



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

ASPETTI NUTRIZIONALI E FUNZIONALI
DEI LIEVITATI PRODOTTI MEDIANTE
LIEVITAZIONE NATURALE

Nutritional and functional features of leavened baked
goods manufactured using sourdough

TIPO TESI: compilativa

Studente:
MARCO SALVUCCI

Relatore:
PROF.SSA LUCIA AQUILANTI

Correlatore:
PROF. MASSIMO MOZZON

Correlatore:
DOTT.SSA FEDERICA CARDINALI

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

A colui che per primo,
nella notte dei tempi,
raccolse una spiga e ne fece pane.

E ai fornai,
che hanno consacrato la loro vita all'*arte bianca*.

SOMMARIO

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI.....	5
Pane e prodotti da forno.....	5
Il ruolo dei lievitati nella dieta.....	7
Scopo.....	8
CAPITOLO 1 LIEVITO NATURALE.....	10
1.1 Impiego e tipologie.....	11
1.1.1 Produzione e caratteristiche.....	11
1.1.2 Conservazione.....	12
1.1.3 Classificazione.....	14
1.1.4 Utilizzo.....	17
1.2 Microflora e fattori ecologici caratterizzanti.....	18
1.2.1 Batteri lattici.....	20
1.2.2 Lieviti.....	22
1.2.3 Associazioni.....	23
1.2.4 Fattori caratterizzanti l'ecologia microbica.....	24
1.3 Cenni sui principali ruoli del lievito naturale.....	26
CAPITOLO 2 RUOLI FUNZIONALI DEL LIEVITO NATURALE.....	29
2.1 Riduzione dell'indice glicemico.....	30
2.2 Incremento di concentrazione di fibra alimentare e sintesi di esopolisaccaridi.....	32
2.2.1 Solubilizzazione della fibra.....	33
2.2.2 Sintesi di esopolisaccaridi.....	34
2.3 Riduzione di composti associati alla sindrome dell'intestino irritabile.....	35
2.4 Aumento della biodisponibilità di minerali.....	37
2.5 Diminuzione delle proprietà allergeniche e aumento della tolleranza del grano.....	39
2.5.1 Allergia al grano.....	40
2.5.2 Celiachia.....	41
2.5.3 Meccanismi di azione dei batteri lattici e prospettive.....	42
2.6 Aumento del contenuto di composti bioattivi.....	43

2.6.1 Composti fitochimici	44
2.6.2 Peptidi, aminoacidi e derivati	45
2.6.3 Vitamine	47
2.7 Abbassamento del contenuto di sale e controllo dell'ipertensione.....	48
CAPITOLO 3 PRODOTTI DA FORNO FUNZIONALI CON INGREDIENTI ALTERNATIVI E	
LIEVITO NATURALE.....	51
3.1 Sottoprodotti della molitura.....	52
3.1.1 Crusca	52
3.1.2 Germe	54
3.2 Legumi.....	55
3.3 Pseudo-cereali.....	57
CONCLUSIONI	61
ELENCO DELLE TABELLE.....	63
ELENCO DELLE FIGURE	64
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI.....	65
BIBLIOGRAFIA	67

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Pane e prodotti da forno

I prodotti da forno (PDF) sono alimenti di origine antichissima, preparati a partire da una miscela di acqua e farina, sottoposta all'azione del calore. Nel corso dei millenni, questi prodotti hanno accompagnato l'evoluzione dell'uomo, assumendo un ruolo centrale nella definizione degli aspetti socio-economici, spirituali e nutrizionali dei popoli di diverse aree geografiche (McGee, 2016). All'interno di tale categoria alimentare, sono indicati come lievitati quei prodotti che manifestano un aumento di volume prima e/o durante la cottura, processo chiamato lievitazione (dal francese *levain*, sollevare). I PDF lievitati si distinguono ulteriormente in base all'agente lievitante impiegato, che può essere di natura chimica o di natura biologica. Il lievito chimico è costituito da uno o più composti i quali, a seguito dell'impastamento e/o della cottura, reagiscono chimicamente liberando gas (principalmente anidride carbonica, CO₂). Gli agenti lievitanti biologici, invece, sono rappresentati da microrganismi, in particolare lieviti e/o batteri lattici, i quali, attraverso processi metabolici, utilizzano i nutrienti delle materie prime liberando anidride carbonica, a seguito dell'impastamento e nelle prime fasi della cottura (Quaglia, 1984). In entrambi i casi, i gas liberati rimangono intrappolati all'interno dell'impasto, la cui struttura di base è rappresentata da un reticolo proteico con proprietà visco-elastiche, il glutine; quest'ultimo è capace di resistere alla pressione e di estendersi contemporaneamente, permettendo l'aumento di volume del prodotto, senza rotture. Il glutine si forma in fase di impastamento, grazie all'applicazione di forza meccanica alla miscela di acqua e farina, a seguito delle interazioni tra le proteine che caratterizzano la farina stessa (gliadine e glutenine).

Agente lievitante, acqua e farina sono quindi gli ingredienti primari dei PDF lievitati, i quali possono essere considerati delle varianti più o meno complesse del pane, la cui ricetta prevede l'aggiunta opzionale di sale comune (cloruro di sodio), come riportato dalla definizione legislativa italiana (Legge n. 580 del 4 luglio 1967 e s.m.i.). Queste quattro materie prime sono determinanti nella definizione delle caratteristiche tecnologiche, nutrizionali e sensoriali del prodotto finale.

Tuttavia, l'ingrediente che distingue i PDF lievitati dagli altri alimenti a base di acqua e farina è il lievito¹. Per la produzione di torte salate e dolci, sia secchi che soffici, si utilizzano agenti lievitanti chimici; per il pane, le torte da forno e i dolci delle ricorrenze, invece, si utilizzano agenti lievitanti biologici. La lievitazione biologica è anche chiamata fermentazione, termine generico per esprimere la principale attività metabolica dei microrganismi che utilizzano gli zuccheri della farina per il proprio sviluppo, liberando metaboliti di scarto tra cui la CO₂. Didatticamente, la fermentazione può essere definita “mista” o “da lieviti”. La prima è operata da una microflora di lieviti e batteri lattici, che caratterizzano il lievito *naturale* (vedi cap. 1). La fermentazione da lieviti, invece, è realizzata esclusivamente da ceppi selezionati di *Saccharomyces cerevisiae*, in genere aggiunti alla ricetta come biomassa cellulare compressa (lievito compresso, panetto o lievito di birra, con una concentrazione pari a 10⁹-10¹⁰ unità formanti colonie per grammo, UFC/g). Il lievito svolge fermentazione alcolica, metabolizzando gli zuccheri in CO₂, etanolo e altri metaboliti secondari; la prima viene trattenuta dalla maglia glutinica, portando all'aumento di volume del prodotto; mentre il secondo volatilizza in cottura, determinando, insieme con l'espansione della CO₂ e la produzione di vapore acqueo, un ulteriore incremento di volume del prodotto finito (Guerzoni & Gianotti, 2010). Il lievito di birra viene utilizzato in percentuali variabili tra lo 0,5 e il 3% dell'impasto, a seconda che venga unito a tutti gli ingredienti della ricetta in un'unica soluzione (panificazione diretta) oppure utilizzato per realizzare un pre-impasto con acqua e farina (biga o *poolish*, in base all'idratazione) che viene lasciato fermentare per 4-18 ore ad una temperatura tra 18-28 °C e poi miscelato alla restante quota di acqua e farina e ad eventuali ingredienti aggiuntivi per l'impasto finale (panificazione indiretta). L'aggiunta delle materie prime in più riprese classifica anche la lievitazione mista con lievito *naturale* tra i processi di panificazione indiretta. Il lievito industriale, inoltre, può essere utilizzato congiuntamente con il lievito *naturale*, allo scopo di ottenere i vantaggi della lievitazione mista in tempi più brevi (panificazione rapida).

Come introdotto, dalla ricetta del pane (acqua, farina, lievito e sale) derivano numerose tipologie di PDF lievitati, che si differenziano principalmente per dimensione, forma e presenza di altri ingredienti, sia nella formulazione iniziale (grassi, zuccheri, frutta secca, ecc.) che nel prodotto finito (glasse, farciture, ecc.). In ogni caso, il processo produttivo è

¹ Il termine “lievito” è utilizzato con diversi significati: microbiologicamente, per indicare un gruppo di microrganismi eucarioti, funghi unicellulari; colloquialmente, è sinonimo di agente lievitante, inteso come produttore di gas; in quest'ultimo caso, per indicare una precisa specie microbica, *Saccharomyces cerevisiae* (lievito industriale) oppure un impasto di acqua e farina con lieviti e batteri, quando seguito dall'aggettivo *naturale*.

caratterizzato dalle medesime fasi fondamentali: impastamento, lievitazione, formatura e cottura. Dapprima gli ingredienti vengono miscelati e sottoposti all'applicazione di una forza meccanica, fondamentale per permettere le interazioni tra le proteine che costituiranno il glutine. Successivamente, si mantiene l'impasto ad una determinata temperatura per un certo tempo al fine di determinarne l'aumento in volume, grazie all'azione degli agenti lievitanti e alle proprietà viscoelastiche del glutine (puntata). Quindi si esegue la spezzatura e la formatura, generalmente seguite da un'ulteriore fase di lievitazione (appretto). Il processo termina con la cottura, ovvero la somministrazione di calore che determina un'ulteriore espansione in volume e la differenziazione della mollica e della crosta (Lipetskaia, 2003). Ciascuna di queste fasi concorre alla definizione delle caratteristiche tecnologiche, sensoriali e nutrizionali dei prodotti da forno. In particolare, la lievitazione porta all'ottenimento di alimenti con proprietà uniche, sensibilmente differenti rispetto alle materie prime di partenza e strettamente correlate alla tipologia di agente lievitante impiegato.

Il ruolo dei lievitati nella dieta

Lo sviluppo e la diffusione del pane, cui fa seguito quelli dei lievitati, sono certamente dovuti al suo ruolo nella dieta, ovvero all'apporto di macro- e micro-nutrienti. Per questo motivo, il pane è stato sempre al centro dell'alimentazione umana, specie in Europa, a partire dalla sua scoperta in età antica fino all'epoca contemporanea (Nicoud, 2015; Gentilcore, 2015). Tale posizione è avvalorata dalla presenza del pane tra gli alimenti caratterizzanti la Dieta Mediterranea, un modello nutrizionale ispirato agli stili alimentari tradizionali dei paesi che si affacciano sul Mediterraneo. Da una rappresentazione grafica di quest'ultima nasce la Piramide Alimentare, che classifica le diverse categorie di alimenti in funzione della loro importanza per la dieta; il pane, insieme con la pasta e i cereali, preferibilmente integrali, è posizionato alla base, a indicare una frequenza di consumo quotidiana (D'Alessandro & De Pergola, 2014). In particolare, le Linee Guida per una sana alimentazione del Centro di ricerca CREA - Alimenti e nutrizione raccomandano il consumo di 2-4 porzioni standard (50 g) di pane al giorno, in funzione del fabbisogno nutrizionale. Per quanto riguarda i PDF invece, siano essi lievitati che non, sono indicate 5 porzioni (30-50 g) a settimana, a causa del loro maggiore apporto calorico.

Nonostante l'importanza dietetica, a partire del XX sec. il consumo di pane è andato incontro a una notevole diminuzione, che si è accentuata negli ultimi decenni; in Italia, ad esempio, si è passati da più di un chilogrammo pro-capite al giorno nel 1861 a 230 g nel 1980, per arrivare a 98 g nel 2013 (Mocarelli & Vaquero Pineiro, 2015). Ciò può essere

dovuto a diversi fattori che hanno determinato un cambiamento delle abitudini alimentari: la maggiore disponibilità di alimenti di origine animale, la diffusione dei succedanei del pane (snack, cracker e grissini) e l'aumento dei pasti fuori casa (Mocarelli & Vaquero Pineiro, 2015). Tuttavia, secondo un sondaggio Italmopa del 2019, il principale motivo di esclusione del pane dall'alimentazione sembra essere di natura dietetica e salutistica. Infatti, parallelamente alla crescente attenzione al rapporto cibo-salute, oggi si assiste a una sempre maggiore avversione per i cereali e i loro derivati, ritenuti erroneamente responsabili dell'aumento di peso e di numerosi disturbi alimentari. Questo si traduce in un nuovo *trend* dei consumi, che vede un calo drastico del pane bianco a fronte di un leggero aumento delle vendite di pane con farine di frumento integrale e multi-cereali, specie se biologiche e da "grani antichi" o macinatura a pietra. Inoltre, da alcuni decenni, si è riscoperto l'utilizzo della lievitazione mista come alternativa più salutare rispetto a quella con lievito di birra. Sebbene un giudizio così netto tenda a un approccio ideologico della questione, i benefici del lievito *naturale* sono ampiamente dimostrati dalla letteratura scientifica. In risposta al dilagare della "carbofobia", invece, si stanno diffondendo sempre di più PDF a ridotto contenuto di carboidrati, prodotti con farine di legumi, o arricchiti di componenti benefiche per la salute, come fibre alimentari. Questo fenomeno è soprattutto dovuto al crescente interesse dei consumatori verso prodotti che abbiano da un lato un minore apporto calorico e dall'altro un ruolo benefico (Italmopa, 2020). Tali aspetti si inseriscono nel più ampio contesto della visione salutistica degli alimenti, ai quali si richiedono non solo il soddisfacimento del bisogno di cibarsi e l'apporto di nutrienti ma anche effetti positivi sul benessere del corpo. Da qui nasce la definizione dell'aggettivo "funzionale", associato agli alimenti il cui consumo contribuisce al miglioramento dello stato di salute e/o alla protezione dalle malattie legate all'alimentazione (Bigliardi & Galati, 2013).

Scopo

L'obiettivo del presente lavoro di Tesi è quello di valutare il contributo della fermentazione operata da lievito *naturale* nel miglioramento delle caratteristiche nutrizionali e funzionali dei prodotti da forno lievitati, con l'intento di valorizzarne il ruolo dietetico nel panorama delle nuove abitudini alimentari umane.

A seguito di una trattazione sulla definizione, le caratteristiche e l'utilizzo del lievito *naturale*, con focus sugli aspetti microbiologici, verranno passate in rassegna le attuali evidenze sul ruolo dello stesso nella riduzione dell'indice glicemico, nell'aumento della biodisponibilità di minerali, nella diminuzione delle proprietà allergeniche e nell'aumento

della tolleranza in alcuni gruppi della popolazione, nell'abbassamento del contenuto in sale e nel controllo dell'ipertensione, nella riduzione di composti associati alla sindrome del colon irritabile, nella sintesi di composti bioattivi, nell'incremento di fibra alimentare e nella sintesi di esopolisaccaridi. In ultimo, verrà riportato lo stato dell'arte in merito al ruolo del lievito *naturale* nello sfruttamento del potenziale nutrizionale e funzionale di farine non convenzionali (legumi e pseudo-cereali) e sottoprodotti della molitura (crusca e germe).

Capitolo 1

LIEVITO NATURALE

Il lievito *naturale* è un agente lievitante biologico tradizionalmente utilizzato in tutto il mondo per la produzione di PDF. La sua scoperta risale a circa 3500 anni fa, presumibilmente a seguito di un evento fortuito. Si ritiene, infatti, che un'inondazione del fiume Nilo abbia determinato la formazione di una miscela di acqua e farina, la quale, dopo essere stata lasciata qualche giorno al caldo, manifestò un aumento di volume. Tale miscela, una volta unita ad altro impasto fresco, diede vita, dopo un certo tempo e a seguito di cottura, a un pane leggero, morbido e dal retrogusto acidulo (Di Giandomenico, 2010). Tale aneddoto storico è utile a comprendere le proprietà peculiari del lievito *naturale*, che può essere definito come una miscela di acqua e farina, la cui microflora autoctona viene lasciata fermentare spontaneamente così da conferire allo stesso capacità lievitante e acidificante (De Vuyst & Neysens, 2005; Gobbetti, 1998). Coerentemente a quest'ultimo ruolo, un sinonimo utilizzato di frequente, specie nel linguaggio tecnico, è impasto acido, tradotto in inglese con *sourdough*.

Il lievito *naturale* ha rappresentato l'agente lievitante predominante fino alla fine del XIX sec., quando è stato quasi totalmente sostituito dal lievito di birra, principalmente per semplificare il processo produttivo dei PDF lievitati e standardizzarne la qualità (Corsetti *et al.*, 2010). Tuttavia, alcuni panificatori artigiani hanno continuato ad utilizzarlo fino al giorno d'oggi, in cui si assiste ad una riscoperta del suo impiego per il miglioramento delle caratteristiche sensoriali, nutrizionali e tecnologiche che è in grado di apportare ai PDF (Corsetti & Settanni, 2007). Oggigiorno, in molti paesi del mondo, il lievito *naturale* è utilizzato per la produzione di numerose tipologie di lievitati tradizionali, sia in ambito artigianale che industriale, sia dolci (es. cornetto e brioche da colazione, Panettone, Pandoro e dolci delle ricorrenze) che salati (pizza, cracker, grissini e pane). Nel nostro Paese, più del 30% dei prodotti di panetteria sono prodotti sfruttando lievito *naturale*; tra questi, troviamo principalmente pane tipici e locali, in genere di grande pezzatura, alcuni dei quali tutelati da marchi di qualità (es. Pane di Altamura DOP, Pane casareccio di Genzano IGP) o inseriti nell'Elenco nazionale dei prodotti agroalimentari tradizionali regionali (es. Pane a

lievitazione naturale e Pane di Chiaserna, nelle Marche). Fuori dall'Italia, il lievito *naturale* è utilizzato oltre che per la produzione di pani caratteristici, come il *pain au levain* francese o il pane di San Francisco negli Stati Uniti, anche per la produzione di pane di segale, specie in Germania e nei Paesi scandinavi, e di pane integrale (Corsetti *et al.*, 2010; De Vuyst & Neysens, 2005).

1.1 Impiego e tipologie

Probabilmente a causa della sua storicità, della diffusione in numerosi paesi del mondo e dell'utilizzo tradizionalmente empirico, il lievito *naturale* presenta una notevole diversità di metodi di produzione, conservazione e utilizzo, nonché di tipologie e caratteristiche, che contribuisce a differenziare la qualità dei PDF in cui è impiegato.

1.1.1 Produzione e caratteristiche

Tradizionalmente, il lievito *naturale* viene prodotto a partire da un impasto di farina e acqua, mantenuto in genere tra 20-30 °C per circa 24-48 ore, al fine di permettere lo sviluppo dei microrganismi ad esso naturalmente associati. Successivamente, si procede mediante la pratica del rinfresco (*back-slopping*), inoculando una frazione dell'impasto fermentato in una nuova miscela di acqua e farina e lasciando fermentare in condizioni simili di tempo e temperatura, allo scopo di permettere il proseguimento dell'attività microbica. Tale procedimento viene ripetuto, ad intervalli di tempo definiti, in genere ogni 24 ore, fino al raggiungimento di un equilibrio microbico caratterizzato dalla dominanza di batteri lattici e lieviti, che si manifesta generalmente entro 7-10 giorni. Tale equilibrio può essere valutato in maniera empirica osservando l'acquisizione di una capacità lievitante (aumento in volume) e acidificante (gusto acidulo) costanti da parte del lievito *naturale*, che a questo punto potrà essere chiamato lievito madre o capolievito (Montanari, 2018).

Come accennato sopra, tale processo è soggetto a diverse variazioni. Al primo impasto, infatti, possono essere aggiunti altri ingredienti, con l'obiettivo di apportare nutrienti e microrganismi pro-tecnologici, quali frutta secca, succo d'uva, miele e luppolo (Minervini *et al.*, 2014). Inoltre, è possibile utilizzare sfarinati diversi: grano tenero, segale o grano duro, in miscela o in purezza, ma anche farro, riso, orzo, avena o sfarinati di pseudo-cereali e legumi (De Vuyst *et al.*, 2017). Contestualmente, risulta frequente l'aggiunta di sale, malto o zucchero, anche durante i rinfreschi successivi, rispettivamente per selezionare la microflora e per aumentare il contenuto di nutrienti microbici. In particolare, tale pratica è adoperata nel "sistema francese", che si caratterizza anche per un rapporto acqua:farina di

circa 1:2, sia nel primo impasto che nei rinfreschi successivi, differentemente dal “sistema americano” dove il rapporto acqua:farina si attesta tra 1,25:1 e 1,5:1 (Corsetti *et al.*, 2010). Quest’ultimo elemento di diversità definisce la consistenza dell’impasto (*Dough Yield*, DY), uno dei parametri chimico-fisici attraverso i quali si possono descrivere le caratteristiche di un lievito *naturale*, insieme con il pH e l’acidità titolabile (*Total Titrable Acidity*, TTA).

La DY indica il rapporto tra il peso dell’impasto (acqua, farina e altri ingredienti) e il peso della farina, moltiplicato per 100. In considerazione del fatto che l’acqua e la farina sono gli ingredienti principali di un impasto, in genere la DY è definita dalla seguente formula: $DY = [(peso\ della\ farina + peso\ dell'acqua) * 100 / peso\ della\ farina]$. Perciò, essa dipende strettamente dalla quantità di acqua unita alla miscela. A parità di grado di assorbimento della farina, maggiore sarà l’acqua aggiunta all’impasto, maggiore sarà la resa (in volume) e minore la consistenza. Per questo, in base alla DY si possono distinguere impasti solidi (DY 140-160), semi-liquidi (DY 200) o liquidi (DY maggiore di 200, fino a 250). Sia la resa che la consistenza dell’impasto quindi sono correlate alla DY. Oltre alla DY, pH e TTA risultano due parametri chimico-fisici molto importanti nella definizione delle caratteristiche del lievito *naturale*; in particolare, il pH, espressione della concentrazione degli ioni idrogeno (H⁺) in soluzione, è strettamente correlato alle condizioni di processo e alle attività microbiche in atto nell’impasto stesso. Mentre, la TTA, misura della quantità di acidi organici presenti nella matrice espressa in volume (mL) di NaOH 0,1 N necessari per portare 10 g di impasto a pH 8,4, è un indicatore specifico dall’attività fermentativa del microbiota del lievito *naturale*. L’utilizzo di ingredienti differenti e i diversi valori dei parametri chimico-fisici (DY, pH e TTA) influenzano e/o sono influenzati dalla microflora degli impasti acidi, oltre che dalla tecnologia di processo, determinando le caratteristiche dei PDF lievitati da essi derivati.

