Tabella 7.4: Analisi del pH e dell'acidità titolabile (TTA) degli impasti ad inizio e a fine fermentazione e dell'aumento percentuale di volume durante la lievitazione. I risultati sono riportati come media ± deviazione standard. P: purea fresca; PF: purea fermentata.

Per quanto riguarda il conteggio delle popolazioni microbiche dei batteri lattici e dei lieviti, i risultati mostrano andamenti diversi. Infatti, i batteri lattici non riescono a moltiplicarsi anche quando presenti in alte quantità nelle puree fermentate aggiunte. Al contrario, il carico cellulare dei lieviti, determinato fondamentalmente dall'aggiunta del lievito di birra all'atto dell'impastamento,

aumenta di circa di mezzo ciclo logaritmico nel controllo, mentre in presenza di mirtillo o delle puree fermentate si osservano aumenti leggermente inferiori.

	Controllo	Impasto + P Mirtillo	Impasto + PF Mirtillo	Impasto + P Peperone	Impasto + PF Peperone
LAB (log UFC/g) iniziali	2.55 ±0.15	2.22 ±0.18	7.42 ±0.14	3.20 ±0.19	7.92 ±0.09
LAB (log UFC/g) finali	2.60 ±0.16	2.32 ±0.10	7.25 ±0.15	3.16 ±0.12	7.74 ±0.20
Lieviti (log UFC/g) iniziali	7.15 ±0.15	7.20 ±0.11	7.08 ±0.12	7.11 ±0.15	7.25 ±0.17
Lieviti (log UFC/g) finali	7.68 ±0.09	7.55 ±0.10	7.45 ±0.12	7.49±0.07	7.36±0.08

Tabella 7.5: Concentrazioni (log UFC/g) di batteri lattici e lieviti negli impasti prima e dopo la lievitazione.

Per quanto riguarda il profilo aromatico, i risultati dei diversi impasti a fine lievitazione e dei corrispondenti pani dopo cottura sono riassunti nelle tabelle 7.6 e 7.7, che riportano il quantitativo di ogni composto, espresso sia come rapporto tra l'area del suo picco e l'area dello standard interno (4-metil, 2-pentanololo, aggiunto al campione ad una concentrazione di 3.3 mg/kg), sia come percentuale relativa di ogni composto sul totale delle aree dei composti identificati.

La composizione dei diversi campioni in relazione ai diversi gruppi chimici individuati è riportata in figura 7.2. In questo caso, nei prodotti dopo cottura nel gruppo "altri" sono stati inseriti volatili derivanti dalla cottura come pirroli, pirazine e furani.

Nell'impasto ottenuto con purea di peperone non fermentato, le aldeidi sono presenti in quantità molto ridotte (1.90% dei volatili totali) mentre i chetoni rappresentano il 5.25%, rappresentati prevalentemente da metil isobutil chetone (2.65%), già presente nelle puree. Gli alcoli sono i composti più rilevanti (82.38%), facendo seguito alla fermentazione da parte di *S. cerevisiae* aggiunto

all'impasto. In particolare, il solo etanolo rappresenta il 56.09% dei volatili totali, mentre la rilevante concentrazione dei due alcoli superiori isoamilico (11.68%) e fenilico (6.25%) è evidentemente il frutto dell'attività del lievito aggiunto, supportando quanto già osservato nel caso della fermentazione delle puree. Rispetto a questi ingredienti negli impasti decresce la rilevanza degli esteri (5.90%) rappresentati in gran parte da acetato di etile (3.15%). Questa diminuzione può essere legata alla loro volatilità (in presenza di lunghi tempi di lavorazione) e alla minore attività esterasica di *S. cerevisiae* rispetto ad *H. uvarum*, presente nelle puree fermentate (Testa et al., 2021). Anche gli acidi sono caratterizzati da una concentrazione relativamente bassa (2.32%).

L'impasto ottenuto con la purea di mirtillo non fermentata restituiva dati simili. Anche in questo caso, gli alcoli erano i composti più rappresentati (78.51% del totale), partendo dall'etanolo (44.69%), seguito da alcol isoamilico e alcol fenilico (rispettivamente 11.70 e 11.15%). Gli esteri costituivano il 5.30% dei volatili totali, di cui più della metà (2.73%) rappresentati dall'acetato di etile. Fra gli acidi (3.71%), circa un terzo (1.17%) era costituito dall'acido esanoico. Naturalmente, la composizione iniziale in molecole volatili delle puree fermentate determinava, nei campioni in cui sono state utilizzate, la presenza di una maggiore quantità di metaboliti volatili derivanti dalla prima fermentazione, che si aggiungevano alla fermentazione alcolica vera e propria operata dal lievito di birra utilizzato (figura 7.2).

Nel caso dell'impasto prodotto con la purea di peperone fermentata sono state determinate piccole quantità di aldeidi e chetoni, comparabili in linea di massima con quelle rilevate in presenza della stessa purea non fermentata. Gli alcoli, che costituivano la classe chimica più rappresentata (74.15% del totale di composti volatili rilevati), erano caratterizzati da presenze relative di etanolo (48.71%), alcol isoamilico (11.37%) e alcol fenilico (7.28%), non dissimili da quelle osservate nell'impasto ottenuto con purea non fermentata. Maggiore era invece, come atteso per i motivi sopraindicati, la presenza di esteri (13.52%), tra cui i più importanti sono esterilico dell'acido ottanoico (4.56%),

esteretico dell'acido esanoico (2.71%), acetato di etile (2.05%), acetato di isoamile (1.59%) ed esteretico dell'acido decanoico (1.44%). Queste molecole erano già i principali esteri riscontrati nella purea fermentata. Fra gli acidi, complessivamente il 4.52% dei volatili totali, le molecole più rilevanti erano l'acido esanoico, l'acido acetico e l'acido ottanoico, tutte in concentrazioni pari a poco più dell'1%. Si trovano anche, fra i terpeni, frazioni interessanti di linalolo (0.46%) anch'esse derivanti dall'attività glicosidasica svolta durante la prima fermentazione.

Gli impasti ottenuti con le puree di mirtillo fermentate ripropongono le stesse considerazioni. Al di là dello scarso apporto di aldeidi e chetoni, sono ancora una volta gli alcoli i composti maggiormente presenti nel profilo aromatico (78.89%), con il 46.99% attribuibile all'etanolo, e con quantità di alcol isoamilico (15.56%) e alcol fenilico (11.67%) più elevate a quelle riscontrate nell'impasto addizionato di purea di peperone fermentata, riflettendo non solo l'attività fermentativa del lievito di birra ma anche la maggiore quantità di questi due alcoli superiori prodotti già durante la fermentazione della purea di mirtillo (tabella 7.3). Anche gli esteri (che ammontano al 9.48% dei volatili totali) riflettono i risultati della prima fermentazione della purea e hanno come maggiore componente l'acetato di etile (3.70%), seguito da etile ottanoato (1.69%), isoamilacetato (1.43%), ed etilesanoato (1.25%). Gli acidi sono presenti in quantità ridotta (3.74%) ed in gran parte rappresentati da acido acetico (1.26%). Da ultimo occorre segnalare una rilevante presenza di linalolo (1.58%), anch'esso proveniente dalla prima fermentazione.