1.1.2 Conservazione

Con l’obbiettivo di preservare la capacità acidificante e lievitante del lievito *naturale*, è necessario mantenere vivi e vitali i microrganismi spontaneamente selezionati. Nel caso di un utilizzo giornaliero, ciò si realizza mediante rinfreschi quotidiani di mantenimento, inoculando un’aliquota (generalmente la parte centrale) del lievito *naturale* in una nuova miscela di farina e acqua, con proporzioni che dipenderanno dalla DY desiderata; in genere, per impasti acidi solidi, si aggiunge una quantità di farina pari al peso dell’inoculo e il 45-50% di acqua (sulla farina). La pratica dei rinfreschi è funzionale soprattutto ad apportare acqua, nutrienti e microrganismi, per mantenere il microbiota vivo e vitale. Tra un rinfresco e il successivo, si attuano diverse condizioni: (i) l’impasto può essere lasciato fermentare ad

una temperatura tra i 18-24 °C per 24-48 ore; (ii) l'impasto, dopo un periodo fermentativo di 3-6 ore a temperatura ambiente, viene posto a 4-8 °C per 18-24 ore. In entrambi i casi, l'impasto acido potrà essere mantenuto: in un recipiente coperto con un telo di cotone (libero), avvolto in un canovaccio e legato con una corda non stretta (legato, “metodo milanese”) o immerso in una bacinella di acqua a ca. 20 °C (a bagno, “metodo piemontese”) (Montanari, 2018; Lauri, 2006; Giorilli, 2003) (fig. 1.1). Sebbene alcune di queste pratiche non trovino riscontro in letteratura, principalmente perché operate a livello artigianale, certamente le differenti condizioni e/o modalità operative dei rinfreschi di mantenimento influenzano il microbiota e quindi le proprietà del lievito *naturale*.



Figura 1.1: Differenti gestioni del lievito madre: liquido (1), solido in acqua (2a e 2b), solido legato (3b e 3b), solido libero (4)
 (da Lauri, S., 2006. *Pane e pizza, due mondi un'unica passione*, cap. 16, p. 311, cit.).

Se non c'è la necessità di utilizzare quotidianamente il lievito madre e/o manca la possibilità di effettuare rinfreschi di mantenimento, è possibile conservarlo per più giorni con diverse modalità: (i) dopo un rinfresco, in genere con rapporto acqua:farina 0,5:1, e un breve periodo di fermentazione (3-6 ore) a temperatura ambiente, viene mantenuto a 4-6 °C per al massimo 3-4 giorni; (ii) viene legato e riposto a 4 °C a seguito di un rinfresco ma prima dell'avvio dell'attività fermentativa, conservandosi fino a 15-30 giorni; (iii) dopo un rinfresco con pari peso di farina e senza aggiunta di acqua, il lievito *naturale* viene lasciato essiccare a temperatura ambiente e conservato fino ad un massimo di 60 giorni; (iv) dopo il rinfresco (DY ca. 140), l'impasto viene lasciato fermentare a temperatura ambiente per alcune ore e

poi congelato ad una temperatura tra -10 e -20 °C, per essere conservato fino a 90 giorni (Montanari, 2018; Lattanzi *et al.*, 2014). Ciò permette di avere una scorta di lievito *naturale* con la relativa microflora selezionata, utilizzabile nel caso in cui si manifestino alterazioni delle proprietà lievitanti e acidificanti del lievito *naturale* fresco, evitando la necessità di riprodurlo *ex-novo*. Tuttavia, bisogna ricordare che le basse temperature, l'acidità e l'esaurimento dei nutrienti causano un notevole stress per la microflora, perciò il lievito *naturale* necessiterà di una serie di rinfreschi prima di essere utilizzato nuovamente (Lattanzi *et al.*, 2014).

1.1.3 Classificazione

Sulla base della tecnologia di produzione, il lievito *naturale* è stato classificato in tre tipologie principali: di tipo I, di tipo II e di tipo III (Bocker *et al.*, 1995), che si differenziano per i parametri chimico-fisici (DY, pH e TTA), per le modalità di utilizzo e per le caratteristiche microbiologiche (composizione e attività microbica).

Il primo, di **tipo I**, è il lievito *naturale* tradizionale, prodotto a livello casalingo o nella stessa azienda panificatrice a partire da un impasto di acqua e farina, con eventuali ingredienti aggiunti, fermentato spontaneamente e mantenuto attivo mediante rinfreschi giornalieri. Si caratterizza per una consistenza tipicamente solida e compatta (Fig. 1.1), con valori di DY pari a ca. 150-160, un pH tra 3,8 e 4,2 e una TTA di 25-100 mL NaOH 0,1 N/10g (Brandt, 2007; De Vuyst & Neysens, 2005). Negli Stati Uniti (anche in Europa, in micro-panifici artigianali) questa tipologia di impasto acido può essere prodotta con un rapporto acqua:farina maggiore (fino a 1,5:1, DY 250) e mantenuta a basse temperature con rinfreschi ogni 24-72 ore; se invece viene velocemente raffreddata a 1-2 °C, può mantenersi attiva fino a 10 giorni prima di essere rinfrescato nuovamente (sistema americano). In questo caso, il valore di pH oscilla mediamente tra 3,6 e 3,8 mentre la TTA tra 16 e 20 mL di NaOH/20 g di impasto (metodo di determinazione americano) (Lazzaroni, 2017; Pollan, 2014; Minervini *et al.*, 2014; Kulp, 2003). In ogni caso, per le sue caratteristiche, il lievito *naturale* di tipo I può essere considerato una coltura starter naturale a composizione mista, in cui i microrganismi endogeni si mantengono metabolicamente attivi e in grado di avviare acidificazione e lievitazione. Tuttavia, il processo produttivo risulta essere lungo e laborioso, sia per il tempo necessario all'ottenimento del lievito *naturale* maturo sia per la necessità dei frequenti rinfreschi. Inoltre, l'inoculo periodico in una nuova matrice di acqua e farina, insieme con le condizioni di processo attuate, può determinare un cambiamento della microflora con conseguente variazione delle *performance* del lievito *naturale*. Al fine di far

fronte a queste problematiche, l'industria ha sviluppato una tipologia di impasto acido classificato come tipo II.

L'impasto acido di **tipo II** è generalmente semi-liquido o liquido (Fig.1.1) (DY ca. 200-250) ed è prodotto in un'unica fase di fermentazione (da 15-20 ore fino a qualche giorno) alla quale segue lo stoccaggio a 1-2 °C fino a ca. una settimana (Corsetti *et al.*, 2010); può essere definito anche impasto acido accelerato, perché prodotto in tempi complessivamente più brevi rispetto al tipo I, grazie all'utilizzo di fermentatori o *tank* mantenuti a più di 30 °C (De Vuyst & Neysens, 2005). La fermentazione prolungata e le alte temperature determinano una forte acidificazione (pH inferiore a 3,5 e TTA da 30 a 150 mL NaOH/10g) nonché il consumo dei nutrienti, causando un notevole stress ai microrganismi, i quali saranno in fase stazionaria e quindi metabolicamente poco attivi e/o in carica ridotta, in particolar modo i lieviti; per questo motivo, l'impasto acido di tipo II viene usato nelle preparazioni dei PDF lievitati per acidificare e apportare composti in grado di definire odore e sapore tipici, piuttosto che per lievitare. In ambito artigianale, questa tipologia può essere prodotta a partire da acqua e farina, oppure da un impasto acido di tipo I a seguito di un rinfresco con maggior rapporto di acqua e farina. Frequentemente, però, l'impasto acido di tipo II è prodotto in panifici industriali o da aziende specializzate, a partire dalla miscelazione di acqua e farina con colture starter, costituite da uno o più ceppi di batteri lattici selezionati per la velocità di acidificazione e per la produzione di composti aromatici (De Vuyst *et al.*, 2017). In ogni caso, questa tipologia non richiede rinfreschi di mantenimento, rendendo il processo meno laborioso e costoso. Inoltre, la sua aggiunta nell'impasto finale del PDF lievitato è semplice e automatizzata, dosando all'occorrenza tramite sistemi di pompaggio. Tutto ciò, insieme alla rapidità del processo produttivo (massimo 5 giorni), rende applicabile il suo uso su larga scala (Carnevali *et al.*, 2007).

Con impasto acido di **tipo III** si indica, invece, lievito *naturale* in polvere, prodotto da aziende specializzate mediante essiccamento di impasto acido di tipo II, in genere ottenuto a partire da acqua, farina e colture starter. La disidratazione può essere effettuata con essiccatore spray (*spray drying*) o a cilindri (*drum drying*) ed è determinante nel maggiore o minore sviluppo di colore e aromi di caramellizzazione e tostatura, in funzione dei parametri applicati (tempo e temperatura) (De Vuyst & Neysens, 2005). A causa dell'acidità raggiunta, delle alte temperature e del trattamento termico subito, l'attività metabolica del microbiota sarà pressoché nulla; pertanto, l'impasto acido di tipo III viene aggiunto alla formulazione dei PDF lievitati con l'obiettivo di apportare i metaboliti microbici, acidi e composti aromatici e/o coloranti. In questo senso, l'impasto acido di tipo III può essere considerato un

ingrediente, con una *shelf-life* lunga a temperatura ambiente, da dosare facilmente all'occorrenza per aggiungerlo all'impasto finale; ciò permette di standardizzare il processo produttivo e la qualità dei PDF lievitati. In relazione ai parametri chimico-fisici, tale tipologia si caratterizza per un'acidità che dipenderà dalla DY dell'impasto acido di partenza, e che risulterà comunque superiore all'impasto acido tipo I e II a causa dell'evaporazione dell'acqua (TTA tra 40 e 220 mL NaOH/10g) (Decock & Cappelle, 2005).

L'impasto acido di tipo II può anche essere stabilizzato, mediante aggiunta di sale o a seguito di pastorizzazione o raffreddamento; ciò determina l'inattivazione della microflora, evitando la produzione di ulteriori metaboliti e classificando tale lievito *naturale* nel tipo III (Corsetti *et al.*, 2010; Brandt, 2007). Il vantaggio principale è legato al fatto che viene evitata la perdita dei composti volatili dovuta al processo di essiccamento, pur mantenendo la semplicità d'uso, la conservabilità e le proprietà acidificanti e aromatizzanti (Brandt, 2007).

In considerazione del fatto che il lievito di birra può essere contaminato da microrganismi, in particolare batteri lattici, e che la farina si caratterizza per una propria microflora autoctona, alcuni autori classificano i pre-impasti di acqua, farina e lievito (pre-fermenti) utilizzati nella panificazione indiretta come impasti acidi di **tipo 0**; infatti, nel caso di un periodo di fermentazione di 10-18 ore ad una temperatura tra 24-28 °C, il microbiota avvia il proprio sviluppo determinando una leggera acidificazione, oltre alla produzioni di aromi (De Vuyst *et al.*, 2017).

Pur non rientrando propriamente tra gli impasti acidi, è opportuno menzionare le colture starter. Sono colture a composizione definita, in genere liofilizzate, costituite da uno o più ceppi selezionati di batteri lattici, deliberatamente aggiunti all'impasto di acqua e farina per avviare la fermentazione lattica. Sono prodotte da aziende specializzate, spesso a partire dai microrganismi endogeni degli impasti acidi, selezionati per la velocità di acidificazione, anche in presenza di sale, la tolleranza allo stress acido e la produzione di metaboliti. Oltre che per la produzione di impasto acido di tipo II e III, le colture starter possono essere utilizzate anche per la preparazione di un impasto acido di tipo I in maniera rapida, permettendo di standardizzare il processo e la qualità dei PDF lievitati (De Vuyst *et al.*, 2009).

Comunque, a seguito del recente sviluppo della ricerca sugli impasti acidi, sia in ambito accademico che industriale, con l'obiettivo di apportare i benefici caratteristici ai PDF lievitati semplificando e velocizzando i processi produttivi, una grande varietà di starter commerciali, attivi o inattivi, refrigerati, congelati o in polvere, con composizione mista o

definita, costituiti da batteri lattici ed eventualmente lieviti, anche in preparati con enzimi, sono disponibili per le aziende, sia artigianali che industriali (Poitrenaud, 2003).

1.1.4 Utilizzo

A seconda del prodotto, della tipologia di lievito *naturale*, nonché della tradizione locale e dell'organizzazione del singolo produttore, il lievito madre può essere utilizzato in modi differenti, molti dei quali perpetuati in maniera empirica e non codificati.

Tradizionalmente, per la produzione di pane a lievitazione naturale si utilizza il metodo a tre rinfreschi. Prima dell'impiego nella formulazione finale, il lievito madre viene sottoposto a tre cicli di rinfreschi ravvicinati, con farina in pari peso, il 45-50% di acqua (sulla farina) e una fase fermentativa a 24-30 °C per 2-8 ore. Questo processo è necessario per aumentare la quantità di agente lievitante e per disporre di un microbiota metabolicamente attivo e in equilibrio (De Vuyst *et al.*, 2017). La riduzione dei tempi, rispetto ai rinfreschi di mantenimento usuali, trova giustificazione nell'andamento della crescita della popolazione microbica, secondo cui i microrganismi si trovano in fase esponenziale nelle prime 3-6 ore; in questo modo, quindi, è possibile accorciare i tempi della fase stazionaria dei successivi inoculi, raggiungendo subito la massima attività microbica (Corsetti *et al.*, 2010). Sebbene in letteratura non trovi riscontro, in ambito artigianale, prima del rinfresco iniziale, è usuale la pratica del cosiddetto "lavaggio" o "bagno". Il lievito madre di tipo I solido viene immerso in acqua e zucchero (saccarosio, 1-2%) a 20-40 °C (in base alla modalità di conservazione) per 15-20 minuti; ciò ha dimostrato, in maniera empirica, di ridurre l'acidità eccessiva e di riavviare i metabolismi microbici, specie nel caso in cui siano passati 2 o più giorni dall'ultimo rinfresco (Montanari, 2018; Zannini *et al.*, 2010). Il processo a tre rinfreschi porta all'ottenimento del lievito *naturale* maturo, di colore bianco avorio, gusto acidulo non amaro e aroma acido non pungente, con la capacità di aumentare il suo volume di 1,5-2 volte in 3-4 ore. A questo punto, una parte può essere conservata per il giorno successivo, quando sarà utilizzata per la lavorazione o mantenuta tramite rinfreschi. Un'altra parte può essere aggiunta all'impasto finale, in percentuali tra il 10% e il 40%, in relazione alla propria capacità lievitante, alle condizioni di fermentazione (tempo e temperatura) e alla tipologia e formulazione del prodotto. Il lievito *naturale* maturo di tipo I può essere utilizzato come unico agente lievitante, essendo presenti lieviti e batteri lattici gasogeni naturalmente associati all'impasto. In questo caso, si parla propriamente di pane *a lievitazione naturale*: a seguito dell'impastamento con acqua, farina e sale, il prodotto subirà una fermentazione di durata variabile (da 30-60 minuti a 12-18 ore), in funzione della temperatura. Nel complesso, la panificazione con metodo a tre rinfreschi dura in genere oltre le 12 ore, ed è utilizzata

anche per i PDF dolci, come il Panettone. Negli ultimi decenni, a casua della laboriosità di tale tecnica, si è provato ad accorciare il processo, riducendo a due o ad uno i cicli di rinfresco; conseguentemente, la quantità di lievito madre e i tempi di fermentazione varieranno. In ambito artigianale, specie nel caso in cui sia prevista una doppia lievitazione (puntata e appretto, di almeno 2-6 ore), il lievito madre di tipo I conservato a basse temperature dal giorno precedente può anche essere aggiunto direttamente all'impasto (Montanari, 2018; Poitrenaud, 2003).

Il lievito *naturale* maturo di tipo I può essere utilizzato congiuntamente al lievito compresso; in tal caso, si parla più propriamente di PDF *con lievito naturale*, i cui tempi di fermentazione complessivi (temperatura dipendenti) sono inferiori a quelli dei PDF con solo lievito *naturale*. Se si utilizza impasto acido di tipo II o di tipo III, invece, è sempre necessario aggiungere lievito di birra, ca. 1-2% (sull'impasto), perché lo stress acido prolungato, le alte temperature e/o il trattamento termico o di stabilizzazione non favoriscono lo sviluppo di lieviti endogeni e/o ne riducono estremamente la carica (De Vuyst *et al.*, 2017). In questo caso, la quantità del lievito *naturale* aggiunta dipenderà dallo specifico prodotto; in linea generale, si aggiunge 1-10% (sulla farina) di lievito liquido o 1-6% di lievito in polvere, con una fermentazione complessiva della durata tra i 90 e i 180 minuti (Poitrenaud, 2003). Similmente, nel caso di utilizzo di lievito *naturale* stabilizzato o di colture starter, è necessario l'uso di lievito di birra per permettere la lievitazione dell'impasto (Corsetti *et al.*, 2010; Brandt, 2007).

1.2 Microflora e fattori ecologici caratterizzanti

Il lievito *naturale*, in particolare quello di tipo I, è un complesso ecosistema microbico caratterizzato dalla dominanza di batteri lattici (LAB, dall'inglese *Lactic Acid Bacteria*) in associazione con i lieviti; entrambi utilizzano i nutrienti dell'impasto producendo metaboliti che definiscono le proprietà tecnologiche, sensoriali e nutrizionali dei PDF in cui sono presenti.

Il microbiota si sviluppa spontaneamente a partire dai microrganismi naturalmente associati alle materie prime ed eventuali altri ingredienti aggiunti nella fase iniziale insieme all'acqua (Suo *et al.*, 2021). La miscela che ne risulta è un substrato ricco di amido, rapidamente idrolizzato a di- e mono-saccaridi fermentescibili dagli enzimi della farina e dei microrganismi, in particolare dalle amilasi; sempre per via enzimatica, le proteine sono scisse in peptidi e amminoacidi, fonti di azoto insieme con nitrati e ammoniaca. Il pH dell'impasto di acqua e farina varia tra 5,0 e 6,2 e l'attività dell'acqua (a_w) tra 0,96 e 0,98.

Queste condizioni rendono permessibile la crescita microbica (Minervini *et al.*, 2014). Tuttavia, è stato osservato che i profili microbiologici del grano, della miscela di acqua e farina e del lievito *naturale* non sono sovrapponibili. In particolare, nelle prime due matrici si ritrovano batteri (fino a 10^7 UFC/g), muffe (fino a 10^4 UFC/g) e lieviti (10^2 - 10^4 UFC/g), appartenenti a generi e specie diverse. Tra i primi, sono inclusi sia batteri Gram-negativi, come *Pseudomonas* spp. o *Enterobacter* spp., che batteri Gram-positivi, come bacilli sporigeni (es. *Bacillus cereus*), cocchi coagulasi-positivi (*Staphylococcus* spp., *Kocuria* spp.) e LAB appartenenti ai generi *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Weissella*. Tra i lieviti, troviamo specie appartenenti ai generi *Candida*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Torulaspora*, *Trichosporon*, *Sporobolomyces* e *Saccharomyces*, molte delle quali scompaiono nel passaggio dalle cariossidi alla farina (De Vuyst *et al.*, 2017). È opportuno sottolineare che in queste matrici è difficile isolare *S. cerevisiae*, la cui presenza negli impasti acidi è riconducibile ad una contaminazione ambientale (Suo *et al.*, 2021). In ogni caso, durante le fasi di preparazione del lievito *naturale*, il microbiota va incontro a dei cambiamenti dovuti alla selezione naturale dei microrganismi più adattati alle condizioni che si instaurano. Ciò è osservabile confrontando la variazione di pH e della TTA con l'evoluzione della microflora nel tempo (Gatto & Torriani, 2004; Meroth *et al.*, 2003). Al termine dell'impastamento di acqua e farina, infatti, si avviano i processi fermentativi ad opera dei batteri lattici che in 24 ore a temperatura ambiente determinano l'acidificazione dell'impasto, con il pH che passa da circa 5,8 a 4,5, mentre il potenziale redox si riduce tendendo a valori negativi. Ciò concorre a determinare l'inibizione dei batteri Gram-negativi e in generale dei microrganismi non acido-tolleranti, favorendo lo sviluppo degli stessi LAB e dei lieviti. In particolare, tra i LAB prendono rapidamente il sopravvento i lattobacilli, nello specifico omofermentanti, pediococchi e, in misura minore, i generi *Leuconostoc* e *Weissella* (De Vuyst *et al.*, 2017). Dopo 5-7 giorni di rinfreschi, si osserva una stabilizzazione del pH tra 3,8 e 4,2 e della TTA con valori di 15-30 mL NaOH 0,1 N/10g, oltre alla riduzione della diversità della popolazione microbica, caratterizzata dalla prevalenza di batteri lattici (tra 10^8 e 10^9 UFC/g) e lieviti (tra 10^5 e 10^7 UFC/g), generalmente in rapporto stabile di 100:1. Tra i batteri lattici, a questo punto, prevalgono alcune specie di lattobacilli eterofermentanti, tipiche degli impasti acidi, a conclusione di un'evoluzione della popolazione definita a tre fasi (De Vuyst & Neysens, 2005; Meroth *et al.*, 2003). Questi dati supportano la durata del processo di produzione tradizionale dell'impasto acido di tipo I, che in ca. 10 giorni diventa stabile, attivo e quindi maturo, ovvero con capacità acidificante e lievitante. Oltre ai LAB e ai lieviti,

occasionalmente, nel lievito *naturale* possono trovarsi microrganismi contaminanti come coliformi, batteri acetici e muffe, in carica ridotta (minore di 100 UFC/g) (Minervini *et al.*, 2014).

Per quanto sopra, l'impasto acido di tipo I può essere considerato una coltura mista naturale, caratterizzata da più specie microbiche in carica differente, con variabilità anche intraspecifica. In tal senso, la diversità è molto elevata, e in alcuni lieviti *naturali* si possono trovare solamente due o tre specie di LAB e di lieviti, mentre in altri un consorzio microbico costituito da un numero elevato di specie. Inoltre, tra un lievito *naturale* e l'altro si riscontrano differenze in termini di ceppi e specie dominanti (De Vuyst *et al.*, 2016). Tutto ciò è dovuto a diversi fattori, che insieme portano a definire la biodiversità degli impasti acidi, alla base delle peculiarità dei PDF a lievitazione *naturale*. Per questo, è importante conoscere la composizione microbiologica e le attività dei microrganismi, le loro interazioni e i fattori ecologici che ne influenzano le caratteristiche.