Per quanto concerne infine il controllo, vale a dire l'impasto ottenuto da acqua e farina e l'impiego di lievito di birra, il profilo in molecole volatili differisce dagli altri campioni sostanzialmente per una presenza molto più ridotta di esteri, limitati di fatto all'acetato di etile, indicando indirettamente quanto già osservato, ossia che la forte attività esterasica osservata nelle puree è da attribuire in maniera sostanziale all'attività del lievito *H. uvarum*. Fra gli alcoli dominano anche in questo caso, oltre ovviamente all'etanolo, l'alcol isoamilico

e l'alcol fenilico. Anche gli acidi sono stati riscontrati in quantità più basse se confrontate con i prodotti con purea fermentata ed il composto maggiormente presente è l'acido esanoico.

Tabella 7.6: Molecole d'aroma riscontrate negli impasti a fine lievitazione. I dati sono espressi sia come rapporto tra l'area del picco del composto considerato e l'area dello standard interno, sia come % relativa sul totale dei picchi. P: purea fresca; PF: purea fermentata; PEP: peperone; MIR: mirtillo. -: non riscontrato nelle condizioni di analisi.

Composti	Controllo		Imp + P PEP		Imp + PF PEP		Imp + P MIR		Imp + PF MIR	
	A/A SI	%	A/A SI	%	A/A SI	%	A/A SI	%	A/A SI	%
2-metil-butanale	1.60	0.22	1.71	0.20	0.83	0.06	1.88	0.28	0.95	0.07
3-metil-butanale	2.57	0.35	2.52	0.29	1.59	0.11	3.91	0.57	1.66	0.12
Pentanale	0.13	0.02	-	-	1.22	0.09	-	-	0.37	0.03
Esanale	0.49	0.07	0.19	0.02	5.58	0.39	1.64	0.24	1.70	0.12
Eptanale	1.11	0.15	1.42	0.17	2.26	0.16	0.86	0.13	0.78	0.05
Ottanale	0.35	0.05	0.73	0.08	1.46	0.10	0.45	0.07	0.67	0.05
Nonanale	2.37	0.32	3.80	0.44	9.38	0.66	4.03	0.59	5.73	0.40
Decanale	1.06	0.14	1.87	0.22	3.30	0.23	1.50	0.22	2.16	0.15
2-Nonanale	0.52	0.07	1.66	0.19	3.76	0.26	1.00	0.15	1.64	0.12
Benzaldeide	5.13	0.69	2.44	0.28	5.32	0.37	5.30	0.78	7.13	0.50
Benzeneacetaldeide	7.03	0.95	-	-	7.88	0.55	15.64	2.29	7.11	0.50
ALDEIDI	22.36	3.02	16.33	1.90	42.58	2.99	36.20	5.31	29.91	2.10
2,3-Butandione	0.87	0.12	1.01	0.12	1.60	0.11	1.75	0.26	2.89	0.20
Metil Isobutil Chetone	19.18	2.59	22.76	2.65	18.38	1.29	19.22	2.82	14.80	1.04
2-Ottanone	0.99	0.13	1.18	0.14	0.95	0.07	0.85	0.12	1.03	0.07
Acetoina	1.54	0.21	2.51	0.29	3.70	0.26	1.27	0.19	2.57	0.18
3-etil-Cicloesanone	5.52	0.75	6.92	0.81	7.37	0.52	4.78	0.70	6.78	0.47
2-metil-3-Decen-5-one	6.01	0.81	10.71	1.25	11.83	0.83	4.59	0.67	10.95	0.77
CHETONI	34.11	4.61	45.09	5.25	43.85	3.08	32.46	4.76	39.02	2.73
Alcol etilico	350.93	47.44	481.58	56.09	692.78	48.71	304.60	44.69	670.82	46.99
1-Propanolo	2.03	0.27	3.15	0.37	3.19	0.22	1.90	0.28	3.56	0.25
2-metil-1-Propanolo	4.66	0.63	3.04	0.35	12.25	0.86	3.28	0.48	18.18	1.27
Alcol isoamilico	93.91	12.70	100.29	11.68	161.71	11.37	79.76	11.70	222.12	15.56
1-Pentanolo	4.56	0.62	3.49	0.41	9.32	0.66	1.83	0.27	-	-
1-Esanolo	35.16	4.75	30.38	3.54	28.81	2.03	49.07	7.20	24.46	1.71
3-Esen-1-olo	-	-	0.75	0.09	-	-	3.93	0.58	-	-

1-Otten-3-olo	5.57	0.75	4.35	0.51	6.46	0.45	2.60	0.38	3.47	0.24
1-Eptanolo	8.85	1.20	8.20	0.96	8.65	0.61	3.18	0.47	2.72	0.19
2-etil-1-Esanolo	4.37	0.59	4.82	0.56	6.94	0.49	2.77	0.41	3.30	0.23
1-Ottanolo	3.81	0.51	4.89	0.57	10.93	0.77	2.05	0.30	3.08	0.22
2-Otten-1-olo	1.19	0.16	2.23	0.26	3.31	0.23	1.20	0.18	2.04	0.14
1-Nonanolo	2.70	0.37	4.80	0.56	3.71	0.26	1.58	0.23	2.62	0.18
Alcol benzilico	1.36	0.18	1.64	0.19	2.97	0.21	1.41	0.21	3.23	0.23
Alcol feniletilico	80.63	10.90	53.65	6.25	103.52	7.28	75.97	11.15	166.59	11.67
ALCOLI	599.71	81.08	707.25	82.38	1054.54	74.15	535.13	78.51	1126.18	78.89
Acetato di etile	35.25	4.77	27.05	3.15	29.18	2.05	18.64	2.73	52.80	3.70
Acetato di isoamile	4.19	0.57	3.41	0.40	22.67	1.59	3.47	0.51	20.42	1.43
Ester etilico dell'acido esanoico	2.80	0.38	3.79	0.44	38.47	2.71	4.00	0.59	17.78	1.25
Ester etilico dell'acido ottanoico	4.23	0.57	6.86	0.80	64.81	4.56	3.53	0.52	24.09	1.69
Ester etilico dell'acido decanoico	1.00	0.14	1.76	0.20	20.50	1.44	0.99	0.14	6.53	0.46
Acetato di fenile	3.77	0.51	3.80	0.44	10.12	0.71	3.37	0.49	9.71	0.68
Ester etilico dell'acido esadecanoico	2.57	0.35	4.01	0.47	6.48	0.46	2.10	0.31	3.98	0.28
ESTERI	53.81	7.28	50.68	5.90	192.23	13.52	36.11	5.30	135.30	9.48
Acido acetico	2.43	0.33	2.95	0.34	16.34	1.15	3.01	0.44	18.00	1.26
2-metil-Acido esanoico	1.52	0.21	2.53	0.29	7.46	0.52	4.03	0.59	6.80	0.48
Acido esanoico	5.09	0.69	3.42	0.40	15.08	1.06	8.00	1.17	10.48	0.73
Acido ottanoico	1.94	0.26	2.95	0.34	14.59	1.03	3.75	0.55	6.00	0.42
Acido nonanoico	2.61	0.35	5.82	0.68	6.70	0.47	4.22	0.62	9.52	0.67
Acido n-decanoico	1.40	0.19	2.22	0.26	4.10	0.29	2.24	0.33	2.54	0.18
ACIDI	15.00	2.03	19.89	2.32	64.27	4.52	25.26	3.71	53.33	3.74
ALTRI	2.40	0.32	3.07	0.36	2.61	0.18	1.91	0.28	5.01	0.35
Ciclogeraniolene	12.28	1.66	15.05	1.75	15.48	1.09	9.83	1.44	11.40	0.80
Linalolo	-	-	1.19	0.14	6.61	0.46	3.40	0.50	22.52	1.58
Geraniolo	-	-	-	-	-	-	1.27	0.19	2.65	0.19
TERPENI	12.28	1.66	16.24	1.89	22.09	1.55	14.50	2.13	38.71	2.71