1.2.1 Batteri lattici

I LAB sono i microrganismi predominanti nel lievito *naturale*, con una carica di ca. 10^8 - 10^9 UFC/g di impasto acido di tipo I attivo. Sono batteri Gram-positivi, asporigeni, immobili, acido-tolleranti e prevalentemente anaerobi ossigeno-tolleranti, ovvero caratterizzati da un metabolismo fermentativo che prevede la degradazione degli zuccheri in acido lattico. Nel lievito *naturale* sono presenti sia LAB omofermentanti che eterofermentanti. I primi metabolizzano carboidrati esosi attraverso la glicolisi o via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), rilasciando principalmente acido lattico nell'ambiente (fermentazione omolattica). I secondi, se facoltativi, fermentano gli esosi via EMP e i pentosi attraverso la via 6-fosfogluconato/fosfochetolasi (6-PG/PK), liberando rispettivamente acido lattico, acido acetico e/o etanolo; se obbligati, invece, metabolizzano sia gli esosi che i pentosi via 6-PG/PK, producendo acido lattico, CO₂ (solo da esosi), acido acetico e/o etanolo in rapporto equimolare (fermentazione eterolattica). Diversamente da molti alimenti fermentati, nel lievito *naturale* dominano i batteri eterofermentanti obbligati, a causa della migliore competitività e del maggior adattamento alla matrice; essi assumono particolare importanza perché producono acidi organici e CO₂, grazie ai quali l'impasto acidifica, lievita e mostra caratteristiche peculiari (Gobbetti, 2010). Un parametro chimico utile nella valutazione dell'equilibrio della popolazione dei LAB nel lievito *naturale* è il Quoziente Fermentativo (QF), ovvero il rapporto molare (peso espresso in grammi/peso molecolare) tra l'acido lattico e l'acido acetico presenti in 100 g di impasto. Il QF è strettamente dipendente dall'attività fermentativa dei LAB, perché, nel caso in cui prevalgano i LAB omofermentanti, sarà

prodotto più acido lattico, viceversa, se domineranno i LAB eterofermentati obbligati, verrà rilasciato più acido acetico (Corsetti *et al.*, 2010). Un QF ottimale è considerato quello con valori compresi tra 1,5 e 4, dove le concentrazioni di acido lattico e acido acetico variano rispettivamente da 0,4 a 0,8% e da 0,1 a 0,4% (Corsetti *et al.*, 2010). I LAB, inoltre, producono anche altri acidi organici, composti volatili, molecole antimicrobiche ed esopolisaccaridi, svolgono attività peptidasica ed esprimono nell'ambiente i propri enzimi (De Vuyst & Neysens, 2005), rendendosi i principali responsabili delle proprietà sensoriali, nutrizionali e tecnologiche dei PDF lievitati.

Come riportato nella review di Felis *et al.* (2010), diversi studi microbiologici hanno permesso di isolare più di 90 specie di LAB dai lieviti *naturali*, la maggior parte dei quali appartenente al genere *Lactobacillus*. La dominanza dei lattobacilli è correlata ad una maggiore competitività degli stessi nella matrice, grazie a caratteristiche peculiari quali: i) metabolismo adattato alle principali fonti di energia degli impasti acidi, di- e mono-saccaridi (esosi e pentosi), inclusi maltosio e fruttosio (utilizzato come accettore di elettroni), saccarosio, acido citrico e aminoacidi, per alcune specie; ii) intervalli di temperatura e pH ottimali per la crescita corrispondenti a quelli riscontrati nel lievito *naturale* durante il processo; iii) meccanismi di risposta allo stress acido, iv) meccanismi di risposta alle alte e basse temperature, v) meccanismi di risposta alla carenza di nutrienti, vi) meccanismi di risposta all'ossidazione, vii) meccanismi di risposta alla pressione osmotica, viii) produzione di composti antimicrobici (De Vuyst *et al.*, 2009).

Sebbene le specie del genere *Lactobacillus* possano essere molteplici e differenti negli impasti acidi, in funzione dei diversi fattori di selezione, quelle più frequentemente isolate sono riportate in Tabella 1.1. Oltre ai lattobacilli, in diversi casi sono state ritrovate specie del genere *Weissella*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*. Sporadicamente, possono essere presenti specie dei generi *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*. In particolare, negli impasti acidi di tipo I si ritrovano microrganismi che sviluppano bene a temperature tra 20-30 °C e con pH intorno a 4. Negli impasti acidi di tipo II, invece, si trovano batteri in grado di svilupparsi a temperature superiori a 30°C e con pH inferiori a 3,5. Infine, negli impasti acidi di tipo III troviamo batteri lattici in grado sopravvivere ai trattamenti stabilizzanti, in particolare all'essiccazione (De Vuyst & Neysens, 2005; Arendt *et al.*, 2007; Corsetti & Settanni, 2007).

Tabella 1.1 Microflora caratteristica delle differenti tipologie di lievito naturale

	Tipo I	Tipo II	Tipo III
<i>LAB eterofermentanti obbligati</i>	<i>L. sanfranciscensis</i> <i>L. brevis</i> <i>L. fructivorans</i> <i>L. pontis</i> , <i>L. fermentum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. acidifarinae</i> <i>L. rossiae</i>	<i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. reuteri</i> <i>L. frumenti</i> , <i>L. panis</i>	<i>L. brevis</i>
<i>LAB eterofermentanti facoltativi</i>	<i>L. plantarum</i> <i>L. (para)alimentarius</i> <i>L. casei</i>		<i>L. plantarum</i> <i>P.</i> <i>pentosaceus</i>
<i>LAB omofermentanti</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. amylovorus</i>	<i>L. acidophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. amylovorus</i> <i>L. farciminis</i> <i>L. johnsonii</i>	
<i>Altri BL</i>	<i>W. cibaria</i> , <i>Leuc. citreum</i> , <i>Lactococcus. lactis</i>		
<i>Lieviti</i>	<i>Candida humilis</i> , <i>Saccharomyces exiguus</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>S. cerevisiae</i> .		

Legenda: *L.*, *Lactobacillus*; *W.*, *Weissella*; *Leuc.*, *Lecunostoc*; *P.*, *Pediococcus*; *C.*, *Candida*; *K.*, *Kazachstania*; *S.*, *Saccharomyces*; *P.*, *Pichia*.

1.2.2 Lieviti

I lieviti sono l'altro gruppo di microrganismi dominanti nell'impasto acido di tipo I, seppur in carica inferiore rispetto ai LAB, in genere di circa 2 ordini di grandezza (10^5 - 10^7 UFC/g). In particolare, in questo ecosistema troviamo pochi generi inclusi nelle famiglie *Saccharomycetaceae* e *Pichiaceae*; la specie caratteristica è *S. cerevisiae*. È un fungo unicellulare, acido-tollerante, anaerobio facoltativo, che si riproduce per via asessuale (gemmazione) o sessuale (sporulazione). Più nel dettaglio, in condizioni aerobiche *S. cerevisiae* ossida completamente gli zuccheri a CO₂ e acqua, producendo biomassa cellulare; mentre in condizioni anaerobiche o in presenza di concentrazioni di zuccheri superiori allo 0,5-1% (effetto *Crabtree*), il lievito metabolizza gli zuccheri via EMP ad acido piruvico, il quale viene poi ridotto ad etanolo con liberazione di CO₂ (fermentazione alcolica). I lieviti producono anche glicerolo, acido succinico e altri acidi organici, oltre a numerose molecole volatili; nel complesso, tali composti impattano sulle proprietà tecnologiche e sensoriali dei PDF (De Vuyst *et al.*, 2016; Guerzoni & Gianotti, 2010).

Anche la selezione e la dominanza dei lieviti sono legate alla possibilità di utilizzare diverse fonti di energia per il proprio metabolismo (di- e mono- saccaridi, esosi e pentosi, inclusi maltosio, lattosio e saccarosio, per alcune specie, ma anche alcoli e acidi grassi), alla tolleranza a pH acidi e alla presenza di meccanismi di risposta allo stress osmotico o da freddo (De Vuyst *et al.*, 2017). Le specie di lieviti più frequentemente isolate dagli impasti acidi di tipo I sono riportate in Tabella 1.1. È opportuno ricordare che, a causa dei bassi valori di pH raggiunti, della lunga fermentazioni, dei trattamenti subiti e/o per l'utilizzo di colture starter di LAB, nell'impasto acido di tipo II e III i lieviti sono presenti in carica estremamente bassa o nulla (De Vuyst & Neysens, 2005).

1.2.3 Associazioni

La dominanza dei LAB e dei lieviti e il loro equilibrio negli impasti acidi sono legati alle interazioni metaboliche che si realizzano nella matrice stessa. Come introdotto, i consorzi microbici del lievito *naturale* possono essere ampi, cioè coinvolgere diverse specie di LAB e lieviti, oppure limitati e/o unici, costituiti da poche specie microbiche. In ogni caso, una specie (o un gruppo microbico) può favorirne un'altra (commensalismo), oppure, entrambe possono trarre vantaggio dalla co-presenza nella stessa matrice (proto-cooperazione). Principalmente, le interazioni sono basate sul metabolismo dei carboidrati e dei composti azotati, sulla produzione di CO₂ e di composti volatili e sull'attività antimicrobica, e portano all'instaurarsi di associazioni microbiche stabili nel tempo (Gobbetti, 1998).

Il consumo dei carboidrati solubili da parte dei LAB è influenzato positivamente dall'associazione con i lieviti; nello specifico, *S. cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus* e *Candida humilis* aumentano la produzione di acidi da parte di *Lactobacillus sanfranciscensis* e *Lactobacillus plantarum*, perché idrolizzano il saccarosio in glucosio e fruttosio (mediante invertasi), liberando quest'ultimo che è utilizzato come accettore di elettroni dai lattobacilli, per la produzione di acido acetico invece dell'etanolo (Minervini *et al.*, 2014; Gobbetti, 2010). Inoltre, *S. exiguus*, così come *C. humilis*, è maltosio-negativo e trae vantaggio dalla co-presenza di *L. sanfranciscensis*, maltosio-positivo, il quale idrolizza il disaccaride liberando glucosio nell'ambiente, favorendo i lieviti e i LAB maltosio-negativi, come è stato osservato nel pane di San Francisco e nel Panettone (Minervini *et al.*, 2014). In tale contesto, risulta fondamentale il rapporto tra i carboidrati solubili resi disponibili delle amilasi della farina e quelli metabolizzati da parte dei microrganismi del lievito *naturale*; lo squilibrio, in presenza di lieviti maltosio-positivi e a seguito dell'esaurimento di glucosio, porta ad una competizione per i nutrienti che limita i LAB (De Vuyst & Neysens, 2005). Un'altra interazione rilevante è legata al fatto che i lieviti rilasciano nella matrice quantità variabili di

peptidi, aminoacidi (es. prolina, valina, alanina) e vitamine del gruppo B, durante il loro sviluppo e/o a seguito di lisi cellulare, che rappresentano fattori di crescita essenziali per i LAB. Inoltre, è stato osservato che in co-coltura i lieviti non competono con i LAB per le fonti di azoto, utilizzando preferenzialmente azoto inorganico. Per tali motivi, *S. cerevisiae* e *S. exiguus* stimolano la crescita dei lattobacilli (Gobbetti, 1998). I LAB influiscono, invece, sulla produzione di CO₂ da parte dei lieviti: l'interazione tra *L. sanfranciscensis* e *S. cerevisiae* determina la riduzione del tempo necessario a produrre la massima quantità di CO₂ da parte del lievito, mentre l'associazione del lattobacillo con *S. exiguus* determina una maggiore produzione del gas. *L. plantarum* e *Lactobacillus brevis*, invece, determinano un aumento della CO₂ prodotta da *S. cerevisiae*, oltre a migliorare le capacità dell'impasto di trattenere gas, permettendo un aumento di volume maggiore (Gobbetti, 2010). L'interazione tra LAB e lieviti, inoltre, determina una maggiore formazione di composti volatili, rispetto alla sola presenza dei LAB; ciò concorre a definire il miglioramento del profilo sensoriale dei PDF ottenuti con lievito *naturale*. Infine, i LAB producono composti antimicrobici, quali batteriocine e acidi organici, che inibiscono selettivamente la microflora contaminante, proteggendo anche i lieviti insensibili e acido-tolleranti; ciò permette, inoltre, di mantenere stabile la composizione microbica del lievito *naturale* (Gobbetti, 1998).

Oltre alle interazioni tra LAB e lieviti, spesso gli impasti acidi ospitano associazioni stabili tra specie di LAB. Tra queste, ad esempio, si ricordano quelle tra *L. sanfranciscensis* e *L. plantarum* o *Lactobacillus alimentarius/paralimentarius*; ancora, quella tra *L. sanfranciscensis* e *Pediococcus pentosaceus*, o tra *L. sanfranciscensis* e *Leuconostoc citreum* (De Vuyst *et al.*, 2017; Minervini *et al.*, 2014; Corsetti & Settanni, 2007).

È necessario ricordare che le interazioni appena descritte dipendono dai substrati microbici disponibili, oltre che dalle caratteristiche chimico-fisiche dell'impasto acido e dai parametri di processo adottati.

1.2.4 Fattori caratterizzanti l'ecologia microbica

La selezione del microbiota tipico di un lievito *naturale* dipende dalle condizioni che i microrganismi incontrano nella matrice, le quali possono essere ricondotte a parametri di processo e a fattori endogeni, che hanno ciascuno un proprio effetto ma interagiscono contemporaneamente l'uno con l'altro (Minervini *et al.*, 2014).

Uno dei parametri tecnologici principali è la DY, espressione della quantità di acqua aggiunta all'impasto. A seconda della tipologia, gli impasti acidi avranno una DY compresa tra 140 e 250 e una conseguente a_w variabile tra 0,96 e 0,98, tale da permettere lo sviluppo di lieviti e LAB. Tuttavia, con DY inferiore a 160 sono favoriti i lieviti, mentre un valore di DY

elevato, e lunghe fermentazioni (24-48 ore), determina la crescita preferenziale dei LAB. In particolare, bassi valori di DY, in presenza di temperature inferiori ai 30 °C, favoriscono i LAB eterofermentanti, con maggior produzione di acido acetico; viceversa, con DY elevata e temperature di 35-37 °C viene prodotto più acido lattico (Decock & Cappelle, 2005). Un altro parametro determinante per lo sviluppo microbico è la temperatura di fermentazione: tra 20-26 °C i lieviti saranno favoriti, mentre tra 26-37 °C cresceranno meglio i lattobacilli (Minervini *et al.*, 2014). Inoltre, la temperatura influirà anche sul tempo di lievitazione, oltre che sulla velocità delle reazioni enzimatiche. Pertanto, anche le fluttuazioni della temperatura ambientale, giornaliere o stagionali, saranno determinanti (De Vuyst *et al.*, 2017). Un altro fattore che influenza il microbiota è il potenziale redox (E_h), determinato principalmente dall'ossigeno (O_2) incorporato nella matrice durante l'impastamento. Quest'ultimo, infatti, può essere utilizzato da alcune specie di lattobacilli eterofermentanti come accettore esterno di elettroni, per la produzione di acido acetico e di energia, determinando una maggiore acidificazione dell'impasto (Minervini *et al.*, 2014) mentre può essere sfruttato nelle prime fasi dai lieviti per produrre biomassa cellulare, con metabolismo respiratorio (Guerzoni & Gianotti, 2010). Un altro fattore di controllo dell'ecologia microbica è il pH, che allo stesso tempo è influenzato e influenza l'attività microbica. In genere, il lievito madre di tipo I presenta un pH che favorisce lo sviluppo di lieviti e LAB di interesse. Con valori di pH maggiori, i LAB autoctoni della farina possono prendere il sopravvento sui lattobacilli (Minervini *et al.*, 2014). Infine, il numero di rinfreschi, insieme alla frequenza con cui vengono eseguiti e la percentuale di inoculo, sono parametri tecnologici determinanti per l'ecologia microbica. In generale, all'aumentare del numero di rinfreschi aumenta la selettività delle condizioni ambientali, determinando il predominio di un numero ridotto di specie, di solito eterofermentanti facoltativi (Minervini *et al.*, 2014). Inoltre, frequenze diverse di rinfreschi corrisponderanno a differenti valori di pH, di vitalità e di carica dei microrganismi dell'impasto acido, in funzione del tempo di generazione e della resistenza allo stress acido e nutritivo, influenzando il loro sviluppo una volta inoculati nella nuova matrice, in funzione della percentuale utilizzata (Minervini *et al.*, 2014; Corsetti *et al.*, 2010).

Oltre che dai parametri di processo, i cambiamenti del microbiota dipendono anche da fattori endogeni, tra i più importanti dei quali si individua la farina utilizzata nei rinfreschi. In funzione della concentrazione e tipologia di carboidrati solubili, delle fonti di azoto, di minerali, vitamine e altri fonti energetiche, diversi ceppi o specie microbiche saranno più o meno favoriti in base alle loro capacità metaboliche. Perciò l'utilizzo di lotti di farina

differenti o, ancor più, di sfarinati di cereali diversi risulta determinante, così come anche il grado di raffinazione o il metodo di coltivazione dei cereali (De Vuyst *et al.*, 2017; Kulp, 2003). A questo si aggiunge il fatto che, essendo un substrato non sterile, mediante la farina possono essere introdotti microrganismi contaminanti non di interesse, i quali, possono prendere il sopravvento. Un altro fattore endogeno è il cosiddetto microbiota domestico, termine con cui si indicano i contaminanti dell'ambiente di lavorazione (aria, attrezzature, operatori, ecc.). L'influenza di questo parametro è stata dimostrata osservando le differenze tra i lieviti *naturali* prodotti e propagati in laboratori di ricerca e quelli di aziende panificatrici, in termini di specie di LAB e lieviti dominanti; tuttavia, il suo controllo risulta di difficile attuazione, fatto salvo la pratica di accurati interventi di sanificazione quotidiani e di adeguate procedure igieniche (Minervini *et al.*, 2012). Infine, anche la presenza di virus e batteriofagi può determinare la scomparsa di una certa specie di lieviti o BL, alterando la microflora caratteristica del lievito *naturale* (Lavermiocca *et al.*, 2010).

Tutti questi fattori concorrono alla definizione del microbiota del lievito *naturale*, agendo sulla selezione dei microrganismi naturalmente associati alle materie prime o contaminanti. Inoltre, gli stessi influiscono sulla stabilità dell'equilibrio microbico nel tempo, soggetto comunque a notevole variabilità. Infatti, alcuni lieviti *naturali* presentano un microbiota stabile per anni e addirittura per decenni, mentre altri manifestano una relativa instabilità anche nel giro di pochi mesi (De Vuyst & Neysens, 2005). Di conseguenza, la convenzione di associare un'età al lievito *naturale*, dal momento della sua preparazione, sembra trovare solamente un parziale fondamento. Similmente, l'influenza dell'origine geografica del lievito *naturale* sulla composizione del microbiota ad esso associato non è stata dimostrata univocamente (De Vuyst *et al.*, 2017). Comunque, la costanza dei parametri tecnologici è un requisito imprescindibile per garantire la stabilità di un lievito *naturale* (Minervini *et al.*, 2014).

1.3 Cenni sui principali ruoli del lievito naturale

Come tutti gli alimenti fermentati, l'impiego e la diffusione del lievito *naturale* è dovuto all'acquisizione di caratteristiche nuove e desiderabili da parte dei prodotti nel quale è utilizzato. Nello specifico, i PDF a lievitazione *naturale* assumono proprietà nutrizionali, tecnologiche e sensoriali tipiche e differenti da quelle dei PDF con lievito compresso, sia per la presenza di LAB sia per i lunghi tempi di fermentazione (Ganzle, 2014; De Vuyst *et al.*, 2009).

Una delle proprietà caratterizzanti il lievito *naturale* di tipo I è la capacità lievitante. Questa è dovuta principalmente all'attività metabolica dei lieviti, con produzione di CO₂ dagli zuccheri, ma anche alle specie di LAB eterofermentanti obbligati che producono CO₂ in rapporto equimolare ad acido lattico e acido acetico e/o etanolo (fermentazione eterolattica) (Corsetti & Settanni, 2007). Il gas trattenuto dall'impasto aumenta il volume del prodotto, il quale, a seguito della cottura, risulta più leggero e soffice.

Un altro effetto caratteristico del lievito *naturale* è l'acidificazione dell'impasto finale al quale viene aggiunto, raggiungendo valori di pH tra 4,7 e 5,4, in funzione della quantità inoculata (Corsetti *et al.*, 2010). L'acidificazione è dovuta alla produzione di acidi organici, principalmente da parte dei LAB, e determina diversi effetti importanti. Uno di questi è la regolazione dell'attività degli enzimi endogeni della farina, quali amilasi, per la produzione di carboidrati fermentescibili e zuccheri riducenti, proteasi, con liberazione di peptidi e aminoacidi che stimolano la crescita dei microrganismi e caratterizzano l'aroma e il sapore dei PDF e fitasi, che riducono il contenuto di composti antinutrizionali (Ganzle, 2014; De Vuyst & Neysens, 2005). Inoltre, l'abbassamento di pH determina un aumento del volume dell'impasto, per la maggiore capacità del glutine di trattenere CO₂ e per la solubilizzazione degli arabinoxilani che assorbono più acqua (Corsetti *et al.*, 2010). L'acidificazione aumenta, inoltre, la durata la *shelf life* del prodotto, proteggendolo dallo sviluppo di microrganismi alterativi. Oltre che per gli acidi organici, in particolare acido acetico che ha effetto diretto sulle muffe e sui bacilli sporigeni (come *Bacillus subtilis*, responsabile del difetto "pane filante"), l'azione antimicrobica si esplica attraverso la produzione di altre molecole da parte dei LAB, quali perossido di idrogeno, acido fenilattico, diacetile ma soprattutto batteriocine (es. plantaricina da ceppi di *L. plantarum*) e antibiotici (es. reuteriicina da ceppi di *L. reuteri*), che hanno mostrato effetto anche contro microrganismi patogeni (es. *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*) e muffe produttrici di micotossine (es. *Aspergillus* e *Fusarium*), aumentando la qualità igienico-sanitaria dei lievitati (Păcularu-Burada *et al.*, 2020; Gobbetti *et al.*, 2010; Corsetti & Settanni, 2007). Inoltre, il prolungamento della *shelf life* è dovuto anche alla produzione di esopolisaccaridi (EPS) da parte di alcune specie di LAB e alla solubilizzazione degli arabinoxilani, che contribuiscono a ritardare il raffermaimento (De Vuyst & Neysens, 2005; Decock & Cappelle, 2005; Katina, 2006).

L'utilizzo di lievito *naturale* determina anche dei cambiamenti delle proprietà reologiche dei lievitati. In particolare, la produzione degli EPS influenza la viscosità dell'impasto, conferendo ai PDF maggiore sofficità, oltre a determinare un aumento di volume (Ganzle,

2014; Gobbetti *et al.*, 2010; Corsetti & Settanni, 2007). Inoltre, l'acidificazione e l'attività proteolitica determinano la solubilizzazione e depolimerizzazione delle frazioni del glutine, con conseguente diminuzione della consistenza dell'impasto che risulta più estensibile. In questo senso, anche la prevalenza di acido lattico (glutine più elastico) rispetto all'acido acetico (glutine più rigido) o viceversa (quindi il QF) determina differenze nella *texture* dell'impasto (Ganzle, 2014; Arendt *et al.*, 2007; Corsetti & Settanni, 2007; Katina, 2006; Wehrle *et al.*, 1977).

Un'altra proprietà caratterizzante il lievito *naturale* è il miglioramento delle qualità sensoriali, in particolare del sapore e dell'aroma, sia della crosta che della mollica. L'attivazione delle proteasi endogene a seguito dell'acidificazione e l'azione peptidasi dei LAB determinano la liberazione di aminoacidi, i quali possono prendere parte alla reazione di *Maillard* durante la cottura, insieme con zuccheri riducenti liberati dalle amilasi, a formare molecole aromatiche (es. 2-acetil-pirolina, dall'arginina) e/o polimeri di colore bruno (es. melanoidine), oppure essere convertiti dai lattobacilli in composti volatili quali alcoli, aldeidi ed esteri, attraverso metabolismi secondari durante la fermentazione (Arendt *et al.*, 2007). Questi ultimi possono essere prodotti anche da parte dei lieviti, che in associazione ai LAB determinano lo sviluppo di un aroma più marcato (De Vuyst *et al.*, 2016; Thiele *et al.*, 2002; Gobbetti, 1998). Tra i principali composti volatili, si ricordano acetaldeide, diacetile, etilacetato, 1-propanolo, 2-metil-1-pentanololo, esanale, 3-metil-esanale (Gobbetti *et al.*, 2010).

Il lievito *naturale*, infine, svolge un ruolo tecnologico importante nel pane di segale. Infatti, l'acidificazione rallenta l'attività amilasica della farina, la quale, essendo estremamente elevata, potrebbe determinare una completa degradazione dell'amido prima della sua gelatinizzazione in cottura (Ganzle, 2014). Inoltre, la solubilizzazione degli arabinoxilani, presenti in concentrazioni elevate, migliora il legame dell'acqua nell'impasto (Arendt *et al.*, 2007) e, insieme agli EPS prodotti, contribuisce alla formazione di una struttura dell'impasto adeguata, fronteggiando al minor contenuto di glutenine (Decock & Cappelle, 2005). Per tale motivo, frequentemente nel pane di segale si utilizza lievito *naturale* liquido con una maggiore TTA e un pH più basso (De Vuyst, *et al.*, 2017).

Capitolo 2

RUOLI FUNZIONALI DEL LIEVITO NATURALE

Oltre che al miglioramento delle proprietà reologiche, dell'aroma, del sapore e della conservazione, la riscoperta odierna del lievito *naturale* è legata ai suoi aspetti nutrizionali e funzionali. Il ruolo nutrizionale degli impasti acidi è stato per lungo tempo associato principalmente alla funzione dietetica dei PDF in generale. Infatti, il pane bianco fornisce circa 270 kcal/100g, derivanti per il 70% da amido e per il 15% da proteine, seppur a basso valore biologico, essendo la composizione amminoacidica povera di alcuni aminoacidi essenziali (es. lisina e treonina). In aggiunta ai nutrienti energetici, il pane apporta anche minerali (potassio, magnesio, fosforo, rame e zinco) e vitamine (tiamina, riboflavina, niacina, piridossina e acido folico), che coprono circa il 10% del fabbisogno giornaliero (CREA, 2018; Dewettinck *et al.*, 2008). Tali valori nutrizionali differiscono notevolmente nel caso di pane prodotto con farina integrale, in relazione alla diversa composizione chimica e in particolare alla presenza di crusca ed eventualmente del germe. Seppur il valore nutrizionale delle farine poco raffinate sia superiore, rispetto a quella raffinata, queste si caratterizzano anche per la presenza di composti anti-nutrienti ed eventualmente contaminanti, quali muffe micotossinogene e residui di fitofarmaci. Anche l'utilizzo di sfarinati di altri cereali, pseudo-cereali o legumi, sempre in miscela con grano, determina delle differenze compositive rilevanti. Ancor più, i PDF lievitati, caratterizzati dall'aggiunta di altri ingredienti, quali ad esempio grassi, sale in elevate quantità, avranno valori nutrizionali molto diversi dal pane (Cannella, *et al.*, 2010).

Per quanto sopra, nell'ambito di una dieta equilibrata, dove circa il 60% dell'energia dovrebbe provenire dai carboidrati, i PDF lievitati sono utili a fornire i macro/micro-nutrienti necessari per soddisfare le esigenze nutrizionali, quindi garantire lo sviluppo e la crescita della persona. Tuttavia, oggi il consumatore ricerca alimenti che non siano solo nutritivi ma che mantengano anche un adeguato livello di salute e/o proteggano dall'insorgenza di patologie. Da qui la spinta alla diffusione degli alimenti funzionali (*functional foods*), definiti dalla Commissione Europea come «un alimento che ha effetto benefico su una o più funzioni metaboliche nel corpo, al di là degli effetti nutrizionali, in un

modo che sia rilevante per il miglioramento dello stato di salute e benessere e/o per la riduzione del rischio di malattia». In mancanza di un significato universalmente riconosciuto, si inseriscono all'interno di tale definizione anche alimenti privati di un ingrediente dannoso, addizionati di elementi naturali con proprietà benefiche (fibre, vitamine, ecc.), o che presentino una maggiore biodisponibilità di un componente (Bigliardi & Galati, 2013). In tal senso, anche il pane e i PDF a lievitazione *naturale* possono essere considerati alimenti funzionali. Infatti, i LAB e lieviti degli impasti acidi possono limitare la presenza di anti-nutrienti e contaminanti, aumentare la biodisponibilità della componenti positive degli sfarinati e produrre metaboliti con effetti benefici per l'organismo (Păcularu-Burada *et al.*, 2020; De Vuyst *et al.*, 2017; Cannella *et al.*, 2010).

2.1 Riduzione dell'indice glicemico

Il pane e i PDF contengono amido (carboidrato complesso), attivamente degradato dagli enzimi idrolitici, amilasi e maltasi, e zuccheri, mono- e di-saccaridi (carboidrati semplici), che non richiedono l'intervento di enzimi idrolitici e sono già disponibili all'assorbimento. In relazione alla loro natura, la velocità di digestione dei carboidrati varia notevolmente, risultando più rapida nel caso dei carboidrati semplici rispetto a quella prevista per i carboidrati complessi (Titta, 2016; Dewettinck *et al.*, 2008). Per questo motivo, il consumo di diverse tipologie di carboidrati influenza la concentrazione e la velocità di incremento di glucosio nel sangue che, a loro volta, sono correlate allo stato di salute dell'organismo. In particolare, l'iperglicemia, ovvero l'elevato livello di glucosio ematico, è un noto fattore di rischio per lo sviluppo di malattie croniche, metaboliche e non, come il diabete mellito, la malattia coronarica e il cancro al seno (Barclay *et al.*, 2008). Da qui l'importanza dell'Indice Glicemico (*Glycemic Index, GI*), un parametro che permette di valutare l'aumento dei livelli di glucosio nel sangue a seguito della digestione di un alimento. Nello specifico, il GI è definito dal rapporto percentuale tra l'incremento glicemico indotto dall'ingestione di una porzione di un alimento rispetto ad un altro di riferimento (glucosio o pane bianco) con una pari quantità di carboidrati. Il GI tiene conto della tipologia dei carboidrati ma non della quantità degli stessi. Perciò, in ambito medico-nutrizionale, si definisce anche il Carico Glicemico (*Glycemic Load, GL*), dato dal prodotto del GI di un alimento per la quantità (in grammi) di carboidrati in esso contenuta, diviso cento (SID, 2010) (Cannella *et al.*, 2010). Una volta arrivato nel circolo sanguigno, il metabolismo del glucosio è regolato dall'ormone pancreatico insulina, ipoglicemizzante; per tale motivo, nell'analisi della risposta glicemica

post-prandiale si valuta anche l'Indice Insulinico (*Insulin Index, II*), ovvero i livelli ematici dell'insulina (Cariolo, 2014).

Numerosi studi sui PDF hanno dimostrato che la fermentazione con lievito *naturale* è in grado di determinare una diminuzione di GI, GL e II (Lappi *et al.*, 2010), sia *in vitro* che *in vivo*, su soggetti sani e diabetici (o intolleranti al glucosio). Infatti, l'abbassamento del pH a seguito dell'attività fermentativa riduce la digeribilità dell'amido e/o la velocità di assorbimento (Poutanen *et al.*, 2009); ciò avviene mediante diversi meccanismi, correlati alla sua struttura molecolare, all'attività degli enzimi digestivi, alla viscosità del bolo alimentare e alla velocità di svuotamento gastrico (Burton & Lightowler, 2006). In particolare, la presenza di acido lattico inibisce gli enzimi amilolitici, riducendo l'idrolisi e quindi rallentando l'assorbimento dell'amido (Liljeberg *et al.*, 1995), mentre la presenza di acido acetico rallenta la velocità di svuotamento gastrico, con conseguente ritardo nell'assorbimento di tutti i principi nutritivi (Liljeberg & Björck, 1998). Contestualmente, l'abbassamento di pH aumenta la viscosità del pane a livello del tubo digerente, determinando in tal modo un ritardo nell'assorbimento dei nutrienti (Würsch & Pi-Sunyer, 1997).

In particolare, da uno studio condotto da De Angelis *et al.* (2009) è emerso un valore di GI del pane bianco a lievitazione naturale pari a ca. 41%, notevolmente inferiore da quello identificato per il pane bianco e il pane integrale prodotto con lievito compresso (GI medio di ca. 71%) (Atkinson *et al.*, 2008). Pertanto, in linea con le raccomandazioni della *Harvard Medical School*, che classifica gli alimenti in base al loro GI (basso, inferiore a 55%; medio, tra 56% e 69%; alto, superiore a 70%), il pane bianco a lievitazione naturale è un alimento a basso indice glicemico (D'Alessandro e De Pergola, 2014). Tale peculiarità è da attribuire primariamente all'acidificazione dell'impasto, dovuta all'attività metabolica dei LAB, che favorendo l'interazione tra l'amido e le proteine del glutine, determina la diminuzione del grado di gelatinizzazione e quindi della disponibilità dell'amido (Burton & Lightowler, 2006; Östman *et al.*, 2002). Ciò è evidente anche dal confronto tra il GI di pane a lievitazione naturale e quello di pane prodotto con lievito compresso; il primo, infatti, presenta una risposta glicemica inferiore, sia *in vitro* che *in vivo*, sia su soggetti sani che su soggetti intolleranti al glucosio (Rizzello *et al.*, 2019; Scazzina, *et al.*, 2009; Maioli *et al.*, 2008). Questo ruolo funzionale del lievito *naturale* è enfatizzato dall'utilizzo di farina integrale, in particolare macinata a pietra, che determina una maggiore riduzione della risposta glicemica del pane grazie alla presenza del germe di grano, e al maggior contenuto di fibra solubile (Figura 2.1) (Lappi *et al.*, 2010; De Angelis *et al.*, 2009).

Pur supponendo gli stessi effetti, ad oggi non sono disponibili in letteratura studi riguardanti l'impatto del lievito *naturale* sulla risposta glicemica dei PDF; questi ultimi, infatti, presentano generalmente valori medi di IG superiori, specie se contenenti zuccheri semplici (Foster-Powell *et al.*, 2002), e la risposta glicemica sembra essere influenzata più dalla presenza di fibra.

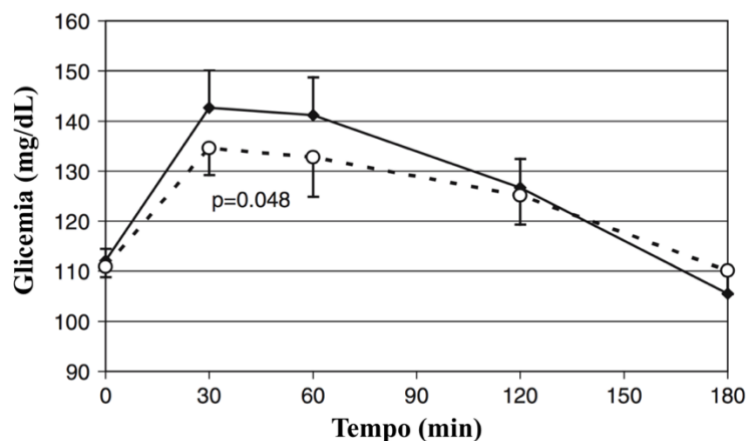


Figura 2.1: Risposta glicemica del pane con lievito di birra (diamante) e del pane con lievito naturale (cerchio)
(adattata da De Angelis *et al.*, 2009)

Sulla base degli studi finora realizzati e delle Linee guida per una sana alimentazione, le quali prevedono che ca. il 50-55% di energia giornaliera sia fornito da carboidrati complessi, il lievito *naturale* può rappresentare un utile ausilio per soddisfare le raccomandazioni nutrizionali riducendo il rischio di sviluppare malattie metaboliche in soggetti sani, o controllando la risposta glicemica in soggetti diabetici.

2.2 Incremento di concentrazione di fibra alimentare e sintesi di esopolisaccaridi

Oltre ad amido e zuccheri, digeriti dal nostro organismo a scopi energetici, i cereali contengono anche carboidrati non disponibili all'idrolisi enzimatica, che costituiscono la fibra alimentare. In accordo con le diverse definizioni esistenti, questa può essere descritta come la componente commestibile degli alimenti non digeribile dallo stomaco e dall'intestino tenue ma fermentata parzialmente o totalmente nell'intestino crasso (Lattimer & Haum, 2010). Essa comprende un vasto gruppo di molecole, principalmente di natura polisaccaridica, distinte convenzionalmente in: fibre insolubili, quali cellulose ed emicellulose (xilani) ma anche lignina; fibre solubili, quali pectine, β -glucani ma anche

galatto-oligosaccaridi (*Galacto-oligosaccharides, GOS*), inulina e frutto-oligosaccaridi (*Fructo-oligosaccharides, FOS*). All'interno della fibra alimentare viene incluso l'amido resistente (*Resistant Starch, RS*), caratterizzato da particolari legami e/o riarrangiamenti molecolari che lo rendono inattaccabile degli enzimi digestivi (Anderson *et al.*, 2009).

Come riportato da Lattimer & Haum (2010) e da Anderson *et al.* (2009), numerosi studi hanno correlato l'assunzione di fibra alimentare alla riduzione del rischio di sviluppo di malattie cardiovascolari (*Cardiovascular Disease, CVD*), diabete, obesità e alcune malattie gastrointestinali. Infatti, il consumo di fibre, in particolari solubili: (i) abbassa la pressione sanguigna e i livelli di colesterolo nel sangue, (ii) rallenta l'assorbimento di nutrienti e la risposta glicemica post-prandiale, (iii) rafforza il sistema immunitario (Lattimer & Haum, 2010; Anderson *et al.*, 2009). Nello specifico, quest'ultima funzionalità è correlata all'azione prebiotica di alcune fibre alimentari, che stimolano selettivamente la proliferazione e/o l'attività di specifici gruppi microbici del microbiota intestinale. In particolare, le fibre alimentari sono fermentate lentamente nel colon e nel cieco da bifidobatteri e lattobacilli, che producono acidi grassi a catena corta (*Short Chain Fatty Acids, SCFA*) proteggendo dallo sviluppo di alcune patologie e rafforzando il sistema immunitario (Păcularu-Burada *et al.*, 2020; Carlson *et al.*, 2018). La Società Italiana di Nutrizione Umana (SINU) raccomanda il consumo di 25-30 g di fibra al giorno, tuttavia, gli effetti fisiologici delle fibre variano in base alle caratteristiche chimico-fisiche delle stesse, come ad esempio il grado di polimerizzazione e reticolazione, dimensione delle particelle, la solubilità e la capacità di assorbire acqua (Guillon & Champ, 2000). Queste caratteristiche possono essere influenzate dall'attività microbica e in particolare dall'abbassamento di pH; in tal senso, la fermentazione con lievito *naturale* può incrementare il ruolo funzionale della fibra alimentare nei PDF lievitati.

2.2.1 Solubilizzazione della fibra

L'acidificazione ad opera dei LAB attiva le endoxilanasie endogene della farina (pH ottimale tra 3,5 e 5,5), le quali, insieme alle endoxilanasie microbiche associate alla cariosside, idrolizzano gli arabinoxilani insolubili (*Arabinoxylan, AX*), presenti nel frumento in concentrazione di ca. l'1,5-3%. Ciò determina un decremento del loro grado di polimerizzazione e la liberazione di pentosani con azione prebiotica e oligomeri solubili, come arabinosio e xilosio, che possono essere metabolizzati da LAB eterofermentanti obbligati, come *L. fermentum* (Katina *et al.*, 2012; Broekaert *et al.*, 2011; Lappi *et al.*, 2010; Van Craeyveld *et al.*, 2008). I LAB, inoltre, attraverso i propri enzimi, come ferulato esterasi, determinano la liberazione nella matrice degli AX legati con composti fenolici,

come l'acido ferulico (Ganzle, 2014). Nel complesso, aumenta l'assorbimento di acqua da parte della fibra e ciò contribuisce anche al miglioramento della sofficità, dell'estensibilità e del volume dell'impasto (Gobbetti *et al.*, 2010). Gli effetti dell'incremento della concentrazione delle fibre alimentari solubili, parallelamente ad un aumento di aminoacidi liberi e composti bioattivi, sono stati osservati nei PDF realizzati con farina arricchita di crusca e fermentati mediante ceppi selezionati di lattobacilli, rispetto a quelli con lievito di birra (Rizzello *et al.*, 2012). Inoltre, in uno studio condotto da Saa *et al.* (2018) è stato osservato che la fermentazione di un impasto con farina di KAMUT® o grano duro (DY 160) con ceppi selezionati di *L. plantarum*, *L. sanfranciscensis*, *L. brevis* e *S. cerevisiae* per 24 ore a 30 °C ha aumentato la solubilità degli AX, oltre ad un incremento di RS e FOS.

In considerazione del fatto che l'assunzione media di fibra in Italia si attesta intorno a 18-19 g/giorno (Giampaoli *et al.*, 2015), al di sotto dei valori raccomandati, il pane e i PDF realizzati con lievito *naturale* e sfarinati integrali possono contribuire, tramite l'apporto di fibra e prebiotici, al mantenimento dello stato di salute e alla prevenzione dallo sviluppo di malattie, assumendo un importante ruolo funzionale (Anderson *et al.*, 2009).

2.2.2 Sintesi di esopolisaccaridi

Il ruolo funzionale dei PDF a lievitazione naturale è legato anche alla produzione di esopolisaccaridi (*Exopolysaccharides*, *EPS*) da parte dei lattobacilli presenti negli impasti acidi. Tale gruppo di molecole è assimilabile alla fibra alimentare, perché non viene digerito e assorbito nell'intestino tenue ma arriva nell'intestino crasso, dove può stimolare la crescita dei bifidobatteri, svolgendo azione prebiotica (Salazar *et al.*, 2016; Caggianiello *et al.*, 2016). Gli EPS vengono distinti sulla base della propria struttura in due classi: eteropolisaccaridi (*hetero-polysaccharides*, *HePS*), costituiti da diversi monosaccaridi e sintetizzati nel citoplasma per poi essere escreti; omo-polisaccaridi (*homo-polysaccharides*, *HoPS*), costituiti unicamente da glucosio o fruttosio e sintetizzati nello spazio extra-cellulare a partire dal saccarosio, mediante glicansucrasi. Ciò è importante perché la loro funzionalità dipende dalla composizione, dal peso molecolare e dalla conformazione strutturale (Rühmkorf *et al.*, 2012). Diversi ceppi appartenenti ai generi di *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* e *Lactobacillus* sono coinvolti nella biosintesi degli EPS, per metabolizzare il saccarosio, proteggersi dagli stress ambientali e colonizzare l'ambiente circostante formando biofilm. In particolare, i lattobacilli isolati dagli impasti acidi, come ad es. *L. sanfranciscensis*, *L. frumenti* e *L. reuteri*, producono principalmente HoPS, quali destrani (es. destrano e reuterano) e fruttani (es. fruttano e levano), in concentrazione tra 0,5-2 e 16

g/kg di farina. In linea generale, è importante sottolineare che la quantità e la tipologia di EPS prodotta è strettamente correlata al ceppo microbico e alle caratteristiche della matrice, quali, nello specifico, pH, temperatura e presenza di saccarosio (Torino *et al.*, 2015; Schwab *et al.*, 2008; Di Cagno *et al.*, 2006; Koraki *et al.*, 2002). A causa della loro capacità di assorbire acqua e rigonfiarsi, gli EPS migliorano il volume e la consistenza del pane e rallentano il raffermamento; perciò, l'utilizzo di colture starter di LAB selezionati per la produzione *in situ* di EPS rappresenta un'alternativa valida all'utilizzo di idrocolloidi come additivi, specie nei prodotti senza glutine (Galle *et al.*, 2012; Tieking & Ganzle, 2005).

2.3 Riduzione di composti associati alla sindrome dell'intestino irritabile

La sindrome dell'intestino irritabile (*Irritable Bowel Syndrome, IBS*) è un disturbo intestinale che interessa circa il 7-21% della popolazione mondiale, provocando gonfiore e dolori addominali, diarrea e/o costipazione, e alterazioni del microbiota intestinale. Ad oggi, i criteri diagnostici, l'eziologia e i meccanismi patogenetici della IBS non sono ancora del tutto definiti e i sintomi sono sovrapponibili a quelli della sensibilità al glutine o al grano non celiaca (*Non-Celiac Gluten Sensitivity/Non-Celiac Wheat Sensitivity, NCGS/NCWS*), patologia scatenata dall'ingestione di glutine o grano in soggetti non celiaci e non allergici al grano (Muir *et al.*, 2019; De Giorgio *et al.*, 2016; Chey *et al.*, 2015). Nonostante non siano stati identificati un alimento o una sostanza nutritiva determinanti della malattia, gli oligo-, di- e monosaccaridi fermentabili e i polioli (*Fermentable Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides and Polyols, FODMAP*), sembrano avere un ruolo determinate (Varjú *et al.*, 2017). Tuttavia, anche altre molecole, quali glutine, inibitori dell'amilasi e della tripsina (*Amylase Trypsin Inhibitors, ATI*) e lectine, sembrano indurre i sintomi della IBS (Rinninella *et al.*, 2019a; Roszkowska *et al.*, 2019). Tutti i suddetti composti sono presenti negli sfarinati dei cereali e di conseguenza nei PDF, ma allo stato attuale la fermentazione con lievito *naturale* è in grado di diminuire il contenuto di ATI, di FODMAP e di glutine nei PDF, ponendosi come opzione nella gestione di IBS.

L'attività metabolica dei LAB del lievito *naturale* può determinare, in condizioni specifiche, la degradazione delle proteine del glutine dei PDF (Rizzello *et al.*, 2007) e alcuni soggetti affetti da IBS manifestano miglioramenti seguendo una dieta senza glutine (Zannini & Arendt, 2018). Infatti, a seguito della somministrazione per 6 settimane di pane e pasta di frumento a lievitazione naturale con ridotto contenuto di glutine (meno del 50% dei prodotti convenzionali) la gravità della IBS è diminuita significativamente in tutti i soggetti; tuttavia,

solo in metà di essi la diminuzione era superiore al 30%. Secondo gli autori, ciò è legato alla contemporanea presenza di ATI e FODMAP, che nelle condizioni sperimentali adottate non erano stati degradati (Calasso *et al.*, 2018).