Tabella 7.7: Molecole d'aroma riscontrate nei pani dopo la cottura. I dati sono espressi sia come rapporto tra l'area del picco del composto considerato e l'area dello standard interno, sia come % relativa sul totale dei picchi. P: purea fresca; PF: purea fermentata; PEP: peperone; MIR: mirtillo. -: non riscontrato nelle condizioni di analisi.

Composti	Controllo		Pane + P PEP		Pane + PF PEP		Pane + P MIR		Pane + PF MIR	
	A/A SI	%	A/A SI	%	A/A SI	%	A/A SI	%	A/A SI	%
2-metil-butanale	1.89	0.47	3.49	0.73	2.11	0.48	2.88	0.40	2.29	0.21
3-metil-butanale	1.37	0.34	2.58	0.54	1.97	0.45	2.13	0.30	1.35	0.12
Pentanale	1.05	0.26	1.04	0.22	0.98	0.22	1.48	0.21	1.55	0.14
Esanale	9.12	2.27	10.45	2.20	10.22	2.31	10.64	1.49	8.11	0.74
Eptanale	4.55	1.13	2.99	0.63	2.02	0.46	3.25	0.46	2.63	0.24
Ottanale	0.98	0.24	1.65	0.35	1.03	0.23	2.39	0.34	1.20	0.11
Nonanale	9.64	2.40	8.20	1.72	9.05	2.04	12.34	1.73	13.18	1.21
Decanale	2.46	0.61	3.06	0.64	1.87	0.42	2.43	0.34	3.89	0.36
2-Nonanale	5.58	1.39	4.85	1.02	4.81	1.09	5.19	0.73	6.87	0.63
Benzaldeide	6.14	1.53	11.87	2.50	9.83	2.22	17.40	2.44	16.27	1.49
Benzeneacetaldeide	2.80	0.70	5.18	1.09	4.97	1.12	7.03	0.99	4.98	0.46
ALDEIDI	45.57	11.36	55.35	11.65	48.87	11.04	67.18	9.43	62.32	5.71
2,3-Butandione	0.83	0.21	0.91	0.19	1.16	0.26	1.04	0.15	1.56	0.14
Metil Isobutil Chetone	14.72	3.67	18.29	3.85	12.92	2.92	15.58	2.19	12.12	1.11
2-Ottanone	0.57	0.14	0.47	0.10	0.46	0.10	0.60	0.08	1.48	0.14
Acetoina	1.75	0.44	1.88	0.40	1.15	0.26	4.79	0.67	4.53	0.42
3-etil-Cicloesanone	2.89	0.72	2.96	0.62	2.24	0.51	3.28	0.46	4.12	0.38
2-metil-3-Decen-5-one	5.43	1.35	5.59	1.18	4.60	1.04	7.25	1.02	8.86	0.81
CHETONI	26.79	6.68	30.68	6.45	22.96	5.19	33.30	4.67	33.35	3.06
Alcol etilico	149.11	37.16	188.05	39.57	148.75	33.61	290.43	40.77	460.22	42.18
1-Propanolo	0.99	0.25	1.40	0.30	0.94	0.21	1.48	0.21	2.11	0.19
2-metil-1-Propanolo	2.88	0.72	4.18	0.88	3.22	0.73	6.20	0.87	11.17	1.02
Alcol isoamilico	36.62	9.13	51.26	10.79	51.70	11.68	73.50	10.32	151.64	13.90
1-Esanolo	11.60	2.89	11.24	2.37	26.75	6.05	16.99	2.39	21.22	1.95
1-Ottan-3-olo	1.61	0.40	2.19	0.46	1.81	0.41	2.16	0.30	3.16	0.29
1-Eptanolo	2.11	0.52	1.58	0.33	0.99	0.22	1.90	0.27	2.05	0.19
2-etil-1-Esanolo	1.57	0.39	1.08	0.23	0.99	0.22	8.22	1.15	1.70	0.16

1-Ottanolo	1.01	0.25	0.84	0.18	0.78	0.18	1.62	0.23	1.43	0.13
2-Otten-1-olo	-	-	0.85	0.18	0.78	0.18	0.57	0.08	1.64	0.15
Alcol benzilico	2.71	0.68	1.62	0.34	1.14	0.26	-	-	3.38	0.31
Alcol feniletilico	37.55	9.36	20.82	4.38	46.55	10.52	63.73	8.95	145.90	13.37
ALCOLI	247.76	61.75	286.07	60.19	286.21	64.68	466.80	65.52	805.61	73.84
Acetato di etile	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato di isoamile	-	-	1.30	0.27	-	-	5.92	0.83	3.97	0.36
Ester etilico dell'acido esanoico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ester etilico dell'acido ottanoico	1.82	0.45	2.55	0.54	1.64	0.37	13.90	1.95	10.81	0.99
Ester etilico dell'acido decanoico	0.36	0.09	0.68	0.14	0.58	0.13	7.76	1.09	3.02	0.28
Acetato di fenile	1.85	0.46	1.38	0.29	0.76	0.17	3.55	0.50	6.95	0.64
Ester etilico dell'acido esadecanoico	-	-	1.51	0.32	-	-	2.21	0.31	3.95	0.36
ESTERI	4.03	1.00	7.42	1.56	2.97	0.67	33.34	4.68	28.69	2.63
Acido acetico	4.48	1.12	5.85	1.23	5.58	1.26	14.37	2.02	25.98	2.38
2-metil-Acido esanoico	2.06	0.51	3.80	0.80	5.51	1.25	10.01	1.40	12.90	1.18
Acido esanoico	1.69	0.42	1.89	0.40	5.19	1.17	7.55	1.06	7.39	0.68
Acido ottanoico	0.82	0.20	1.14	0.24	1.11	0.25	3.22	0.45	3.29	0.30
Acido nonanoico	1.24	0.31	2.12	0.45	2.70	0.61	4.72	0.66	5.99	0.55
Acido n-decanoico	1.36	0.34	1.49	0.31	1.16	0.26	2.29	0.32	3.83	0.35
ACIDI	11.64	2.90	16.29	3.43	21.24	4.80	42.15	5.92	59.38	5.44
Furfurale	11.42	2.85	13.12	2.76	21.32	4.82	14.64	2.05	27.41	2.51
5-Metilfurfurale	0.97	0.24	1.59	0.33	1.76	0.40	2.66	0.37	3.48	0.32
2-Furanmetanolo	15.39	3.84	15.09	3.17	5.72	1.29	6.95	0.98	7.95	0.73
2-pentil-Furano	10.10	2.52	8.62	1.81	7.95	1.80	14.60	2.05	15.13	1.39
Stirene	0.68	0.17	0.69	0.15	0.85	0.19	0.63	0.09	1.72	0.16
Metil Pirazina	6.95	1.73	14.51	3.05	3.57	0.81	5.79	0.81	3.51	0.32
Etil Pirazina	2.84	0.71	4.65	0.98	0.99	0.22	3.08	0.43	2.47	0.23
2,3-dimetilpirazina	1.25	0.31	2.07	0.44	0.57	0.13	0.94	0.13	0.97	0.09
2-etil-5-metil-Pirazina	1.46	0.36	1.77	0.37	0.95	0.21	1.55	0.22	1.64	0.15
Trimetil Pirazina	1.84	0.46	4.11	0.86	1.02	0.23	2.44	0.34	2.15	0.20

2-acetil furano	1.96	0.49	3.10	0.65	2.11	0.48	2.56	0.36	2.68	0.25
2-acetil pirrolo	0.76	0.19	0.99	0.21	0.59	0.13	1.18	0.17	1.84	0.17
ALTRI	55.63	13.87	70.31	14.79	47.41	10.71	57.02	8.00	70.93	6.50
Ciclogeraniolene	9.79	2.44	9.18	1.93	8.36	1.89	11.07	1.55	12.27	1.12
Linalolo	-	-	-	-	3.86	0.87	1.57	0.22	14.22	1.30
Citronellolo	-	-	-	-	-	-	-	-	2.13	0.20
Geraniolo	-	-	-	-	0.65	0.15	-	-	2.07	0.19
TERPENI	9.79	2.44	9.18	1.93	12.87	2.91	12.64	1.77	30.69	2.81

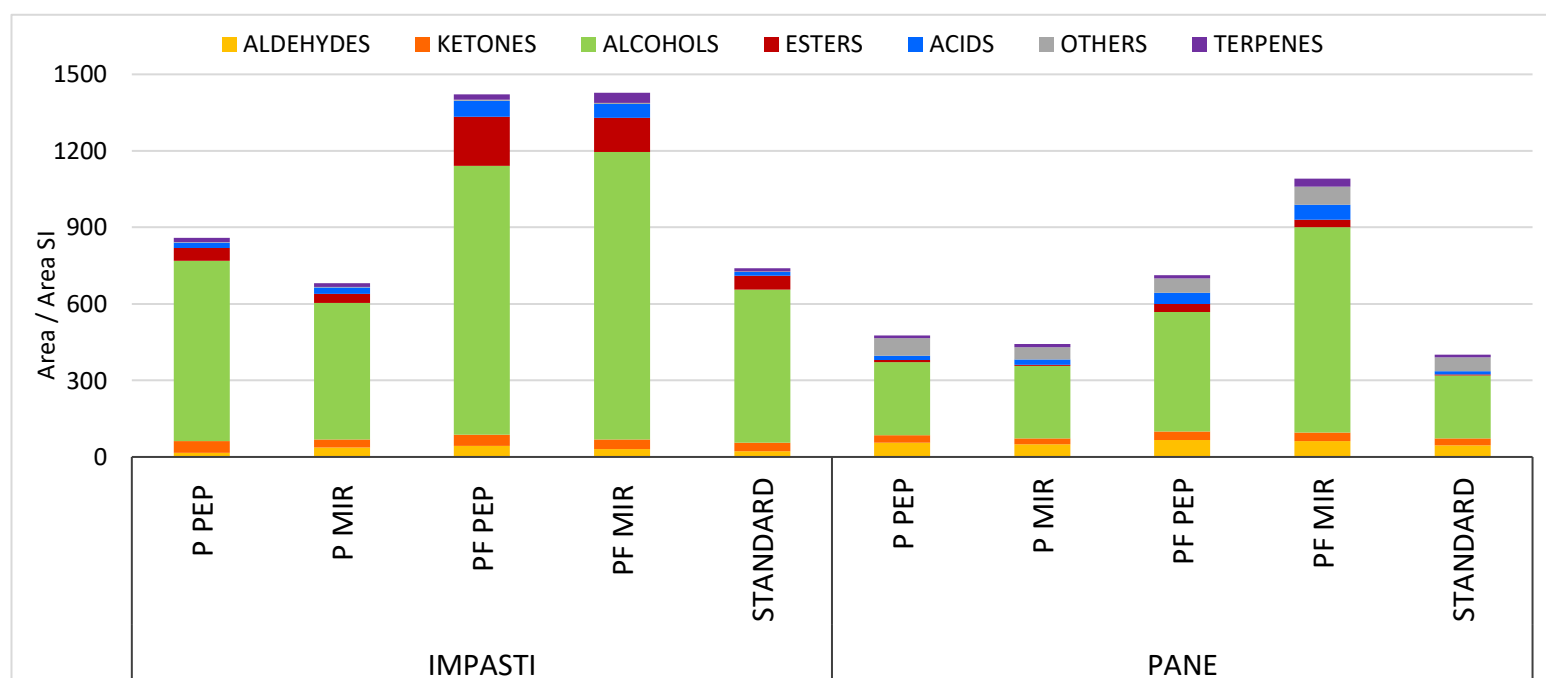


Figura 7.2: Presenza delle diverse classi di molecole d'aroma negli impasti e nei pani ottenuti con e senza l'aggiunta delle puree. I valori sono espressi come rapporto tra l'area del picco del composto considerato e l'area di uno standard interno (4-metil, 2-pentanolo) aggiunto volontariamente al campione alla concentrazione di 3.3 mg/kg.