Oltre alla riduzione del contenuto in glutine, la fermentazione con lievito *naturale* ha portato alla diminuzione della concentrazione di ATI, rispetto alla farina e al pane con lievito di birra; ciò è dovuto all'attivazione delle proteasi endogene a bassi valori di pH, all'attività peptidasi dei LAB (Laatikainen *et al.*, 2017) e all'azione glutatione reduttasica che riduce i legami disolfuro delle proteine (Huang *et al.*, 2020). Alcuni studi *in vitro* e su animali hanno dimostrato che gli ATI hanno un effetto pro-infiammatorio sulle cellule epiteliali intestinali e quindi potrebbero innescare sintomi gastrointestinali (Zevallos *et al.*, 2017); per tanto, si ritiene che la loro degradazione possa contribuire ad attenuare i sintomi della IBS. In effetti, si è osservato che l'attività inibitoria dell'amilasi dopo la fermentazione del lievito *naturale* è diminuita significativamente, così come il rilascio di molecole pro-infiammatorie in una linea cellulare monocitica umana (Huang *et al.*, 2020).

Oltre al glutine e agli ATI, i sintomi della IBS sono indotti dai FODMAP, i quali, a causa della carenza di enzimi digestivi e/o della limitata capacità di assorbimento e/o dell'elevata quantità ingerita, passano nel colon e sono fermentati rapidamente dal microbiota dell'intestino crasso, producendo gas e aumentando il volume del lume per azione osmotica, causando gonfiore e dolore addominale (Altobelli *et al.*, 2017). I FODMAP più diffusi nei cereali, principalmente negli strati esterni della cariosside, sono fruttani (FOS), raffiniosio (GOS), fruttosio e sorbitolo e mannitolo (Biesiekierski *et al.*, 2011). È stato confermato che una dieta a basso contenuto di FODMAP (*low-FODMAP diet*) riduce i disturbi della IBS del 52-86% di pazienti (Liu *et al.*, 2020). Alcuni studi hanno evidenziato che i lieviti, come *S.cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*, sono in grado di ridurre il contenuto di FOS del 90% in pani con farina di frumento tenero e di farro di diverse cultivar, a seguito di una fermentazione prolungata, grazie all'espressione degli enzimi invertasi e inulinasi (fruttosidasi) (Laurent *et al.*, 2020; Struyf *et al.*, 2017; Ziegler *et al.*, 2016). Anche la fermentazione prolungata (più di 12 ore) con lievito *naturale* ha diminuito il contenuto di fruttani del 74 % nel pane di farina di grano tenero, sia per l'espressione di enzimi microbici che per attivazione delle invertasi endogene a bassi valori di pH. Tuttavia, una volta che il pane è stato somministrato per 7 giorni a 26 pazienti con IBS, non sono state evidenziate differenze significative nei marcatori infiammatori rispetto alla condizione iniziale o in confronto al consumo di pane con lievito di birra da fermentazione rapida (meno di 2 ore) (Laatikainen *et al.*, 2017). Ciò potrebbe essere legato alla presenza di fruttosio, non

degradato, e alla capacità dei LAB eterofermentanti di convertire il fruttosio in mannitolo (Loponen & Gänzle, 2018). Pertanto, uno studio recente ha analizzato un lievito *naturale* prodotto con ceppi di LAB fruttofilici (*Fructophilic Lactic Acid Bacteria, FLAB*) che metabolizzano preferenzialmente il fruttosio e il mannitolo. Questi sono stati utilizzati insieme con enzimi commerciali con attività β -glicosidasi in una fermentazione di 3 ore a 35 °C (DY 280) e in condizioni aerobiche, determinando una maggiore riduzione dei fruttani e una diminuzione del fruttosio e del mannitolo, rispetto ai tradizionali lattobacilli del lievito *naturale* (Albiac *et al.*, 2020). In due studi clinici randomizzati, il consumo di pane di segale prodotto con ceppi di *Lactobacillus* con attività fruttanasica e ridotto accumulo di mannitolo, ha determinato la riduzione di sintomi della IBS come flatulenza, dolore addominale, crampi e brontolii allo stomaco (Pirkola *et al.*, 2018; Laatikainen *et al.*, 2016). Inoltre, Costabile *et al.* (2014) hanno dimostrando che il consumo di pane con lievito *naturale* (15-24 ore di fermentazione) riduce la produzione di gas e portando ad un miglioramento dello stato del microbiota intestinale in soggetti affetti da IBS, rispetto al pane con lievito di birra. Infine, è stato dimostrato che la somministrazione di croissant a lievitazione naturale rallenta lo svuotamento gastrico e riduce la produzione gas-intestinale in maniera maggiore rispetto ai croissant con lievito di birra, con una gravità complessiva dei sintomi postprandiali inferiore del 36% (Polese *et al.*, 2018).

In considerazione del fatto che ancora non è possibile definire esattamente le molecole responsabili dello sviluppo della patologia, e che una dieta a basso contenuto di FODMAP esclude alimenti di base e riduce l'assunzione di fibre e prebiotici (FOS e GOS), il pane prodotto con lievito *naturale* da ceppi selezionati e a seguito di una lunga fermentazione sembra poter essere una buona strategia per apportare benefici ai soggetti affetti da IBS. Tuttavia, sono necessari studi clinici prolungati e su larga scala per confermare definitivamente tali ipotesi *in vivo* (Muir *et al.*, 2019; Menezes *et al.*, 2018).

2.4 Aumento della biodisponibilità di minerali

I cereali contengono circa l'1,5-2,5 % di minerali, quali fosforo, calcio, potassio, magnesio, ferro, zinco e selenio, localizzati soprattutto nei rivestimenti esterni (crusca) e nel germe delle cariossidi (D'Egidio, 2004). Pertanto, i derivati degli sfarinati, in particolare di quelli integrali, rappresentano una buona fonte di minerali, micronutrienti essenziali per il corretto svolgimento di numerose funzioni fisiologiche dell'organismo (Dewettinck *et al.*, 2008). In tal senso, al di là della quantità totale presente nell'alimento, è essenziale la biodisponibilità dei minerali, ovvero la frazione ingerita di un nutriente che può essere

assorbita e introdotta nel flusso sanguigno per assolvere alla sua funzione (Parada & Aguilera, 2007).

Nonostante il contenuto di minerali, la biodisponibilità di questi elementi nel pane e nei PDF è limitata dalla presenza di un composto anti-nutrizionale, l'acido fitico (mio-inositolo esafosfato, IP₆), il quale forma complessi insolubili con gli ioni metallici (Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺) impedendo il loro assorbimento a livello intestinale. Inoltre, a bassi valori di pH, avviene la complessazione dei gruppi basici dei composti azotati, diminuendo la disponibilità di proteine, peptidi e aminoacidi (Kumar *et al.*, 2010). L'acido fitico è contenuto in diversi tessuti vegetali, tra cui le cariossidi dei cereali (1-4% del peso secco), dove assolve alla funzione di riserva di fosforo e fonte di inositolo (Corsetti & Settanni, 2007). Esso è particolarmente presente nelle farine integrali (22 mg/g), perché localizzato in elevata quantità nello strato aleuronico della cariosside, ma si ritrova anche nella farina raffinata (3-4 mg/g nel grano tenero) (Garcia-Esteva *et al.*, 1991).

In relazione alla varietà e all'epoca del raccolto, i cereali contengono enzimi specifici, le fitasi, che hanno la capacità di idrolizzare l'acido fitico in acido fosforico ed esteri fosforici del mio-inositolo. Questi ultimi, al diminuire dei gruppi fosfato presentano una minore capacità chelante o formano complessi più solubili; di conseguenza, l'effetto antinutrizionale si riduce. Tuttavia, le fitasi endogene sono considerate insufficienti per contrastare efficacemente l'azione dell'acido fitico, sia perché l'attività nei cereali è variabile sia perché le condizioni di pH in cui si trovano non sono ottimali (Ganzle, 2014; Požrl *et al.*, 2007; Cossa *et al.*, 2000; Sandberg *et al.*, 1999; Fretzdorff & Brummer, 1992). In questo senso, è stato dimostrato che la produzione di PDF con lievito *naturale* ha un duplice effetto nel ridurre il tenore di acido fitico e aumentare la biodisponibilità di minerali. In primis, infatti, l'abbassamento di pH dell'impasto correlato alla fermentazione operata dai LAB determina l'attivazione delle fitasi endogene della farina, le quali presentano una cinetica enzimatica massima tra pH 3,5 e 5 (effetto indiretto) (Leenhardt *et al.*, 2005; Turk *et al.*, 1996). Secondariamente, alcuni LAB del lievito *naturale* hanno una propria capacità di degradare l'acido fitico, producendo fitasi a livello cellulare (effetto diretto). Sebbene l'attività fitasica dipenda dallo specifico ceppo e dalle condizioni che si instaurano nella matrice, in particolare pH e temperatura, *L. sanfranciscensis*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. panis*, *Leuc. mesenterodites*, *Pediococcus pentosaceus* e *Weissella confusa* isolati da lievito *naturale* hanno ridotto la concentrazione di acido fitico dal 20 al 90% dopo 9-24 ore di fermentazione, quando inoculati come starter in impasti di farina integrale di frumento tenero e segale (Figura 2.2) (Mohammadi-Kouchesfahani *et al.*, 2019; Nuobariene

et al., 2015; De Angelis *et al.*, 2003; Lopez *et al.*, 2000; Shirai *et al.*, 1994). Tale effetto è stato amplificato quando i LAB sono stati inoculati con *S. cerevisiae* (Karaman *et al.*, 2018; Chaoui *et al.*, 2003). Infatti, anche i lieviti hanno dimostrato la capacità di degradare i fitati (Nuobariene *et al.*, 2011; Turk *et al.*, 2000, 1996). Nonostante l'attività fitasica di lieviti e LAB sembra esser inferiore a quella degli enzimi endogeni della farina (Reale, *et al.*, 2007; Leenhardt *et al.*, 2005), è stato osservato che la fermentazione con lievito *naturale* è più efficace nella riduzione di acido fitico nel pane rispetto alla lievitazione con lievito di birra (Karaman *et al.*, 2018; Chaoui *et al.*, 2003; Lopez *et al.*, 2001), portando ad un maggior contenuto di minerali liberi.

Sebbene l'assunzione di acido fitico non sia correlata ad alcuna patologia, la sua defosforilazione permette una maggiore assimilazione di alcune sostanze nutritive contenute negli alimenti, ovvero minerali ma anche proteine, peptidi e aminoacidi (Kies *et al.*, 2006). Inoltre, alcuni derivati dell'acido fitico, in basse concentrazioni, hanno mostrato effetti sulla protezione delle coronarie e contro disturbi arteriosclerotici e malattie dei tessuti neurali (Nissar *et al.*, 2017).

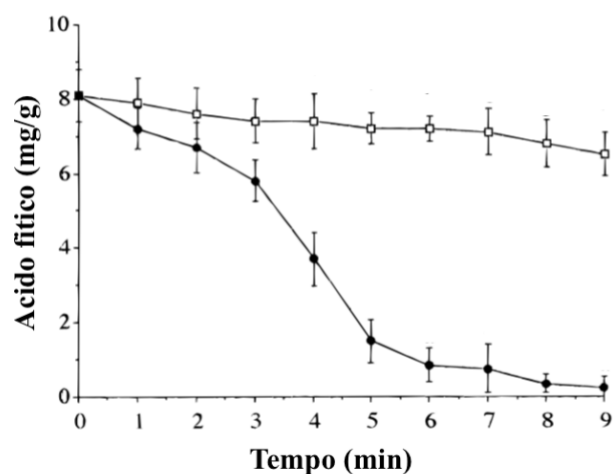


Figura 2.2: Riduzione di acido fitico in impasto in presenza (cerchio nero) o in assenza (quadrato bianco) di LAB
(adattata da Lopez *et al.*, 2000)

2.5 Diminuzione delle proprietà allergeniche e aumento della tolleranza del grano

Dopo l'amido, le componenti più rappresentative dei cereali sono le proteine, in particolare prolamine e gluteline, che costituiscono il 75-80 % delle proteine della cariosside e nel frumento tenero sono chiamate rispettivamente gliadine e glutenine. Le prime sono

monomeriche e sferiche, classificate in quattro gruppi in funzione della mobilità elettroforetica (α , β , γ , ω); le seconde, invece, sono polimeriche e ramificate, con subunità separate su gel di poliacrilamide in alto o basso peso molecolare; entrambe sono insolubili in acqua e caratterizzate dalla presenza di sequenze amminoacidiche ripetute. Dal punto di vista tecnologico, gliadine e glutenine sono fondamentali perché, durante l'impastamento, formano legami disolfuro e legami idrogeno, dando origine al glutine (D'Egidio, 2004). Pertanto, la quantità e la qualità di gliadine e glutenine sono determinanti nella definizione dell'attitudine tecnologica di uno sfarinato. Tuttavia, tali proteine sono importanti anche dal punto di vista nutrizionale. Infatti, la loro ingestione può causare reazioni avverse in soggetti della popolazione geneticamente predisposti: allergia al grano e celiachia. Ad oggi, si stima che l'incidenza nella popolazione mondiale di tale patologie sia rispettivamente dell'1% (Scherf *et al.*, 2016), pertanto il ruolo funzionale del lievito *naturale* nella riduzione della risposta alle proteine del grano assume un'elevata importanza salutistica (Rizzello *et al.*, 2014a; Tomassini *et al.*, 2011)

2.5.1 Allergia al grano

L'allergia al grano (*Wheat Allergy, WA*), in particolare di tipo alimentare, è un'ipersensibilità mediata da Immunoglobuline E (IgE), ovvero una reazione del sistema immunitario scatenata dall'esposizione alle subunità delle proteine del frumento (o loro derivati della digestione gastrointestinale), le quali presentano frammenti amminoacidici (epitopi) non digeribili che assumono funzionalità antigenica (allergeni). Oltre alle gliadine e alle glutenine del frumento (in particolare quelle ad alto peso molecolare), sembrano essere coinvolte nella risposta allergenica anche albumine e globuline, proteine solubili che costituiscono ca. il 20-30% delle proteine della cariosside. Inoltre, anche le proteine dell'orzo, della segale e dell'avena possono determinare la stessa patologia (Curioni & Giannattasio, 2010).

Ad oggi, non esiste una terapia per la WA se non l'esclusione totale e continuativa dalla dieta delle proteine immunogeniche. Tuttavia, sono in corso sperimentazioni di processi biotecnologici per ridurre l'allergenicità del grano, prima o durante la lavorazione; tra questi, rientra il pre-trattamento microbiologico della farina. Infatti, è stato dimostrato che i LAB sono in grado di ridurre le potenzialità allergeniche del grano (Fu *et al.*, 2020; Leszczyńska *et al.*, 2009). Ad esempio, alcuni ceppi isolati da lievito *naturale* hanno idrolizzato parzialmente albumine, globuline e gliadine della farina di grano e segale, contenenti epitopi in grado di legare le IgE dei pazienti allergici, lasciando pressoché inalterate le glutenine, essenziali per le proprietà tecnologiche della materia prima (Curioni & Giannattasio, 2010).

In particolare, in uno studio condotto da Rizzello *et al.* (2006) le specie *L. alimentarius*, *L. brevis*, *L. sanfranciscensis* e *Lactobacillus hilgardii* sono state inoculate in acqua e farina per creare un impasto acido semi-liquido (DY 340), fermentato per 24 ore a 37 °C, liofilizzato e successivamente utilizzato per produrre pane. L'immunofissazione con sieri di pazienti allergici ha dimostrato che, a seguito della simulazione *in vitro* del processo digestivo con pepsina, tripsina e pancreatina, le proteine estratte dal suddetto impasto acido e dal pane con esso prodotto non sono state più in grado di legare le IgE, diversamente da quanto accaduto in un impasto acidificato chimicamente o fermentato con lievito di birra per tempi brevi. In uno studio condotto da De Angelis *et al.* (2007) con una metodologia sperimentale simile, un preparato commerciale di lattobacilli e bifidobatteri probiotici è stato utilizzato come starter per la produzione di pane, evidenziando come l'attività fermentativa prolungata abbia permesso di ottenere una farina con epitopi IgE reattivi, degradabili dagli enzimi digestivi dell'organismo umano e con caratteristiche tecnologiche adeguate.

Nonostante il processo di cottura possa determinare la formazione di nuovi antigeni e l'attività proteolitica dei batteri non elimini tutte le frazioni allergeniche, la fermentazione ad opera di LAB selezionati permette di ottenere epitopi degradabili dagli enzimi digestivi, dando luogo a un pane tollerato da pazienti con allergia alimentare al grano.

2.5.2 Celiachia

La CD (*Celiac Disease*, *CD*) o intolleranza al glutine, invece, è un'enteropatia immuno-mediata, ovvero una reazione infiammatoria cronica a carico dell'intestino tenue, scatenata dall'assunzione di alimenti contenenti glutine in soggetti geneticamente predisposti ed esposti a molteplici fattori ambientali. La CD può manifestarsi in età pediatrica o adulta, e causa diversi sintomi tra cui l'alterazione della mucosa intestinale e la sindrome da malassorbimento. Una volta ingerito, il glutine è idrolizzato solo parzialmente dalle proteasi gastro-intestinali, originando peptidi con epitopi dall'attività immunogenetica, principalmente frammenti di α -gliadina ma anche di γ -gliadina e glutenina. Come per la WA, la CD è causata dal glutine di grano, segale, orzo e varietà correlate, nonché dall'avena o altri cereali, se contaminate durante le lavorazioni (Catassi & Francavilla, 2010).

Al momento, anche per la CD non esiste una terapia al di fuori dell'esclusione totale e continuativa dalla dieta di tutti gli alimenti contenenti glutine (*Gluten Free Diet*, *GFD*). Tra le terapie alternative alla GFD in fase di sperimentazione, si sta valutando il pre-trattamento della farina mediante fermentazione con lievito *naturale*. Infatti, seppure in condizioni biotecnologiche estreme, l'uso combinato di batteri lattici e di enzimi proteolitici fungini ha degradato completamente le proteine del glutine. In particolare, 10 ceppi di LAB

appartenenti alle specie *L. alimentarius*, *L. brevis*, *L. hilgardii* e *L. sanfranciscensis* isolati da lievito *naturale* e selezionati per l'attività peptidasi a carico del glutine sono stati utilizzati per la produzione di un impasto acido semi-liquido (DY 500), insieme con due proteasi di origine fungina (*Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*). A seguito di un processo fermentativo di 48 ore a 37 °C, l'impasto è stato essiccato e unito ad acqua, lievito di birra e idrocolloidi (DY 150) per la produzione di pane; l'aggiunta di additivi si è resa necessaria per sopperire alla degradazione del glutine. In questo modo, oltre ad avere caratteristiche organolettiche confrontabili con i prodotti realizzati con lievito di birra e farina non trattata, il pane ottenuto ha mostrato la degradazione totale degli epitopi tossici *in vitro* su colture cellulari umane; al termine del processo, si è raggiunto un contenuto in glutine inferiore a 10 ppm, tale da far rientrare il pane ottenuto nella definizione legislativa di alimento "senza glutine" (< 20ppm) (Reg. (UE) N. 828/2014) (Rizzello *et al.*, 2007). La stessa tecnologia è stata applicata anche per la produzione di pasta, sia con frumento tenero (Curiel *et al.*, 2014) che duro (De Angelis *et al.*, 2010), di pane con frumento duro (Rizzello *et al.*, 2016a) nonché di prodotti da forno dolci (Greco *et al.*, 2011). In quest'ultimo caso, la farina pre-trattata con lattobacilli e proteasi fungine è stata aggiunta a burro, zucchero e acqua per la realizzazione di biscotti e torte, con i quali sono stati realizzati due studi *in vivo* che hanno confermato l'assenza di tossicità (Greco *et al.*, 2011; Di Cagno *et al.*, 2010). I PDF dolci sono stati somministrati a pazienti celiaci in remissione, in dose pari a 200 g al giorno (ca. 8 g di glutine equivalente) per un periodo di 60 giorni, al termine del quale nessuno ha mostrato disturbi clinici, sviluppo di anticorpi o modificazione della mucosa intestinale, sia gli adulti (Greco *et al.*, 2011) che i giovani (Di Cagno *et al.*, 2010). Test *in vivo* relativi alla tolleranza della farina di grano idrolizzata per soggetti celiaci sono stati effettuati anche sul pane, con i medesimi risultati (Mandile *et al.*, 2017); inoltre, a seguito di brevetto (Giuliani *et al.*, 2014), tale metodo è stato utilizzato su scala industriale per la produzione del prodotto "Bontà di pane" della Giuliani s.p.a., commercializzato nel mercato italiano del senza glutine dal 2016.

2.5.3 Meccanismi di azione dei batteri lattici e prospettive

L'azione dei LAB nella diminuzione delle proprietà allergeniche e nella tolleranza del frumento in soggetti sensibili si esplica attraverso diversi meccanismi. In primis, l'abbassamento di pH determinato dalla fermentazione lattica attiva le proteasi endogene dei cereali, che hanno attività ottimale a valori di pH intorno a 4,0. Inoltre, l'attività glutatione reductasica dei lattobacilli eterofermentanti causa la riduzione dei ponti disolfuro del glutine, depolimerizzandolo. Infine, l'attività endopeptidasi intracellulare determina la degradazione dei polipeptidi rilasciati dagli enzimi endogeni della farina in oligopeptidi e

amminoacidi (Gobbetti, 2010; Cabrera-Chàvez & Calderòn de la Barca, 2010). Tuttavia, nel caso della CD, l'attività proteolitica dei LAB sembra non essere in grado di degradare completamente il glutine della farina di frumento (sia tenero che duro) o di segale (De Angelis *et al.*, 2006; Di Cagno *et al.*, 2004, 2002). Pertanto, si rende necessaria l'aggiunta di proteasi fungine esogene che idrolizzano le proteine in polipeptidi, successivamente degradati dai LAB (De Angelis *et al.*, 2010). In ogni caso, la riduzione degli epitopi tossici da parte dei LAB può essere sfruttata per la rimozione dei contaminanti nei prodotti senza glutine o senza proteine del grano (De Angelis *et al.*, 2006, 2007; Di Cagno *et al.*, 2004), mediante un processo fermentativo con DY, temperature e tempo di fermentazione inferiori, e ottenendo un pane con caratteristiche organolettiche accettabili senza aggiunta di additivi (Rizzello *et al.*, 2014a; Gerez *et al.*, 2008).

Considerando (i) il costo dei prodotti senza glutine o con farine alternative, (ii) gli aspetti nutrizionali e psicologici dell'esclusione dalla dieta dei PDF lievitati convenzionali e (iii) la presenza di altre patologie associate al glutine/grano (IBS e *NCGS/NCWS*), la degradazione completa delle proteine degli sfarinati può rappresentare un'alternativa vantaggiosa, sia dal punto di vista nutrizionale che sensoriale, per i soggetti celiaci o allergici al grano (Gobbetti *et al.*, 2018).

2.6 Aumento del contenuto di composti bioattivi

I composti bioattivi (*Bioactive Compound*, BC) sono molecole non nutrienti che, una volta assunte con gli alimenti, esplicano un effetto fisiologico sull'organismo. Tra questi, nei PDF troviamo alcuni composti fitochimici (*phytochemicals*), come acidi fenolici, tocoli, tannini, lignani e steroli, derivanti dagli sfarinati, insieme con anti-nutrienti, come l'acido fitico, gli inibitori degli enzimi digestivi e le lectine (proteine emo-agglutinanti) (Cannella *et al.*, 2010; Dewettinck *et al.*, 2008). Inoltre, tra i BC rientrano anche vitamine, peptidi e derivati amminoacidici (Hassani *et al.*, 2015). Come descritto per l'acido fitico, la concentrazione e la biodisponibilità di tali composti sono influenzate dalle trasformazioni a cui le farine vanno incontro. Oltre alla riduzione degli anti-nutrienti, la fermentazione con lievito *naturale* ha dimostrato di determinare l'incremento di alcuni BC (Tabella 2.1).

Tabella 2.1: Composti bioattivi liberati durante la fermentazione con lievito naturale

	BP	Effetto
<i>Fitochimici</i>	Acido ferulico, acido cumarico, acido caffeico, 4-etilguaiacolo, 4-etilfenolo, 1,3-benzoxazol-2-one, N-2-idrossimetil-acetamide, acido gallico, quercitina, catechina	Prevenzione sviluppo malattie croniche per azione antiossidante
<i>Peptidi, aminoacidi e derivati</i>	BP, lunasina, lisina, metionina, triptofano, GABA	Antiossidanti, ACE inibitori, antitumorali, aumento valore nutrizionale, precursori di aromi, antipertensivi
<i>Vitamine</i>	Folati, riboflavina, tiamina, piridossina	Essenziali per funzioni fisiologiche come cofattori enzimatici

2.6.1 Composti fitochimici

Alcune molecole appartenenti al gruppo dei composti fitochimici sono note per i propri ruoli funzionali. In particolare, ai composti fenolici sono stati attribuiti numerosi benefici (Van Hung, 2016). Diversi studi hanno dimostrato che i LAB del lievito *naturale* sono in grado di aumentare il contenuto dei fenoli liberi e l'attività antiossidante dei PDF (Adebo & Medina-Meza, 2020), grazie a metabolismi secondari complessi attuati per proteggersi dall'effetto antimicrobico dei suddetti. Mediante l'espressione ceppo-dipendente di enzimi specifici, i LAB liberano acidi fenolici quali acido ferulico, cumarico o caffeico e agliconi flavonoidi, producendo derivati fenolici o vinilici. Inoltre, alcuni lattobacilli sono in grado di degradare i tannini, che conferiscono un sapore amaro ai PDF e inibiscono gli enzimi digestivi (Ganzle, 2014). L'attività tannasica determina anche la liberazione di altri BC, quali acido gallico, quercitina e catechina (Adebo *et al.*, 2018).

Uno studio condotto da Liukkonen *et al.* (2003) su pane prodotto con farina di segale fermentato con colture starter di lattobacilli ha mostrato un incremento della concentrazione di composti fenolici liberi, con un aumento dell'attività antiossidante complessiva del prodotto. Altri studi hanno ottenuto i medesimi risultati su pane di segale (Martinez-Villaluenga *et al.*, 2009; Michalska *et al.*, 2007) e di grano tenero (Rizzello *et al.*, 2012), nonché con LAB in associazione a *S. cerevisiae* su miscugli di chicchi macinati di segale, frumento duro, grano saraceno, frumento tenero e acqua (Đordevic *et al.*, 2010). Inoltre, Hole *et al.* 2012 hanno dimostrato che alcuni ceppi di *L. acidophilus*, *L. reuteri* e *L. johnsonii*, utilizzati come starter, sono in grado di liberare acido ferulico reticolato con arabinoxilani, determinando l'aumento del contenuto di acidi fenolici liberi in pane di avena

o orzo. Infine, la fermentazione con lievito *naturale* per la produzione di pane di segale e di grano duro ha determinato la liberazione dei benzoxazinoidi coniugati e la loro conseguente conversione in metaboliti (Dihm *et al.*, 2017), i quali hanno mostrato effetti benefici per la salute (Adhikari *et al.*, 2015) e i cui ulteriori prodotti di degradazione sono stati trovati nel plasma dei soggetti in uno studio *in vivo* (Hanhineva *et al.*, 2014).

L'aumento della capacità antiossidante dei prodotti cerealicoli è influenzato anche dai lieviti, che incrementano la disponibilità di composti fenolici liberi grazie alla propria attività enzimatica (Wang *et al.*, 2014); tale aspetto è stato osservato, ad esempio, nella crosta di pizza prodotta da una lunga fermentazione con lievito compresso (Moore *et al.*, 2009).

2.6.2 Peptidi, aminoacidi e derivati

I peptidi bioattivi (*Bioactive peptides*, BP) sono frammenti proteici che, introdotti con gli alimenti, possono resistere agli enzimi digestivi e svolgere un ruolo positivo per la salute umana, grazie alle proprietà antiossidanti e antiinfiammatorie (Cicero *et al.*, 2017; Gobetti *et al.*, 2010). I BP possono formarsi dalle proteine dei cereali, sia durante la digestione ad opera delle proteasi gastrointestinali, sia nel corso della lavorazione di PDF lievitati, grazie all'azione degli enzimi proteolitici endogeni della farina e delle peptidasi microbiche (Magaluti *et al.*, 2012). In tal senso, è stato dimostrato che la fermentazione ad opera dei LAB del lievito *naturale* è in grado di aumentare il contenuto di BP.

In particolare, un impasto acido semi-liquido (DY 330) di acqua e farina di grano tenero integrale o altri cereali (grano duro, segale, farro, ecc.) è stato inoculato con un pool di lattobacilli e lasciato fermentare 24 ore a 37 °C. Rispetto all'impasto acidificato chimicamente, è stata riscontrata una maggiore concentrazione di BP (37 frazioni), i quali hanno mostrato resistenza agli enzimi digestivi *in vitro* e attività antiossidante *ex vivo* su cellule del tessuto connettivo di topo a seguito di stress ossidativo indotto (Coda *et al.*, 2012). Risultati simili sono stati ottenuti valutando l'attività metabolica di LAB isolati da lievito *naturale* e selezionati per l'attività proteolitica e peptidasica (*L. brevis*, *L. farciminis*, *L. plantarum*, *L. rossiae* e *L. sanfranciscensis*), inoculati in un impasto di farina di grano tenero: i peptidi prodotti hanno mostrato proprietà antiossidanti *in vitro*, anche su cellule intestinali umane (Galli *et al.*, 2018). Uno studio successivo ha confermato la maggiore concentrazione dei BP antiossidanti anche a seguito di cottura, nel pane con lievito *naturale* prodotto da ceppi selezionati delle specie *L. farciminis*, *L. sanfranciscensis* e *S. cerevisiae*, rispetto al controllo acidificato chimicamente (Luti *et al.*, 2020). Tra i BP più studiati per le loro proprietà funzionali ci sono gli inibitori dell'enzima convertitore dell'angiotensina (*Angiotensin-converting enzyme*, ACE), che hanno capacità ipotensive (Izzo & Weir, 2011),

e la lunasina, con proprietà antitumorali (Fernández-Tomé & Hernández-Ledesma, 2019). La fermentazione operata da un pool di lattobacilli isolati da lievito *naturale* su impasto semi-liquido (DY 330) di farina di grano tenero (bianco o integrale) o segale ha determinato un'attività ACE inibitoria *in vitro* del 82-95%, nettamente superiore a quella dell'impasto acidificato chimicamente (Rizzello *et al.*, 2008). Successivamente, è stato osservato che, pur subendo modificazioni, la concentrazione di peptidi ACE inibitori prodotti dall'attività metabolica dei LAB rimane elevata (60 µmol/kg) anche nel pane, a seguito di cottura (Zhao *et al.*, 2013). La fermentazione di un impasto (DY 160) di farina integrale di grano tenero (ma anche soia, orzo, amaranto e segale) inoculato con ceppi di lattobacilli selezionati per l'attività proteolitica ha aumentato fino a 2-4 volte la concentrazione del peptide lunasina rispetto all'impasto aggiunto di acido lattico e acido acetico (Rizzello *et al.*, 2011).

Oltre ai peptidi, dalla proteolisi primaria, operata dagli enzimi endogeni della farina attivati dai bassi valori di pH, e secondaria, operata dalle peptidasi batteriche, si originano anche amminoacidi, che possono essere rilasciati nell'impasto o metabolizzati ulteriormente dai LAB (Gobbetti, 2010). A tal proposito, il valore nutrizionale degli alimenti fermentati, come i PDF a lievitazione *naturale*, può aumentare grazie alla maggiore concentrazione di amminoacidi essenziali determinata da alcuni ceppi di lattobacilli, in particolare della lisina, di cui gli sfarinati di cereali sono carenti (Rizzello *et al.*, 2019; Gobbetti *et al.*, 2010). Ciò è stato osservato, in particolare, in alcuni cereali senza glutine, come mais, avena, riso e miglio, dove la fermentazione con lievito *naturale* ha aumentato il contenuto di lisina, metionina e triptofano disponibili (Gobbetti *et al.*, 2018). In alternativa, gli amminoacidi liberi possono essere utilizzati dai LAB per il proprio metabolismo energetico e convertiti in precursori di composti aromatici o molecole funzionali. È il caso dell'acido γ -ammino butirrico (*γ -Amino Butyric Acid*, GABA), un aminoacido non proteico prodotto dalla deaminazione e decarbossilazione della glutamina (via glutamato), con funzioni di neurotrasmettitore, antipertensivo, diuretico e di prevenzione dell'ansia, del dolore e del diabete (Sarasa *et al.*, 2020). La fermentazione operata da un pool di lattobacilli isolati da lievito *naturale* insieme a ceppi selezionati di *L. plantarum* o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* su impasto di farina di grano tenero integrale (DY160) ha determinato la produzione di GABA (258,71 mg/Kg) in concentrazione notevolmente maggiore rispetto all'impasto acidificato chimicamente (55,24 mg/Kg). Lo stesso risultato è stato ottenuto per farina di grano raffinata e farina di segale, anche con DY 330 (Diana *et al.*, 2014; Rizzello, *et al.*, 2008).

2.6.3 Vitamine

Gli sfarinati, specie quelli integrali, contengono discrete quantità di vitamine, precisamente del gruppo B (tiamina, riboflavina, niacina, piridossina e folati), cofattori enzimatici essenziali per assicurare le funzioni fisiologiche dell'organismo, mentre sono poveri di vitamine liposolubili, sebbene contengano tracce di carotenoidi e tocoli, precursori delle vitamine A ed E, rispettivamente (Dewettinck *et al.*, 2008). La fermentazione con lievito *naturale* ha dimostrato la possibilità di aumentare la concentrazione di diverse vitamine, pur essendo questa legata alle condizioni di processo, in particolare alla cottura.

Due diversi studi hanno osservato un notevole incremento del contenuto di folati (vit. B₉), importante per la sintesi di acidi nucleici e globuli rossi, sia in impasti con farina di grano e segale fermentati con lievito *naturale* (Katina *et al.*, 2007a), sia nel pane, a seguito di cottura, seppur in modo meno marcato (25%) (Kariluoto *et al.*, 2004). Sebbene alcuni LAB (es. *Lact. lactis*, *L. plantarum* e *Leuconostoc* spp.) posseggano tale capacità biosintetica (Sybesma, *et al.*, 2003), sembra che i principali responsabili dell'aumento dei folati siano alcuni ceppi di lieviti, in particolare di *S. cerevisiae* (24,5–35,2 µg di folati/g di sostanza secca) (Hjortmo *et al.*, 2008; Kariluoto *et al.*, 2006).

In confronto alla panificazione diretta con lievito compresso, la fermentazione della farina di grano tenero (raffinata o integrale) con lievito *naturale* di tipo I da colture starter commerciali ha determinato l'incremento del contenuto di tiamina (vit. B₁), piridossina (vit. B₆) e riboflavina (B₂), nonostante la cottura abbia determinato un leggero decremento del contenuto di tali vitamine (Batifoulier *et al.*, 2005). Inoltre, in uno studio condotto da Capozzi *et al.* (2011) è stato dimostrato l'incremento della concentrazione di vitamina B₂ in un impasto di acqua e farina inoculato con *S. cerevisiae* e ceppi di *L. plantarum* isolati da lievito *naturale* e selezionati per la produzione della vitamina.

D'altra parte, la fermentazione con colture starter di lattobacilli ha mostrato un decremento della concentrazione di tocoferoli, tocotrienoli e vitamina E nell'impasto e nel pane di farina di segale e grano, probabilmente a causa della loro ossidazione (Liukkonen *et al.*, 2003; Wannemark & Jägerstad, 1992). Al contrario, il pane a lievitazione naturale prodotto con farina di farro inoculata con ceppi selezionati delle specie *L. plantarum*, *L. sanfranciscensis* e *L. brevis* e lievito di birra ha mostrato una stabilità della concentrazione di carotenoidi, luteina e zeaxantina, generalmente persi per ossidazione a seguito dell'impastamento e della cottura. Tali molecole, a seguito della digestione simulata *in vitro*, hanno dimostrato un effetto antinfiammatorio su cellule Caco-2 (Antognogni *et al.*, 2017).

Per quanto sopra, la fermentazione con lievito *naturale* è in grado di determinare l'incremento di composti bioattivi associati a proprietà benefiche per l'uomo, ponendosi come possibile alternativa agli alimenti fortificati con i suddetti nell'ambito di una dieta integrativa di molecole funzionali.

2.7 Abbassamento del contenuto di sale e controllo dell'ipertensione

Ad oggi, il pane e i PDF sono considerati tra gli alimenti più ricchi di sale (NaCl) assunti comunemente nella dieta (Quilez & Salas-Salvado, 2012); infatti, salvo rare eccezioni, come il Pane Toscano DOP o alcuni lievitati dolci, il sale viene sempre aggiunto per il miglioramento del sapore, del volume, della conservabilità e per il controllo della fermentazione (Pagani *et al.*, 2010). In Europa, il contenuto medio di sale nel pane varia tra 1,08 e 1,82 %, tale da rappresentare fino al 25% dell'apporto totale della dieta (Quilez & Salas-Salvado, 2012). Come riportato nella review di He & MacGregor (2009), numerosi studi hanno evidenziato che il consumo eccessivo di sale (ca. 10 g/giorno), in particolare del sodio in esso contenuto (ca. il 39%), è responsabile dell'aumento della pressione arteriosa, la quale è il principale fattore di rischio per lo sviluppo di *CVD*, causa di morte e disabilità in tutto il mondo. Inoltre, una dieta ricca di sale può direttamente aumentare il rischio di ictus e indirettamente favorire l'obesità (He & MacGregor, 2009). Pertanto, la riduzione del consumo di sale si pone tra gli obiettivi di tutte le principali organizzazioni mediche internazionali, per il miglioramento della salute pubblica. Accanto alla riduzione o alla sostituzione di NaCl con sale iposodico (contenente cloruro di potassio), all'aggiunta di esaltatori di sapidità o agenti amaricanti, la fermentazione con lievito *naturale* è tra le opzioni più promettenti per ridurre il contenuto di sale nei PDF lievitati, con l'obiettivo di mantenere caratteristiche sensoriali e tecnologiche adeguate (Silow *et al.*, 2016). Ciò è possibile in quanto la fermentazione con lievito *naturale* mostra un triplice ruolo: i) compensamento della riduzione di sale grazie alla produzione di numerosi composti aromatici e gustativi; ii) produzione di composti bioattivi con attività ipotensiva; iii) miglioramento della funzionalità del microbiota intestinale.

Nello specifico, la sapidità determinata dai composti prodotti durante la fermentazione e/o la cottura può compensare in parte la riduzione di sale aggiunto, mantenendo comunque l'accettabilità sensoriale da parte del consumatore. In tal senso, un ruolo importante è svolto dal glutamato, aminoacido esaltatore del gusto prodotto a partire dalla glutamina dai LAB che esprimono una glutaminasi specifica (Vermeulen *et al.*, 2007). Ad esempio, in uno studio condotto da Zhao *et al.* (2015) il pane prodotto con lievito *naturale* di malto di segale

da ceppi selezionati di *L. reuteri* ha mostrato una maggiore intensità di gusto acido e umami rispetto al pane con solo lievito di birra e pari quantità di sale. Inoltre, quando il sale è stato ridotto allo 0,5 % (sulla farina) non sono state evidenziate differenze significative del gusto salato, della consistenza e del volume del pane. In due studi successivi, gli stessi autori hanno confermato tali aspetti, evidenziando che anche alcuni tripeptidi e dipeptidi γ -glutamilici prodotti da alcuni ceppi di lattobacilli possono contribuire al gusto umami e all'esaltazione del sapore del pane (composti kokumi) (Zhao *et al.*, 2016; Zhao & Ganzle, 2016).

Inoltre, come discusso in precedenza, alcuni ceppi selezionati di LAB e lieviti sono in grado rilasciare nell'impasto quantità relativamente elevate di GABA (Lamberts *et al.*, 2012; Rizzello *et al.*, 2008). Come riportato da Ngo & Vo (2019), diversi studi hanno dimostrato che GABA ha un effetto anti-ipertensivo, principalmente perché presenta attività ACE inibitoria; tale effetto è stato confermato *in vivo*, mostrando una diminuzione della pressione sanguigna su adulti ipertesi (Ngo & Vo, 2019). Inoltre, un pool di lattobacilli selezionati possono produrre negli impasti di farine di cereali ulteriori peptidi con attività di inibitori ACE (Rizzello *et al.*, 2008), impedendo la formazione dell'angiotensina II, potente vasocostrittore (Heran *et al.*, 2008). Inoltre, gli stessi peptidi potenziano l'azione della bradichinina, neurotrasmettitore peptidico con effetto vasodilatatorio (Tom *et al.*, 2003). L'utilizzo del 21% di lievito *naturale* di farina integrale (prodotto con *L. brevis* e proteasi fungine) ha determinato l'aumento di GABA e dei peptidi con incremento dell'attività ACE inibitoria nel pane (Peñas *et al.*, 2015). Pertanto, i suddetti peptidi bioattivi sintetizzati durante la fermentazione con lievito *naturale* permettono, a parità di contenuto di sale, di limitare l'effetto ipertensivo dei PDF lievitati.

Infine, come riportato da Jose & Raj (2005), diversi studi hanno evidenziato che la pressione sanguigna è influenzata dal microbiota intestinale, principalmente per la produzione di SCFA ma anche per l'attività antiinfiammatoria e immunostimolante. L'effetto del pane a lievitazione naturale sul miglioramento della funzionalità del microbiota intestinale è stato dimostrato *in vitro*, mentre un'efficacia *in vivo* deve ancora essere confermata (Dimidi *et al.*, 2019). Tuttavia, il pane di frumento a lievitazione *naturale* è stato testato su campioni di feci aumentando significativamente i bifidobatteri e diminuendo δ -*Proteobacteria* e *Gemmatimonadetes* rispetto a un pane non fermentato (Costabile *et al.*, 2014). In ogni caso, il potenziale effetto prebiotico degli EPS prodotti dai lattobacilli del lievito *naturale* e della fibra può influenzare positivamente il microbiota e quindi la regolazione della pressione sanguigna.

Uno studio condotto da Becerra-Tomás *et al.* (2015) ha testato l'effetto della somministrazione, su pazienti ipertesi, di 120 g al giorno di pane con lievito *naturale* a basso contenuto di sodio e arricchito di GABA e ACE inibitori, per un periodo di 6 mesi: la pressione arteriosa (in particolare quella diastolica) ha mostrato una riduzione, seppur non significativa, rispetto al pane standard. Uno studio successivo ha verificato l'effetto di 6 mesi di somministrazione di Pane di Altamura a lievitazione naturale e a ridotto contenuto di sodio (280 mg Na/100 g), associato ad una dieta iposodica (2300 mg Na al giorno): rispetto ad una dieta normale con pane standard ma anche in confronto ad una dieta iposodica con pane standard, si è osservata la riduzione del sodio urinario e della pressione (sistolica e diastolica) (Cosola *et al.*, 2017).

In considerazione delle indicazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, che raccomanda un consumo di sale giornaliero inferiore ai 5 g (ca. 2 g di sodio), e delle difficoltà di ottenere prodotti con caratteristiche organolettiche e tecnologiche accettabili con altre strategie, la riduzione del contenuto di sale nei PDF lievitati mediante fermentazione con lievito *naturale* può contribuire alla prevenzione dei CDV, assumendo un importante ruolo funzionale.

Capitolo 3

PRODOTTI DA FORNO FUNZIONALI CON INGREDIENTI ALTERNATIVI E LIEVITO NATURALE

La crescente attenzione verso gli aspetti nutrizionali e funzionali dei PDF e le patologie associate al consumo di cereali hanno spinto la ricerca ad approfondire la possibilità dell'utilizzo di ingredienti alternativi agli sfarinati tradizionali, quali ad esempio i sottoprodotti della molitura, i legumi e gli pseudo-cereali.

I sottoprodotti della molitura sono la crusca e il germe di grano, che vengono parzialmente o totalmente allontanati dall'endosperma durante l'abburrattamento successivo alla macinazione durante il processo di produzione della farina raffinata; ad oggi, destinati prevalentemente all'alimentazione animale. Con il termine pseudo-cereali, invece, si indicano specie vegetali appartenenti a famiglie botaniche diverse i cui frutti e semi presentano caratteristiche e utilizzi assimilabili alle cariossidi dei cereali, ad esempio quinoa (*Chenopodiaceae*), grano saraceno (*Polygonaceae*) o amaranto (*Amaranthaceae*). I legumi, infine, sono i semi commestibili delle piante appartenenti alla famiglia delle *Fabaceae* (*Leguminose*), come cece (*Cicer arietinum* L.), soia (*Glycine max*), lenticchia (*Lens culinaris*), pisello (*Pisum sativum* L.), fagiolo (*Phaseolus vulgaris* L.) e fava (*Vicia faba* L.).