Il processo di cottura modifica in maniera significativa la presenza di alcuni gruppi di molecole, sia perché ne favorisce la volatilità, sia perché si formano una serie di composti determinati dal calore. In generale si osserva, infatti, una generale perdita quantitativa di composti (figura 7.2) che interessa soprattutto le frazioni più volatili a cominciare dagli esteri, mentre i prodotti di nuova formazione sono costituiti prevalentemente da pirazine, furani e furfurale, che derivano fondamentalmente dalla reazione di Maillard (Troadec et al., 2022). A seguito del processo di cottura aumenta in tutti i campioni il peso relativo di aldeidi e chetoni. Nel pane prodotto con purea di peperone non fermentata queste due classi di composti rappresentano rispettivamente l'11.65 ed il 6.45%. Fra le aldeidi assumono un peso importante alcuni prodotti dell'ossidazione, come l'esanale (2.20%), il nonanale (1.72%) e il 2-nonenale (1.02%) oltre che composti derivanti da aminoacidi aromatici come benzaldeide e benzeneacetaldeide, mentre fra i chetoni rimane rilevante la presenza già osservata negli impasti di metil isobutil chetone. La frazione di volatili totali costituita dagli alcoli diminuisce a circa il 60%, mentre alcol etilico, alcol isoamilico e alcol fenilico rimangono i composti più rappresentativi di questo gruppo. Gli esteri, come osservato, riducono drasticamente il loro peso sul totale dei volatili, costituendone solamente il 1.56%. Fra gli acidi, che rappresentano il 3.43% dei composti determinati, solo l'acido acetico supera l'1%. Elevato invece il peso relativo dei composti riconducibili alla reazione di Maillard (14.79%), le cui principali molecole sono il 2-furanmetanolo, il furfurale, la metilpirazina ed il 2-pentil-furano. Risultati assolutamente analoghi sono stati riscontrati nel pane ottenuto con la purea di mirtilli, con la sola eccezione di un più ridotto livello percentuale di pirazine e di furani, ed in particolare di 2-furanmetanolo ed etilpirazina, compensato in parte da un aumento di furfurale. L'uso di puree fermentate dà luogo a profili in metaboliti volatili diversi soprattutto in relazione agli esteri che, pur diminuendo la loro concentrazione, in parte permangono nel prodotto finale. Questo dato è più evidente nel pane ottenuto da purea di peperone fermentata, dove gli esteri costituiscono il 4.68%

dei volatili totali, a fronte del 2.63% registrato in presenza di mirtillo fermentato. Da notare anche che non è stato riscontrato etil acetato e che i principali esteri sono costituiti da isoamile acetato etilottanoato ed etildecanoato. Il contenuto in composti derivanti dalla reazione di Mailaard diminuisce percentualmente in entrambi i casi. Gli altri composti chimici, a partire dagli alcoli, mostrano andamenti simili a quelli osservati nei prodotti ottenuti da puree non fermentate, se si eccettua una presenza leggermente più elevata di alcoli superiori, a partire dall'alcol fenilico. Infine, il controllo, come già osservato per il relativo impasto, presentava le presenze percentuali maggiori di acidi, chetoni ed aldeidi ed il minore contenuto di esteri. Fra gli alcoli, risaltava, come negli impasti, la minore presenza di alcoli superiori rispetto ai prodotti ottenuti da puree fermentate.

Per meglio evidenziare le differenze osservate nei profili aromatici di impasti e pane, in figura 7.3 e 7.4 è mostrato il risultato di una Principal Component Analysis (PCA) che ha preso in considerazione tutti i campioni analizzati. Nella figura sono riportati i risultati dei primi due fattori che rappresentano il 73.52% della variabilità complessiva. L'analisi condotta mostra come effettivamente le puree fermentate e i prodotti da esse ottenute siano molto diverse dagli analoghi prodotti derivanti da basi non fermentate. Risulta altresì evidente come i controlli non fermentati risultino collocati nei quadranti in posizioni molto prossime ai controlli, sia per quanto concerne l'impasto, sia relativamente al pane dopo la cottura. Nella figura 7.4 sono riportati graficamente i valori delle proiezioni delle variabili (composti di aroma) calcolati in funzione della loro correlazione con le due nuove variabili ottenute (Factor 1 e Factor 2). I singoli composti volatili sono stati evidenziati con colori diversi a seconda del gruppo chimico di riferimento. Come si può osservare, le sostanze originate dalla reazione di Maillard sono tutte collocate nel IV quadrante, assieme alle aldeidi. Gli alcoli sono collocati nel II e nel III quadrante, peraltro in modo non casuale. Infatti, gli alcoli alifatici che si formano per riduzione delle aldeidi formate dall'ossidazione (esanolo, pentanolo, ottanolo, ecc.) sono tutti collocati nel II

quadrante, mentre quelli legati più strettamente al metabolismo microbico (etanolo, alcoli superiori) sono collocati nel III quadrante. I chetoni sono anch'essi presenti nel III quadrante, ad eccezione del metil isobutil chetone, presente nella purea non fermentata. Gli acidi organici sono tutti nel III quadrante così come gli esteri, con l'eccezione dell'acetato di etile, collocato nel II. Nel III quadrante troviamo anche gli acidi ed i terpeni.

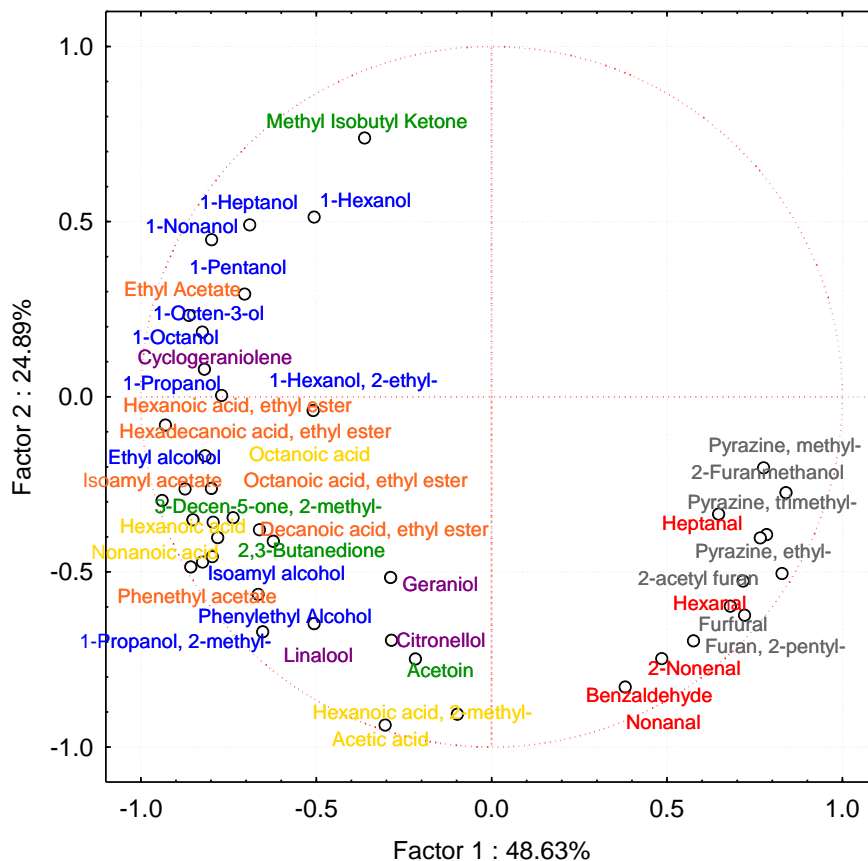


Figura 7.3: Risultati dell'analisi PCA dei metaboliti volatili riscontrati nei diversi campioni di puree, impasti dopo lievitazione e pani. Proiezione delle variabili sulle prime due componenti principali.