Pseudo-cereali, legumi, crusca e germe presentano caratteristiche nutrizionali tali da poter complementare lo sbilanciamento dei cereali, poveri di lipidi e di proteine ad elevato valore biologico, e/o da poter essere tollerati da individui allergici al grano o celiaci. Pertanto, una volta sottoposti a macinazione, possono essere impiegati per la produzione dei PDF lievitati. Tuttavia, tali ingredienti possono anche dar luogo ad inconvenienti di natura tecnologica, portando a PDF con caratteristiche sensoriali non comparabili ai corrispettivi realizzati con i cereali. Accanto all'utilizzo di additivi, enzimi o processi tecnologici, la fermentazione con lievito *naturale* può essere sfruttata per migliorare, da un lato le caratteristiche tecnologiche, dall'altro il valore nutrizionale e funzionale di crusca, germe, farine di pseudo-cereali e legumi, nonché il profilo sensoriale dei PDF da essi derivati (Naqash *et al.*, 2017; Coda *et al.*, 2015a).

3.1 Sottoprodotti della molitura

3.1.1 Crusca

La crusca è la frazione dei tegumenti esterni, pericarpo e strato aleuronico, che rappresenta l'11-15% della cariosside. È costituita da fibre, prevalentemente insolubili, sali minerali e BC, in particolare vitamine del gruppo B. Per tanto, i PDF a lievitazione *naturale* con farina integrale si inseriscono perfettamente all'interno di un regime alimentare completo ed equilibrato. Tuttavia, a causa delle minori proprietà sensoriali rispetto ai PDF con farina raffinata, il loro consumo tra la popolazione resta piuttosto basso (Lang & Jebb, 2003). Inoltre, almeno nella panificazione con lievito di birra, la crusca ostacola la formazione della maglia glutinica, riducendo l'elasticità dell'impasto e il volume del pane, oltre ad apportare anti-nutrienti e, potenzialmente, contaminanti (Carrai, 2010). Per questi motivi, è stato studiato il pre-trattamento della crusca con lievito *naturale* con l'obiettivo di migliorare le caratteristiche tecnologiche degli impasti e le proprietà sensoriali e nutrizionali dei PDF lievitati, aumentandone l'accettabilità e il consumo da parte della popolazione.

In particolare, uno studio condotto da Hassan e collaboratori (2008) ha dimostrato che la fermentazione della crusca di frumento con lievito di birra per 4 ore a 30 °C riduce la concentrazione di acido fitico e tannini condensati, aumentando il contenuto di calcio e ferro. Contestualmente, la fermentazione con lievito di birra a 35 °C per 20 ore ha permesso lo sviluppo dei LAB autoctoni, determinando anche un incremento dei livelli di folati, fenoli totali, acido ferulico e fibra solubile, e una diminuzione del contenuto di alchilresorcinioli (Katina *et al.*, 2007b). Dal punto di vista sensoriale, Salmenkallio-Marttila *et al.* (2001) hanno verificato che l'associazione del lievito di birra con una coltura pura di *L. brevis* nella fermentazione di crusca di frumento permette di ottenere, una volta aggiunta ad acqua, farina, sale, zucchero, burro e lievito, un pane con maggior sapore, struttura della mollica e conservabilità, rispetto a quello aggiunto di crusca tal quale. Contestualmente, uno studio condotto da Lioger *et al.* (2007) ha dimostrato che la fermentazione a 25 °C per 8 ore di un impasto semi-liquido di crusca di frumento operata da lievito *naturale* di tipo I diminuisce del 90% il contenuto di fitati e incrementa la concentrazione di calcio e magnesio. Risultati simili sono stati ottenuti da Lopez e collaboratori (2001), fermentando la crusca di frumento tenero per 4 ore a 30 °C con ceppi selezionati di *L. plantarum* e *Leuc. mesenteroides*, isolati da impasto acido di segale. In particolare, dallo studio è emerso che, sia rispetto alla crusca che alla farina integrale fermentate con lievito di birra, la crusca fermentata con lievito *naturale* mostra una riduzione del contenuto dei fitati pari al 90% ed un aumento della solubilità di magnesio e fosforo. Infine, uno studio condotto da Coda *et al.* (2014) ha

osservato che la fermentazione della frazione fine della crusca con una coltura starter di *L. brevis* e *S. exiguus* determina l'incremento dell'attività antiossidante, dell'attività fitasica, del contenuto di peptidi e aminoacidi liberi e della digeribilità delle proteine *in vitro*, sia in presenza che in assenza di enzimi (xilanasi, endoglucanasi, β -glucanasi e α -amilasi), rispetto alla crusca non fermentata (Figura 3.1).

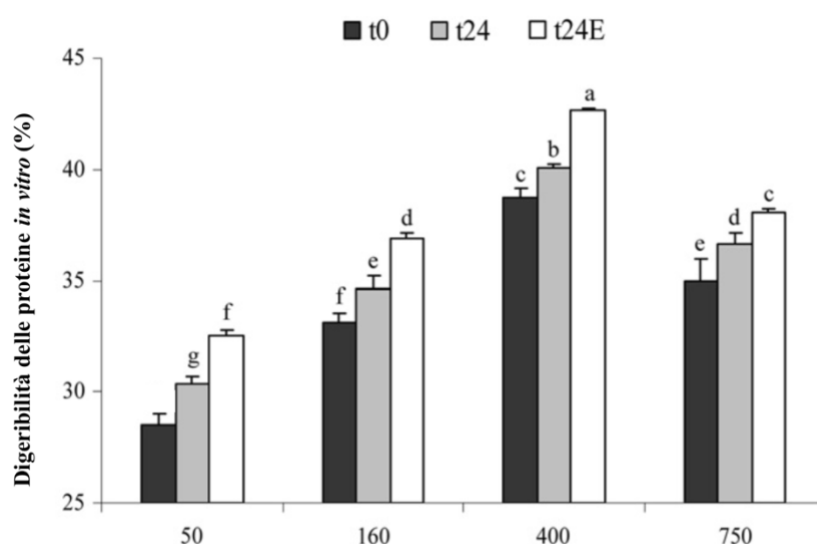


Figura 3.1: Digeribilità proteica *in vitro* delle diverse frazioni di crusca (50-750 μm), non fermentata (t0) e fermentata (senza enzimi (t24) o con enzimi (t24E))
(adattata da Coda *et al.*, 2014)

Uno studio *in vivo* condotto da Hanhineva *et al.* (2014) su plasma di soggetti sani alimentati con pane bianco arricchito con crusca di segale pre-fermentata, ha mostrato un incremento dei livelli di N-2-idrossifenil-acetamide e idrossi-n-(2-idrossifenil)-acetamide, metaboliti dei benzoxazinoidi a cui sono associati numerosi effetti benefici, rispetto ai valori riscontrati in soggetti alimentati con pane senza crusca, anche quando prodotto con *lievito naturale*. In un altro studio condotto nel 2013, l'analisi delle urine di soggetti sani alimentati con pane bianco prodotto con crusca pre-fermentata con enzimi cellulolitici e lievito di birra ha permesso di evidenziare un maggior tenore di acido ferulico libero rispetto a quello identificato in urine di soggetti sani alimentati con pane aggiunto di crusca nativa o pane di segale integrale, indicando in tal modo un maggiore assorbimento a livello dell'intestino tenue (Lappi *et al.*, 2013). Similmente, Anson e collaboratori (2010) hanno osservato che la somministrazione di 300g di pane integrale contenente crusca pre-fermentata ha determinato l'incremento della biodisponibilità di acidi fenolici e la capacità antiossidante equivalente nel plasma, rispetto al consumo di pane arricchito con crusca nativa (Anson *et al.*, 2010).

Nonostante l'aggiunta (5-20%) di crusca nativa determini l'incremento delle proprietà nutrizionali del pane a lievitazione *naturale* (Zalan *et al.*, 2015; Rizzello *et al.*, 2012), il valore aggiunto dell'utilizzo della crusca pre-fermentata è legato alla possibilità di raggiungere elevata idratazione e lunghi tempi di fermentazione, condizioni che favoriscono le reazioni chimico-enzimatiche alla base dei benefici funzionali e che non sono compatibili con i processi produttivi industriali. Inoltre, i bassi valori di pH e la competizione con il microbiota del lievito naturale possono limitare lo sviluppo di microrganismi patogeni o alterativi eventualmente associati alla crusca (Katina *et al.*, 2007b). Pertanto, la crusca pre-fermentata da lievito *naturale* permette di ottenere un prodotto che, in linea con la legislazione Europea in materia di indicazioni nutrizionali e salutistiche, può essere definito "ad alto contenuto di fibre" (Reg. (CE) n. 1924/2006) ma con caratteristiche sensoriali valutate positivamente dal consumatore.

3.1.2 Germe

Il germe è la parte basale interna della cariosside, di cui ne rappresenta ca. il 3%, ed è costituito da proteine ad alto valore biologico, vitamine, in particolare vitamine del gruppo B e vitamina E, zuccheri solubili, sali minerali, fitochimici e lipidi, tra cui acidi grassi insaturi, principalmente acidi oleico, linoleico e α -linoleico (D'Egidio, 2004). Nonostante l'elevato valore nutrizionale, il germe viene eliminato durante la molitura, perché i trigliceridi e le vitamine liposolubili in esso contenuti sono soggetti all'azione di lipasi e lipossigenasi endogene, determinando in tal modo la formazione di composti dall'odore e sapore sgradevole (irrancidimento) e alla diminuzione del valore nutrizionale. Inoltre, il germe contiene raffinose, agglutinine e acido fitico, anti-nutrienti. (Rizzello *et al.*, 2010a; Lafiandra & D'Egidio, 2010). Negli ultimi decenni, è stato studiato il ruolo della pre-fermentazione del germe con lievito *naturale* per risolvere le problematiche di conservazione, eliminazione degli anti-nutrienti e per permettere il miglior sfruttamento delle sue qualità nutrizionali.

Dal punto di vista tecnologico, Rizzello e collaboratori (2010a) hanno osservato che la fermentazione del germe di grano tenero per 24 ore a 30 °C con ceppi selezionati di *L. plantarum* e *Lactobacillus rossiae*, isolati dalla stessa materia prima, ha determinato l'inattivazione delle lipasi e la riduzione dei composti volatili derivati dall'ossidazione dopo 40 giorni di conservazione a temperatura ambiente, rispetto al germe nativo non fermentato. Dal punto di vista nutrizionale, invece, lo stesso studio ha dimostrato che la fermentazione del germe determina un aumento della concentrazione degli aminoacidi liberi, tra cui lisina e

GABA, e della digeribilità delle proteine *in vitro*. Inoltre, è stato osservato un aumento dell'attività antiossidante e della disponibilità di minerali, mentre è diminuito il tenore di raffinoso (Rizzello *et al.*, 2010a). Successivamente, lo stesso gruppo di ricerca ha impiegato il germe di grano tenero pre-fermentato per la produzione di pane con farina di grano tenero (DY 160) e lievito di birra, riscontrando i medesimi miglioramenti delle caratteristiche nutrizionali-funzionali, oltre ad un maggiore volume, un aroma più acido e un gusto più salato rispetto al pane con germe non fermentato o senza germe (Rizzello *et al.*, 2010b). In uno studio successivo, Rizzello e collaboratori (2013) hanno applicato il medesimo protocollo di fermentazione del germe e osservato la liberazione di 2-metossi benzochinone e 2,6-dimetossibenzochinone, chinoni con proprietà anti-tumorali, normalmente presenti nel germe in forma glicosilata e quindi non fisiologicamente attiva. Inoltre, testando il germe di grano fermentato *ex vivo* su cellule del carcinoma ovarico e del colon-retto, è stata confermata un'elevata attività anti-proliferativa, che risulta totalmente assente nel germe nativo (Rizzello *et al.*, 2013).

Per quanto sopra, e considerando che l'attività metabolica dei lattobacilli determina anche la diminuzione del contenuto di agglutinine (Tovar, 2020), il germe di grano fermentato può essere definito un ingrediente funzionale utile ad esaltare le proprietà nutrizionali, sensoriali e tecnologiche dei PDF lievitati in cui è impiegato.

3.2 Legumi

I legumi sono alimenti costituiti principalmente da proteine che presentano anche carboidrati e fibre alimentari nonché livelli rilevanti di grassi insaturi, vitamine del gruppo B, minerali, in particolare calcio e ferro, e composti fenolici. Il loro consumo è associato alla riduzione del rischio di sviluppo di varie malattie croniche, come diabete e CVD (Titta, 2016). Pertanto, nonostante essi contengano anche lectine, ATI e ACE, o carboidrati non digeribili (FODMAP), le Linee guida per una sana alimentazione italiana ne raccomandano il consumo di almeno 3 porzioni (150g freschi, 50g secchi) a settimana, inserendoli tra gli alimenti cardini della Dieta Mediterranea, insieme ai cereali integrali. Infatti, l'associazione legumi-cereali permette di complementare la composizione amminoacidica del pasto, essendo le proteine del grano povere di lisina e treonina, di cui i legumi sono ricchi, ma ricche di metionina e cisteina, di cui i legumi sono carenti (CREA, 2018). Ciononostante, il consumo di legumi in Italia negli ultimi decenni si è ridotto di ca. il 50%, scendendo al di sotto delle raccomandazioni nutrizionali (Giampaoli *et al.*, 2015), in linea con l'andamento mondiale (McCrory *et al.*, 2010). Pertanto, l'utilizzo di farina di legumi per la produzione di

PDF lievitati può essere un'alternativa al consumo diretto aumentando l'apporto dietetico nella popolazione; in tale contesto, la fermentazione con lievito *naturale* delle farine di legumi può apportare ulteriori vantaggi, dal punto di vista nutrizionale, tecnologico e sensoriale.

In particolare, uno studio condotto da Curiel *et al.* (2015) utilizzando ceppi selezionati di *L. plantarum* e *L. brevis* come starter per la fermentazione di farine di ceci, piselli, lenticchie e fagioli, a 30°C per 24 ore, ha permesso di osservare un aumento delle concentrazioni di amminoacidi liberi, incluso GABA, fibre solubili e fenoli totali nei lieviti *naturali* prodotti con ciascuna tipologia di sfarinato, rispetto agli sfarinati non fermentati. Contestualmente, negli sfarinati fermentati è stata osservata una riduzione del 64% di mannosio, una riduzione di tannini condensati ed un incremento dell'attività fitasica (Curiel *et al.*, 2015). Sempre riguardo gli anti-nutrienti, Granito e collaboratori (2002) hanno dimostrato una riduzione del contenuto di GOS e ATI fermentando spontaneamente la farina di fagioli. Riguardo la produzione di pane, l'impiego di lievito *naturale* di tipo I, prodotto con una miscela di sfarinati di legumi (ceci, lenticchie e fagioli) e farina di frumento, ha permesso di evidenziare un incremento del contenuto di aminoacidi liberi, dell'attività antiossidante e fitasica e della digeribilità delle proteine *in vitro*, e una diminuzione dell'indice di idrolisi dell'amido, rispetto al pane prodotto con lievito di birra o con lievito *naturale* di solo frumento. Inoltre, il pane prodotto con lievito *naturale* di grano e legumi è stato valutato positivamente da un panel di assaggiatori (Rizzello *et al.*, 2014b). Il miglioramento delle caratteristiche nutrizionali a seguito della fermentazione con lievito *naturale* è stato osservato anche per le farine di fagioli dell'occhio (*Vigna sinensis* L) (Duenas *et al.*, 2005), fagioli azuki (*Vigna angularis* L) (Liao *et al.*, 2013), fagioli rossi (Limon *et al.*, 2015) e lenticchie (Torino *et al.*, 2013), come riportato in Tabella 3.1. Infine, in uno studio condotto da Rizzello *et al.* (2015) è stato osservato che la fermentazione a lievitazione *naturale* con ceppi selezionati di *L. plantarum* e *L. brevis* ha determinato la liberazione di BP simili alla lunasina in diciannove legumi tradizionali italiani. I BP sono stati valutati *ex vivo* su cellule Caco-2 del carcinoma umano, mostrando una marcata attività anti-proliferativa.

Tabella 3.1: Effetti della fermentazione con lievito naturale su diverse farine di legumi

Legumi	Tipo di fermentazione	Effetti	Riferimento
Fagioli dell'occhio	Fermentazione spontanea o con ceppi selezionati di <i>L. plantarum</i>	Miglioramento attività antiossidante	Duenas <i>et al.</i> , 2005

<i>Fagioli azuki</i>	Ceppi selezionati di <i>L. rhamnosus</i> e <i>Lact. lactis</i>	Incremento di GABA	Liao <i>et al.</i> , 2013
<i>Fagioli rossi</i>	Fermentazione spontanea	Incremento GABA e attività ACE-inibitoria	Limon <i>et al.</i> , 2015
<i>Lenticchie</i>	Ceppo selezionati di <i>L. plantarum</i>	Incremento GABA, ACE-inibitori e attività antiossidante	Torino <i>et al.</i> , 2013

Una menzione a parte merita la fava (*Vicia faba* L.), contenente due glicosidi pirimidinici, vicina e convicina, i cui metaboliti sono correlati all'insorgenza dei sintomi del favismo, una patologia caratterizzata da crisi emolitica conseguente al consumo di fave. Due diversi studi hanno evidenziato che la fermentazione di farina di fave con lattobacilli selezionati determina la riduzione del contenuto di vicine e convicine di oltre il 91%, grazie all'attività β -glucosidasi dei LAB. Parallelamente, è stato osservato un decremento di ATI e tannini condensati, una riduzione dell'indice di idrolisi dell'amido e un aumento della digeribilità delle proteine *in vitro* (Coda *et al.*, 2017; Coda *et al.*, 2015b). L'assenza di tossicità della fava fermentata, è stata confermata da saggi *ex vivo* su sangue umano (Rizzello *et al.*, 2016b).

Tutte le suddette proprietà nutrizionali e funzionali, inoltre, potrebbero essere ulteriormente incrementate combinando la fermentazione con lievito *naturale* alla pregerminazione dei legumi, la quale determina l'attivazione dei processi chimici-enzimatici liberando composti a basso peso molecolare tra i quali numerosi BC (Montemurro *et al.*, 2019).

Per quanto sopra, le farine di legumi sottoposte a fermentazione con lievito *naturale* possono essere utilizzate in miscela con i cereali per fortificare i prodotti tradizionali, o da sole per realizzare prodotti senza glutine (Melini *et al.*, 2017), migliorando le caratteristiche nutrizionali e funzionali dei PDF lievitati.

3.3 Pseudo-cereali

Negli ultimi decenni, l'utilizzo di pseudo-cereali per la produzione dei PDF lievitati è cresciuto notevolmente, sia in ambito domestico che industriale, soprattutto a causa delle loro caratteristiche nutrizionali e funzionali. Infatti, rispetto ai cereali, contengono proteine ad alto valore biologico e un maggior contenuto di lipidi, oltre ad elevate quantità di vitamine e minerali. Tuttavia, gli pseudo-cereali possono contenere composti anti-nutrienti e mostrare caratteri sensoriali inferiori, a causa della mancanza delle proteine del glutine (Muir

et al., 2019). Come riportato di seguito, studi recenti hanno dimostrato che la fermentazione delle farine di pseudo-cereali con lattobacilli isolati da lievito *naturale* può migliorare le caratteristiche tecnologiche, sensoriali e nutrizionali dei PDF lievitati derivati.

La farina di quinoa, ad esempio, contiene ca. il 16% (sostanza secca, ss) di fibra, proteine ricche di lisina, treonina e metionina, grassi insaturi, vitamina E ed acidi fenolici. Tuttavia, contiene anche saponine, che possono limitare l'assorbimento intestinale di alcuni nutrienti oltre a generare un sapore amaro (Mir *et al.*, 2018; Stikic *et al.*, 2012). In uno studio condotto da Rizzello *et al.* (2016c) su lievito *naturale* di tipo I (DY 160) prodotto con farina di quinoa e ceppi selezionati di lattobacilli è stato riscontrato un aumento del tenore di amminoacidi liberi, fibre solubili e fenoli totali, rispetto alla farina di quinoa non fermentata, insieme ad un aumento dell'attività fitasica e di quella antiossidante e ad una riduzione della concentrazione di tannini condensati (Tabella 3.2).

Tabella 3.2: Confronto proprietà nutrizionali della farina di quinoa fermentata (QF) o non (QNF) con LAB
(adattata da Rizzello *et al.*, 2016c)

	QNF	QF
Aminoacidi liberi (mg/kg)	5403 ± 75	22650 ± 239
Fenoli totali (mmol/kg)	8,17 ± 0.23	16.19 ± 1.12
Attività antiossidante	41,7 ± 2.3	71.8 ± 2.8
Attività fitasica (U)	1,73 ± 0.72	4.76 + 0.55
Tannini condensati (mg/kg)	457 ± 11	85 ± 23
Digeribilità delle proteine in vitro (%)	53.36 ± 2.23	78.17 ± 3.01

In particolare, tali caratteristiche nutrizionali-funzionali sono state riscontrate anche nel pane, il quale ha mostrato un tasso di idrolisi dell'amido e una digeribilità delle proteine *in vitro* maggiori, rispetto a quello prodotto senza lievito *naturale*, con o senza farina di quinoa. Infine, il volume specifico non ha evidenziato differenze rispetto al controllo, mentre il maggior gusto acidulo e salato sono stati valutati positivamente da un panel di assaggiatori (Rizzello *et al.*, 2016c). In uno studio successivo condotto dagli stessi autori, i BP rilasciati a seguito della fermentazione di farina di quinoa con ceppi selezionati di lattobacilli hanno mostrato un'attività antiossidante significativamente superiore a quella della farina non fermentata. A seguito di digestione enzimatica *in vitro*, l'attività antiossidante è stata verificata *ex vivo* su cellule epiteliali umane sottoposte artificialmente a stress ossidativo (Rizzello *et al.*, 2017).