Sulla base di queste indicazioni, dunque, appare chiara la distribuzione dei casi rappresentata in figura 7.4. Infatti, tutti i prodotti sottoposti a cottura si collocano nella parte destra del grafico, soprattutto in relazione alla presenza esclusiva dei prodotti della reazione di Maillard e del loro contenuto in aldeidi. I prodotti ottenuti impiegando puree di frutta o verdura fermentate si trovano nella parte inferiore del grafico, soprattutto per la maggiore quantità di prodotti di fermentazione, ed in particolare esteri, alcoli superiori ed acidi organici

(esanoico, ottanoico, decanoico). La distinzione fra i pani ottenuti con puree non fermentate ed il controllo è più labile proprio in virtù della assenza di questi prodotti.

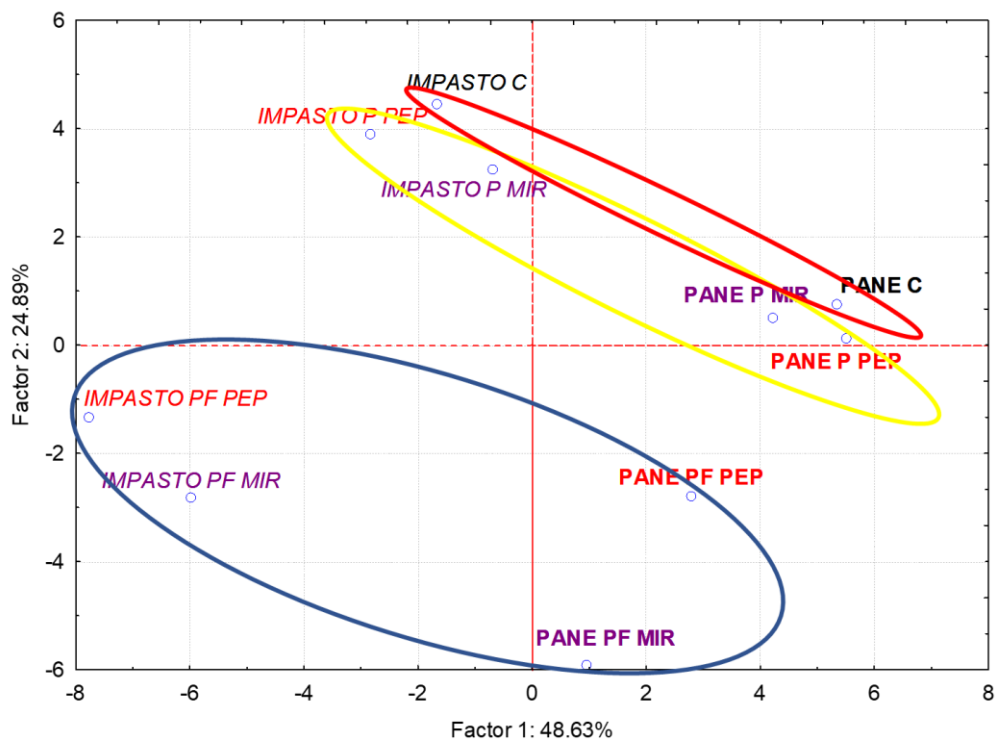


Figura 7.4: Risultati dell'analisi PCA dei metaboliti volatili riscontrati nei diversi campioni di puree, impasti dopo lievitazione e pani. Proiezione dei casi sulle prime due componenti principali.

I pani ottenuti attraverso l'impiego o meno delle puree fresche o fermentate sono stati sottoposti anche ad un'analisi organolettica, colorimetrica e visiva per valutarne l'aspetto. I pani addizionati delle puree presentavano un'altezza della fetta diversa a seconda della matrice impiegata. Infatti, il controllo e il pane ottenuto con l'aggiunta della purea fresca di peperone avevano uno sviluppo simile e più basso dei pani addizionati con le puree fermentate e con la purea fresca di mirtillo (figura 7.5).



Figura 7.5: Aspetto dei pani ottenuti durante la sperimentazione.

	L*	a*	b*
C	62.22±1.50 ^b	1.87±0.23 ^a	7.69±1.02 ^b
P MIR	54.67±3.68 ^a	5.27±0.33 ^c	5.50±0.59 ^{ab}
PF MIR	52.91±3.78 ^a	8.60±0.56 ^d	5.14±0.42 ^{ab}
P PEP	62.45±2.83 ^b	5.67±0.94 ^c	26.32±2.02 ^d
PF PEP	66.21±2.93 ^b	3.81±0.63 ^b	20.67±1.07 ^c

Tabella 7.8: Dati inerenti l'analisi colorimetrica della fetta dei pani ottenuti durante la sperimentazione. P MIR: Pane ottenuto con addizione di purea fresca di mirtillo; P PEP: Pane ottenuto con addizione di purea fresca di peperone; PF MIR: Pane ottenuto con addizione di purea fermentata di mirtillo; PF PEP: Pane ottenuto con addizione di purea fermentata di peperone.

L'analisi sensoriale effettuata dai colleghi dell'Università di Firenze ha mostrato come i pani siano stati descritti diversamente dagli assaggiatori a seconda della presenza delle diverse puree (tabella 7.9). Il pane con purea fermentata di mirtillo è stato descritto come più fruttato e fermentato, mentre quello con la purea fermentata di peperoni è risultato più acido. Il pane ottenuto con la purea di mirtillo è stato percepito come più dolce, soprattutto quello addizionato di purea fermentata. Infine, il pane di controllo viene descritto principalmente come scarsamente acido, non fruttato e leggermente dolce.

Descrittori	Controllo	P PEP	PF PEP	P MIR	PF MIR
Salato	0.5	1	0.5	1	1
Dolce	2	2	2.5	4	4.5
Acido	1	2	4	1	2.5
Fruttato	0	1	1	2	5.5
Fermentato	1	1.5	1	1.5	3.5

Tabella 7.9: Medie dei punteggi per i diversi descrittori presi in considerazione durante il test sensoriale.

8. CONCLUSIONI

Questa tesi si inserisce in un progetto più ampio basato sull'utilizzo di puree vegetali fermentate come strategia per ambire ad almeno tre risultati: 1) valorizzare sottoprodotti di altre filiere (industria delle conserve, succhi di frutta, confetture, ecc.); 2) diversificare la tradizionale offerta dell'industria panaria; 3) migliorare le caratteristiche nutritive veicolando attraverso il pane nutrienti e sostanze ad alto valore nutrizionale (polifenoli, vitamine, fibre, ecc.). In questo particolare caso, l'attenzione è stata posta soprattutto sul secondo obiettivo della ricerca. Infatti, in questo lavoro di tesi sono stati studiati gli effetti dell'addizione, durante l'impastamento nella produzione di pane, di alcune puree vegetali sulle caratteristiche degli impasti o dei pani ottenuti attraverso questo processo. Le puree sono state aggiunte in sostituzione dell'acqua usata per impastare la farina e sono state impiegate fresche o fermentate da un consorzio microbico precedentemente selezionato e costituito da batteri lattici e lieviti isolati dagli stessi vegetali fermentati spontaneamente. Sono stati quindi confrontati cinque impasti dopo la lievitazione e i cinque pani ottenuti dopo la loro cottura: un controllo da impasto con acqua e farina, due pani ottenuti impastando la farina con le puree non fermentate di peperoni e mirtilli e due pani ottenuti impastando la farina con le puree fermentate di peperoni e mirtilli. In tutti è stato addizionato lievito di birra durante l'impastamento.

La prefermentazione subita dalle puree ha mostrato risultati interessanti portando ad un rilevante sviluppo di un profilo di sostanze volatili estremamente complesso che almeno parzialmente è stato trasferito al pane. Importanti differenze sono tuttavia state rilevate sul risultato finale, dovute anche al pH iniziale delle puree. Infatti, l'elevata acidità della purea di mirtillo ha decisamente favorito le attività dei lieviti rispetto ai LAB. Tuttavia, anche nel caso del peperone, il prodotto fermentato aveva un pH finale molto basso, difficilmente sostenibile dai batteri lattici.

Da un punto di vista puramente aromatico, infatti, la differenza fra il pane e l'impasto tradizionale contenente solo acqua, ed i corrispettivi ottenuti con puree non fermentate era molto ridotta, se non indistinguibile secondo i risultati ottenuti dalla PCA, ed il profilo complessivo è dunque attribuibile in maniera preponderante al lievito di birra aggiunto durante la formazione dell'impasto. I dati sui profili in molecole di aroma hanno mostrato che l'aggiunta delle puree fermentate ha invece fortemente caratterizzato gli impasti e i pani ottenuti, che mostrano una maggiore complessità aromatica rispetto a quelli contenenti le puree non fermentate. Non a caso, l'analisi del profilo aromatico metteva chiaramente in evidenza molecole riconducibili ai lieviti, a partire dagli alcoli, ed in particolare una elevata presenza di alcoli superiori, e soprattutto una grande quantità di esteri, responsabili di note floreali e fruttate, in gran parte attribuibili alla presenza di *H. uvarum* che dunque dà una importante connotazione al prodotto finale. Ciò è particolarmente evidente nel pane ottenuto con l'aggiunta di purea fermentata di mirtillo, che presenta il profilo aromatico più ricco, soprattutto per quanto riguarda gli alcoli (con elevate presenze di alcol etilico e isoamilico).

I pani sono risultati diversi anche per quanto riguarda alcune caratteristiche visive, poiché i pani con puree non fermentate mostravano un volume maggiore rispetto ai pani con puree fermentate. Questo può essere dovuto alla maggiore acidità delle puree fermentate che può limitare la lievitazione e il conseguente volume specifico dei pani.

Queste differenze non hanno però avuto effetti negativi sull'accettabilità dei prodotti. Infatti, i test sensoriali effettuati hanno mostrato che i pani ottenuti con l'aggiunta delle puree all'impasto avevano profili di dolcezza, acidità e fruttato diversi. In particolare, i pani con puree di mirtillo risultano essere più particolari e interessanti, rispetto al pane di controllo che è stato giudicato più insipido.

Questa tesi rappresenta un primo studio dell'utilizzo di puree di mirtillo e peperone, fermentate o meno, per l'ottenimento di pani arricchiti, mostrando interessanti potenzialità di impiego. Infatti, non sono stati messi in luce difetti

sensoriali o strutturali dei prodotti ma, al contrario, è stata evidenziata un'interessante ed aumentata complessità aromatica sia negli impasti che nei pani ottenuti.

L'impiego di consorzi microbici selezionati e caratterizzati per la fermentazione di queste puree vegetali può rappresentare quindi una valida strategia per incrementare la differenziazione dei prodotti, ottenendo profili aromatici e sensoriali complessi, con caratteristiche tecnologiche e strutturali adeguate, e sviluppando prodotti con caratteristiche peculiari. Questo approccio permetterebbe anche di valorizzare matrici vegetali sovra-mature e destinate allo scarto o parti di vegetali non impiegate comunemente nelle produzioni (es bucce ecc.), riducendo gli scarti e valorizzando alcune filiere produttive. Nelle fasi successive della ricerca si studieranno anche gli impatti di queste addizioni sul profilo nutrizionale e funzionale dei pani ottenuti, andando anche a ricercare i composti bioattivi (vitamine, antiossidanti, fibre) che potrebbero incrementare il valore nutrizionale dei prodotti ottenuti.

9. BIBLIOGRAFIA

Adams, A., De Kimpe, N. (2006). Chemistry of 2-acetyl-1-pyrroline, 6-acetyl-1, 2, 3, 4-tetrahydropyridine, 2-acetyl-2-thiazoline, and 5-acetyl-2, 3-dihydro-4H-thiazine: extraordinary Maillard flavor compounds. *Chemical Reviews*, 106(6), 2299-2319.

Alashi, A. M., Taiwo, K. A., Oyedele, D. J., Adebooye, O. C., Aluko, R. E. (2019). Polyphenol composition and antioxidant properties of vegetable leaf-fortified bread. *Journal of Food Biochemistry*, 43(6), e12625.

Albertin, W., Setati, M. E., Miot-Sertier, C., Mostert, T. T., Colonna-Ceccaldi, B., Coulon, J., Girard, P., Moine, V., Pillet, M., Salin, F., Bely, M., Divol, B., Masneuf-Pomarede, I. (2016). *Hanseniaspora uvarum* from winemaking environments show spatial and temporal genetic clustering. *Frontiers in microbiology*, 6, 1569.

Akhtar, A., Asghar, W., Khalid, N. (2021). Phytochemical constituents and biological properties of domesticated capsicum species: a review. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, 4(9), 201-225.

Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. *Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker-*, 139, 1-66.

Betoret, E., Rosell, C. M. (2020). Enrichment of bread with fruits and vegetables: Trends and strategies to increase functionality. *Cereal Chemistry*, 97(1), 9-19.

Beyer, P. (2010). Golden Rice and 'Golden' crops for human nutrition. *New Biotechnology*, 27(5), 478-481.

Bianco, L., Marucchi, M. (1991). Farine, pane e miglioratori: determinazione degli acidi in HPLC. *Industrie alimentari (Pinerolo)*, 30(295), 625-634.

Chentouf, H. F., Zineb, B. (2013). Isolation and identification of *Leuconostoc mesenteroides* producing bacteriocin isolated from Algerian raw camel milk. *African Journal of Microbiology Research*, 7(23), 2961-2969.

- Cozzani, I., Dainese, E., (2006). *Biochimica degli alimenti e della nutrizione*. Piccin Nuova Libreria.
- Danza, A., Mastromatteo, M., Cozzolino, F., Lecce, L., Lampignano, V., Laverse, J., Del Nobile, M. A. (2014). Processing and characterization of durum wheat bread enriched with antioxidant from yellow pepper flour. *LWT-Food Science and Technology*, 59(1), 479-485.
- Di Cristo, C., Marinato, E., Zaghini, C., Sapiante, P. (2019). Le fermentazioni spontanee nei prodotti da forno. *Italian Gourmet Edizioni*.
- Fachinello, J. C. (2008). Blueberry. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30.
- Farneti, B., Khomenko, I., Grisenti, M., Ajelli, M., Betta, E., Algarra, A. A., Cappellin, L., Aprea E., Gasperi, F., Biasoli, F., Giongo, L. (2017). Exploring blueberry aroma complexity by chromatographic and direct-injection spectrometric techniques. *Frontiers in plant science*, 8, 617.
- Farris, G. A., Gobbetti, M., Neviani, E., Vincenzini, M. (2012). *Microbiologia dei prodotti alimentari*. Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
- Fellows, P. J. (2017). 15—Smoking. In P. J. Fellows (Ed.), *Food processing technology* fourth edition, pp. 717-732.
- Frasse, P., Lambert, S., Richard-Molard, D., Chiron, H. (1993). The influence of fermentation on volatile compounds in French bread dough. *LWT-Food Science and Technology*, 26(2), 126-132.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., De Vincenzi, S. (1995). The surdough microflora. Characterization of heterofermentative lactic acid bacteria based on acidification kinetics and impedance test. *Italian journal of food science*, 7(2), 103-111.
- Holland, R., Liu S.Q. (2011). Lactic acid bacteria | *Leuconostoc spp* J.W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (second edition), Academic Press, San Diego, pp. 138-142.
- Klaenhammer, T. R., Barrangou, R., Buck, B. L., Azcarate-Peril, M. A., Altermann, E. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 393-409.

Legge n. 580 (4 luglio 1967).

Legge n. 146 (22 febbraio 1994) – DPR n. 502 (30 novembre 1998), articolo 3 e 4.

Marín, A., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I. (2004). Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum L.*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(12), 3861-3869.

Martino, M. E., Bayjanov, J. R., Caffrey, B. E., Wels, M., Joncour, P., Hughes, S., Gillet, B., Kleerebezem, M., Hijum, S., Leulier, F. (2016). Nomadic lifestyle of *Lactobacillus plantarum* revealed by comparative genomics of 54 strains isolated from different habitats. *Environmental microbiology*, 18(12), 4974-4989.

Mills, S., Serrano, L., Griffin, C., O'Connor, P. M., Schaad, G., Bruining, C., Hill, H., Ross, P., Meijer, W. C. (2011). Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* LMG P-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese. In *Microbial cell factories* (Vol. 10, No. 1, pp. 1-11). BioMed Central.

Moschetti, G., Francesca, N., Settanni, L. (2013). 5. Fermentazione spontanea e fermentazione in purezza. *La tipicità attraverso le biotecnologie*, 43.

Muscolo, A., Papalia, T., Mallamaci, C., Carabetta, S., Di Sanzo, R., Russo, M. (2020). Effect of organic fertilizers on selected health beneficial bioactive compounds and aroma profile of red Topepo sweet pepper. *Foods*, 9(9), 1323.

Norberto, S., Silva, S., Meireles, M., Faria, A., Pintado, M., Calhau, C. (2013). Blueberry anthocyanins in health promotion: A metabolic overview. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1518-1528.

Palmeri, P. (2007). La tradizione e l'uso del pane nel Mediterraneo. Spunti per un'indagine antropologica. *Narrare i Gruppi. Prospettive Cliniche e Sociali*, 2, 1-25.

- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS microbiology*, 6(1), 1.
- Pico, J., Bernal, J., Gómez, M. (2015). Wheat bread aroma compounds in crumb and crust: A review. *Food Research International*, 75, 200-215.
- Poinot, P., Arvisenet, G., Grua-Priol, J., Colas, D., Fillonneau, C., Le Bail, A., Prost, C. (2008). Influence of formulation and process on the aromatic profile and physical characteristics of bread. *Journal of Cereal Science*, 48(3), 686-697.
- Prost, C., Poinot, P., Arvisenet, G., Rannou, C. (2020). Bread aroma. *Breadmaking*, 467-515.
- Rader, J. I., Weaver, C. M., Angyal, G. (2000). Total folate in enriched cereal-grain products in the United States following fortification. *Food Chemistry*, 70(3), 275-289.
- Ragaei, S., Seetharaman, K., Abdel-Aal, E. S. M. (2014). The impact of milling and thermal processing on phenolic compounds in cereal grains. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(7), 837-849.
- Reshmi, S. K., Sudha, M. L., Shashirekha, M. N. (2017). Starch digestibility and predicted glycemic index in the bread fortified with pomelo (*Citrus maxima*) fruit segments. *Food Chemistry*, 237, 957– 965.
- Saleh, A. S., Wang, P., Wang, N., Yang, S., Xiao, Z. (2019). Technologies for enhancement of bioactive components and potential health benefits of cereal and cereal-based foods: Research advances and application challenges. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(2), 207-227.
- Schieberle, P. (1990). The role of free amino acids present in yeast as precursors of the odorants 2-acetyl-1-pyrroline and 2-acetyltetrahydropyridine in wheat bread crust. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 191(3), 206-209.

Testa, B., Coppola, F., Lombardi, S. J., Iorizzo, M., Letizia, F., Di Renzo, M., Succi, M., Tremonte, P. (2021). Influence of *Hanseniaspora uvarum* AS27 on chemical and sensorial characteristics of aglianico wine. *Processes*, 9(2), 326.

Torres, S., Verón, H., Contreras, L., Isla, M. I. (2020). An overview of plant-autochthonous microorganisms and fermented vegetable foods. *Food Science and Human Wellness*, 9(2), 112-123.

Troadec, R., Nestora, S., Niquet-Léridon, C., Marier, D., Jacolot, P., Sarron, E., Regnault, S., Anton, P. M., Jouquand, C. (2022). Effect of leavening agent on Maillard reaction and the bifidogenic effect of traditional French bread. *Food Chemistry*, 133387.

Villamiel, M., Del Castillo, M. D., Corzo, N. (2006). Browning reactions. *Food biochemistry and food processing*, 71-100.

Zambonelli, C., Tini, V., Giudici, P., Grazia, L., (2001). *Microbiologia degli alimenti fermentati*. Casa Editrice Calderini Edagricole.

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., O'Toole, P., W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G., E., Ganzle, M., G., Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), 2782-2858.