Similmente a quella di quinoa, anche la farina di amaranto risulta ricca in proteine ad alto valore biologico, con lisina e metionina, fibre e lipidi (6% ss), insieme a discrete quantità di calcio, magnesio, riboflavina, acido folico e vitamina E (Mir *et al.*, 2018). In relazione al suo contenuto di BC, il consumo di amaranto è stato associato alla diminuzione dei livelli di colesterolo e glicemia, alla riduzione dell'ipertensione e alla stimolazione del sistema immunitario (Caselato & Amaya-Farfan, 2012). Il lievito *naturale* di tipo I maturo prodotto con farina di amaranto, dopo 10 giorni di rinfreschi secondo il metodo tradizionale, ha mostrato caratteristiche chimiche simili ai lieviti *naturali* con farine di cereali, con valori pH compresi tra 3,9 e 4,0 e valori di TTA compresi tra 25,5 e 33,1 (Jekle *et al.*, 2010; Sterr *et al.*, 2009). Uno studio condotto da Houben *et al.*, (2010) ha dimostrato che l'abbassamento di pH dovuto al lievito *naturale* di amaranto permette di ottenere una viscosità ed un'elasticità dell'impasto in cui è aggiunto simili a quelle degli impasti di farine di grano, aspetto questo importante per la produzione di PDF senza glutine. Infatti, Różyło e collaboratori (2014) hanno dimostrato che le caratteristiche sensoriali di un pane prodotto con farina di mais e riso con aggiunta del 10% di lievito *naturale* di amaranto, fresco o liofilizzato, sono state valutate positivamente da un panel di assaggiatori. Relativamente alle proprietà funzionali dei lattobacilli del lievito *naturale*, Amare e collaboratori (2015) hanno dimostrato che la fermentazione operata dalla microflora autoctona dell'amaranto determina l'aumento degli aminoacidi liberi e della digeribilità delle proteine in vitro. Inoltre, uno studio condotto da Coda *et al.* (2010) ha dimostrato che la fermentazione a 30 °C per 24 ore di un impasto (DY 160) di farina di amaranto con ceppi di *L. plantarum* e *Lact. lactis* ha aumentato del 76% gli aminoacidi liberi totali, determinando il rilascio di concentrazioni elevate di GABA (ca. 816 mg/kg), nettamente superiori rispetto a quanto osservato negli impasti acidificati chimicamente. Infine, Rizzello e collaboratori (2011a) hanno osservato il raddoppio della concentrazione del peptide lunasina nell'impasto di farina di amaranto (DY 160) fermentato con ceppi di lattobacilli per 16 ore a 30 °C, rispetto all'impasto aggiunto di acido lattico e acido acetico.

In linea con gli altri pseudo-cereali, la farina di grano saraceno, il cui consumo è stato associato ad effetti ipocolesteromizzanti e prebiotici, contiene percentuali elevate di proteine, fibre, lipidi, vitamina B₂ e B₆, e minerali, rutina e quercetina, composti fitochimici con proprietà antiossidanti e antiinfiammatorie (Mir *et al.*, 2018; Alvarez-Jubete *et al.*, 2010; Prestamo *et al.*, 2003). Dal punto di vista tecnologico, Moroni *et al.* (2012) hanno dimostrato che l'aggiunta di lievito *naturale* di grano saraceno (10%) in un impasto di grano tenero e lievito di birra rafforza il reticolo glutinico e riduce l'elasticità dell'impasto, producendo un

pane con volume specifico elevato, una mollica più morbida e una maggiore *shelf life* rispetto al pane prodotto senza lievito *naturale*. Per quanto riguarda gli aspetti nutrizionali, invece, lo stesso studio ha dimostrato che la fermentazione della farina di grano saraceno con lievito *naturale* aumenta il livello di fenoli solubili e di fibre alimentari, diminuendo contestualmente il contenuto di acido fitico e tannini e migliorando l'attività antiossidante, rispetto allo sfarinato non fermentato (Moroni *et al.*, 2012). Inoltre, analogamente a quanto osservato per quinoa e amaranto, Coda e collaboratori (2010) hanno dimostrato che la fermentazione della farina di grano saraceno con ceppi selezionati di lattobacilli determina l'aumento del rilascio di aminoacidi liberi e GABA rispetto all'impasto chimicamente acidificato. Infine, uno studio condotto da Zielinski *et al.* (2017) su muffin prodotti con farina di grano saraceno fermentata con una coltura pura di *L. plantarum* ha evidenziato un più alto contenuto di potassio, magnesio, zinco e manganese rispetto al contenuto riscontrato in muffin prodotti con farina non fermentata. Per quanto riguarda gli effetti *in vivo*, la farina di grano saraceno fermentata con ceppi selezionati di lattobacilli ha mostrato proprietà anti-ipertensive in ratti ipertesi, diminuendo la pressione sanguigna grazie all'attività ACE inibitoria e ai BC vasorilassatori (Nakamura *et al.*, 2013).

Come i legumi, anche gli pseudo-cereali possono completare il profilo nutrizionale dei cereali ed essere utilizzati in miscela con questi ultimi per ottenere PDF lievitati funzionali. In alternativa, l'utilizzo in associazione con altri sfarinati senza glutine permette di complementare l'assenza di aminoacidi essenziali, vitamine, minerali e fibre che possono verificarsi nei prodotti *gluten free* convenzionali. Ad esempio, la fermentazione del lievito *naturale* prodotto con una miscela di farine di grano saraceno, amaranto, ceci e quinoa (rapporto 1:1:5,3:1) e ceppi selezionati di *L. plantarum* e *Lact. Lactis* ha mostrato una concentrazione maggiore di aminoacidi liberi e GABA rispetto alla stessa miscela fermentata con lievito di birra. Inoltre, quando il lievito *naturale* è stato utilizzato per la produzione di pane, insieme a grano tenero e lievito di birra, il tenore di GABA si è mantenuto elevato, superando la dose giornaliera necessaria per mostrare l'effetto fisiologico (504 ± 8 mg/kg), mentre l'attività antiossidante e il GI previsto sono risultati migliori rispetto a quelli registrati nel pane senza lievito *naturale*. Infine, ad eccezione della dolcezza, il pane con lievito *naturale* di farina di legumi e pseudo-cereali ha ottenuto punteggi migliori in tutti i parametri sensoriali (Coda *et al.*, 2010). Tale studio, quindi, ha confermato le possibilità tecnologiche, nutrizionali e sensoriali del lievito *naturale* preparato con farine di legumi e pseudo-cereali.

CONCLUSIONI

La letteratura scientifica raccoglie numerosi studi sulle diverse proprietà funzionali dei prodotti da forno a lievitazione *naturale*. Alcune, come il controllo della risposta glicemica e l'assenza di risposta immunitaria in soggetti sensibili, sono state dimostrate, sia *in vitro* che *in vivo*. Altre, come l'aumento della frazione di fibre solubili, la produzione di composti bioattivi e l'incremento della biodisponibilità di minerali, sono correlate positivamente al miglioramento dello stato di salute. Mentre, alcune, come il controllo dell'ipertensione o dei sintomi associati alla sindrome dell'intestino irritabile, necessitano di ulteriori studi di conferma. L'utilizzo del lievito *naturale* in ingredienti non convenzionali, come crusca, germe, legumi e pseudo-cereali, ha dimostrato essere un'opzione valida per migliorare le caratteristiche nutrizionali nonché la lavorabilità e l'appetibilità dei lievitati tradizionali e dei prodotti senza glutine. Nel complesso, tali prodotti potrebbero far fronte al sempre più frequente sbilanciamento dei regimi alimentari e alle conseguenti carenze di elementi nutritivi importanti, soddisfacendo le raccomandazioni dietetiche ufficiali riassunte nella Piramide Alimentare della Dieta Mediterranea (Giampaoli *et al.*, 2015) (CREA, 2018).

Tuttavia, occorre sottolineare anche alcuni limiti; infatti, sebbene la maggior parte dei meccanismi alla base degli effetti nutrizionali-funzionali sopra descritti sono correlati all'abbassamento di pH durante la fermentazione *naturale*, altri meccanismi dipendono da metaboliti secondari prodotti da lieviti e batteri lattici in maniera dipendente dalle condizioni della matrice e dal tipo di microrganismo. In particolare, molti dei benefici dimostrati sono associati a ceppi selezionati di LAB e non agli impasti acidi tradizionali, oggi ancora molto utilizzati, specie nei panifici artigianali. Diversamente, è necessario ricordare che gli impasti acidi di tipo I possono essere soggetti a notevole variabilità. Un'altra possibile criticità è rappresentata dalle condizioni adottate in ambito sperimentale, in particolare tempi, temperature o idratazioni degli impasti, le quali non sono sempre applicabili direttamente ad una produzione su larga scala. Inoltre, diversi studi sono incentrati sugli impasti lievitati e hanno verificato le caratteristiche funzionali solamente *in vitro*, e non su prodotti cotti o a seguito di osservazioni *in vivo*. Infine, sono disponibili ancora poche informazioni riguardanti le proprietà nutrizionali e funzionali dei PDF a lievitazione naturale

diversi dal pane, siano essi dolci o salati, nei quali l'impasto acido è impiegato insieme ad altri ingredienti, principalmente grassi e zuccheri, oltre ad acqua, farina e sale.

Per tanto, la ricerca scientifica ha di fronte a sé compiti importanti: i) la selezione di lattobacilli le cui attività metaboliche massimizzino le proprietà nutrizionali e funzionali dei PDF, ii) la messa appunto di colture starter o impasti acidi di tipo III facilmente impiegabili e che garantiscano il miglioramento delle proprietà di interesse nelle condizioni operative, iii) l'approfondimento dell'efficacia funzionale mediante studi di lunga durata e su larga scala. Ciò concretizzerebbe ancora di più la possibilità di produrre PDF a lievitazione *naturale* specifici, in funzione delle necessità di vari gruppi di soggetti e delle caratteristiche funzionali-nutrizionali richieste.

In conclusione, la fermentazione con lievito *naturale* può rappresentare una biotecnologia efficace per rispondere ad un gruppo sempre più ampio di consumatori alla ricerca di lieviti funzionali *clean label*, ovvero con etichetta breve, chiara e senza additivi, rallentando la decrescita dei consumi dei PDF e contribuendo al miglioramento dello stato di salute della popolazione nell'ambito di una dieta varia ed equilibrata.

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1.1 Microflora caratteristica delle differenti tipologie di lievito naturale	22
Tabella 2.1: Composti bioattivi liberati durante la fermentazione con lievito naturale	44
Tabella 3.1: Effetti della fermentazione con lievito naturale su diverse farine di legumi.	56
Tabella 3.2: Confronto proprietà nutrizionali della farina di quinoa fermentata (QF) o non (QNF) con LAB (adattata da Rizzello <i>et al.</i> , 2016c).....	58

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1.1: Differenti gestioni del lievito madre: liquido (1), solido in acqua (2a e 2b), solido legato (3a e 3b), solido libero (4).....	13
Figura 2.1: Risposta glicemica del pane con lievito di birra (diamante) e del pane con lievito naturale (cerchio) (adattata da De Angelis <i>et al.</i> , 2009).....	32
Figura 2.3: Riduzione di acido fitico in impasto in presenza (cerchio nero) o in assenza (quadrato bianco) di LAB (adattata da Lopez <i>et al.</i> , 2000).....	39
Figura 3.1: Digeribilità proteica in vitro delle diverse frazioni di crusca (50-750 μm), non fermentata (t0) e fermentata (senza enzimi (t24) o con enzimi (t24E)).....	53

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

PDF	prodotti da forno
MC	malattia celiaca
DY	Dough Yield
TTA	acidità di titolazione
LAB	Lactic Acid Bacteria
QF	quoziente fermentativo
EPS	esopolisaccaridi
GI	Glycemic Index
GL	Glycemic Load
II	Insulin Index
GOS	Galacto-oligosaccharides
FOS	Fructo-oligosaccharides
RS	Resistant Starch
CVD	Cardiovascular Disease
SCFA	Short Chain Fatty Acids
AX	Arabinoxylan
EPS	Exopolysaccharides
HEPS	Heteropolysaccharide
HOPS	Homopolysaccharides
IBS	Irritable Bowel Syndrome
NCGS	Non-Celiac Gluten Sensitivity
NCWS	Non-Celiac Wheat Sensitivity

FODMAP	Fermentable Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides and Polyols
ATI	Amylase Trypsin Inhibitors
WA	Wheat Allergy
CD	Celiac Disease
BC	Bioactive Compound
BP	Bioactive Peptides
ACE	Angiotensin-converting enzyme
GABA	γ -Amino Butyric Acid
SS	sostanza secca

BIBLIOGRAFIA

Östman, E. M., Nilsson, M. G., Molin, G., Björck, I. M. E. & Liljeberg-Elmståhl, H. G. M., 2002. On the Effect of Lactic Acid on Blood Glucose and Insulin Responses to Cereal Products: Mechanistic Studies in Healthy Subjects and In Vitro. *Journal of Cereal Science*, 36(3), pp. 339-346 .

Abedfar, A., Hosseininezhad, M., Sadeghi, A., Raeisi, M. & Feizy, J., 2018. Investigation on “spontaneous fermentation” and the productivity of microbial exopolysaccharides by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from wheat bran sourdough. *LWT - Food Science and Technology*, Volume 96, pp. 686-693.

Adebo, O. A., Berka-Njiobeh, P. & Kayitesi, E., 2018. Fermentation by *Lactobacillus fermentum* strains (singly and in combination) enhances the properties of ting from two whole grain sorghum type. *Journal of Cereal Science*, Volume 82, pp. 49-56.

Adebo, O. A. & Medina-Meza, I. G., 2020. Impact of Fermentation on the Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Whole Cereal Grains: A Mini Review. *Molecules*, 25(4), p. 927.

Adhikari, K. B., Tanwir, F., Gregersen, P. L., Steffensen, S. K., Jensen, B. M., Poulsen, L. K., Nielsen, C. H., Høyer, S., Borre, M. & Fomsgaard, I. S., 2015. Benzoxazinoids: Cereal phytochemicals with putative therapeutic and health-protecting properties. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(7), pp. 1324-1338.

Albiac, M. A., Di Cagno, R., Filannino, P., Cantatore, V. & Gobetti, M., 2020. How fructophilic lactic acid bacteria may reduce the FODMAPs content in wheat-derived baked goods: a proof of concept. *Microbial Cell Factories*, Volume 19:182.

Altobelli, E., Del Negro, V., Angeletti, P. M. & Latella, G., 2017. Low-FODMAP Diet Improves Irritable Bowel Syndrome Symptoms: A Meta-Analysis. *Nutrients*, 9(9), p. 940.

Alvarez-Jubete, L., Wijngaard, H., Arendt, E. K. & Gallagher, E., 2010. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*, 119(2), pp. 770-778.

Amare, E., Mouqut-Rivier, C., Servent, A., Morel, G., Adish, A., Haki, G. D., 2015. Protein Quality of Amaranth Grains Cultivated in Ethiopia as Affected by Popping and Fermentation. *Food and Nutrition Sciences*, Volume 6, pp. 38-48.

Anderson, J. W., Baird, P., Davis, R. H., Ferreri, St., Knudtson, M., Koraym, A., Waters, V., & Williams, C. L., 2009. Health benefits of dietary fiber. *Nutrition reviews*, 67(4), pp. 188-205.

Anson, N. M. et al., 2010. Bioprocessing of Wheat Bran in Whole Wheat Bread Increases the Bioavailability of Phenolic Acids in Men and Exerts Antiinflammatory Effects ex Vivo. *The Journal of Nutrition Nutritional Immunology*, 141(1), pp. 137-143.

Antognoni, F., Mandrioli, R., Bordoni, Al., Di Nunzio, M., Viadel, B., Gallego, E., Villalba, M. P., Tomas-Cobos, L., Teneyo-Saa, D. L. & Gianotti, A., 2017. Integrated Evaluation of the Potential Health Benefits of Einkorn-Based Breads. *Nutrients*, 9(11):1232.

Arendt, E. K., Ryan, L. A. M. & Del Bello, F., 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*, 24(2), pp. 165-174 .

Atkinson, F. S., Foster-Powell, K. & Brand-Miller, J. C., 2008. International Tables of Glycemic Index and Glycemic Load Values: 2008. *Diabetes Care*, Volume 31, pp. 2281-2283.

Barclay, A. W., Petocz, P., McMillan-Price, J., Flood, V. M., Prvan, T., Mitchell, P. & Brand-Miller, J. C., 2008. Glycemic index, glycemic load, and chronic disease risk--a meta-analysis of observational studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(3), pp. 627-637.

Batifoulier, F., Verny, M. A., Chanliaud, E., Remesy, C. & Demigné, C., 2005. Effect of different breadmaking methods on thiamine, riboflavin and pyridoxine contents of wheat bread. *Journal of Cereal Science*, Volume 42, pp. 101-108.

Becerra-Tomás, N., Guasch-Ferré, M., Quilez, J., Merino, J., Ferré, R., Díaz-López, A., Bulló, M., Hernández-Alonso, P., Palau-Galindo, A. & Salas-Salvadó, J., 2015. Effect of Functional Bread Rich in Potassium, γ -Aminobutyric Acid and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors on Blood Pressure, Glucose Metabolism and Endothelial Function: A Double-blind Randomized Crossover Clinical Trial. *Randomized Crossover Clinical Trial. Medicine (Baltimore)*, 94(46): e1807.

Biesiekierski, J. R., Rosella, O., Rose, R., Liels, K., Barrett, J. S., Shepherd, S. J., Gibson, P. R. & Muir, J. G., 2011. Quantification of fructans, galacto-oligosaccharides and other short-chain carbohydrates in processed grains and cereals. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 24(2), pp. 154-176.

- Bigliardi, B. & Galati, F., 2013. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), pp. 118-129.
- Bocker, G., Stolz, G. & Hammes, W. P., 1995. Neue Erkenntnisse zum Ökosystem Sauerteig und zur Physiologie des sauerartig sauerartig-typischen Stamme *Lactobacillus sanfrancisco* und *Lactobacillus pontis*. *Getreide Mehl und Brot*, Volume 49, pp. 370-374.
- Brandt, M. J., 2007. Sourdough products for convenient use in baking. *Food Microbiology*, 24(2), pp. 161-164.
- Broekaert, W. F., Courtin, C. M., Verbeke, K., Van de Wiele, T., Verstraete, W. & Delcour, J. A., 2011. Prebiotic and other health-related effects of cereal-derived arabinoxylans, arabinoxylan-oligosaccharides, and xylooligosaccharides. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(2), pp. 178-194.
- Brown, I. J., Tzoulaki, I., Candeias, V. & Elliot, P., 2009. Salt intakes around the world: implications for public health. *International Journal of epidemiology*, 38(3), pp. 791-813.
- Burton, P. & Lightowler, H. J., 2006. Influence of bread volume on glycaemic response and satiety. *British Journal of Nutrition*, Volume 96, pp. 877-882.
- Cabrera-Chàvez, F. & Calderòn de la Barca, A. M., 2010. *Trends in wheat technology and modification of gluten proteins for dietary treatment of coeliac disease patients*, 52(3), pp. 337-341.
- Caggianiello, G., Kleerebezem, M. & Spano, G., 2016. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 100, pp. 3877-3886.
- Calasso, M., Francavilla, R., Cristofori, F., De Angelis, M. & Gobbetti, M., 2018. New Protocol for Production of Reduced-Gluten Wheat Bread and Pasta and Clinical Effect in Patients with Irritable Bowel Syndrome: A randomised, Double-Blind, Cross-Over Study. *Nutrients*, 10(12):1873.
- Cannella, C., Galterio, G. & Gobbetti, M., 2010. Aspetti nutrizionali dei prodotti lievitati da forno. In: M. Gobbetti & A. Corsetti, a cura di *Biotechnologia dei prodotti lievitati da forno*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana, pp. 286-293.
- Capozzi, V., Menga, V., Disegu, A. M., De Vita, Pa., Van Sinderen, D., Cattivelli, L., Fares, C. & Spano, G., 2011. Biotechnological production of vitamin B2-enriched bread and pasta. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(15), pp. 8013-8020.
- Cariolo, D., 2014. *Indice insulinico: cos'è e a cosa serve*. [Online] Available at: <https://www.diabete.com/Indice-insulinico-cose-e-a-cosa-serve/> [Consultato il giorno 15 novembre 2020].

- Carlson, J. L., Erickson, J. M., Lloyd, B. & Slavin, J. L., 2018. Health Effects and Sources of Prebiotic Dietary Fiber. *Current developments in nutrition*, 2(3): nzy005.
- Carnevali, P., Ciati, R., Leporati, A. & Paese, M., 2007. Liquid sourdough fermentation: Industrial application perspectives. *Food Microbiology*, 24(2), pp. 150-154.
- Carrai, B., 2010. I cereali. In: B. Carrai, a cura di *Arte bianca. Materie prime, processi e controlli*. Milano: Edagricole, pp. 2-34.
- Caselato, V. & Amaya-Farfan, J., 2012. State of Knowledge on Amaranth Grain: A Comprehensive Review. *Journal of Food Science*, 77(4), pp. 93-104.
- Catassi, C. & Francavilla, R., 2010. Intolleranza al glutine. In: M. Gobbetti & A. Corsetti, a cura di *Biotechnologia dei prodotti lievitati da forno*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana.
- Chaoui, A., Faid, M. & Belhcen, R., 2003. Effect of natural starters used for sourdough bread in Morocco on phytate biodegradation. *Eastern Mediterranean health journal*, 9(1-2), pp. 141-147.
- Chaoui, A., Faid, M. & Belahsen, R., 2006. Making bread with sourdough improves iron bioavailability from reconstituted fortified wheat flour in mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 20(4), pp. 217-220.
- Chey, W. D., Kurlander, J. & Eswaran, S., 2015. Irritable bowel syndrome: a clinical review. *The Journal of the American Medical Association*, 313(9), pp. 949-958.
- Cicero, A. F. C., Fogacci, F. & Colletti, A., 2017. Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), pp. 1378-1394.
- Coda, R., Rizzello, C. G. & Gobbetti, M., 2010. Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of γ -aminobutyric acid (GABA). *International Journal of Food Microbiology*, 137(2-3), pp. 236-245.
- Coda, R., Rizzello, C. G., Pinto, D. & Gobbetti, M., 2012. Selected Lactic Acid Bacteria Synthesize Antioxidant Peptides during Sourdough Fermentation of Cereal Flours. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), pp. 1087-1096.
- Coda, R., Rizzello, C. G., Curiel, J. A., Poutanen, K. & Katina, K., 2014. Effect of bioprocessing and particle size on the nutritional properties of wheat bran fractions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Volume 25, pp. 19-27.
- Coda, R., Katina, K. & Rizzello, C. G., 2015a. Bran bioprocessing for enhanced functional properties. *Current Opinion in Food Science*, Volume 1, pp. 50-55.

Coda, R., Melama, L., Rizzello, C. G., Curiel, J. A., Sibakov, J., Holopainen, U., Pulkkinen, M. & Sozer, N., 2015b. Effect of air classification and fermentation by *Lactobacillus plantarum* VTT E-133328 on faba bean (*Vicia faba* L.) flour nutritional properties. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 193, pp. 34-42.

Coda, R., Varis, J., Verni, M., Rizzello, C. G. & Katina, K., 2017. Improvement of the protein quality of wheat bread through faba bean sourdough addition. *LWT - Food Science and Technology*, Volume 82, pp. 296-302.

Corsetti, A. & Settanni, L., 2007. Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*, 50(5), pp. 539-558.

Corsetti, A., Farris, A. G. & Gobbetti, M., 2010. Uso del lievito naturale. In: M. Gobbetti & A. Corsetti, a cura di *Biotechnologia dei prodotti lievitati da forno*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana, pp. 171-186.

Cosola, C., Maranzano, V., Zito, A., Montemurno, E., Dalfino, G., Pompa, G., Pertosa, G. B., Manno, C., Ciccone, M. M., Grandaliano, G. & Gesualdo, L., 2017. A low-sodium bread improves the adherence to a low sodium diet in hypertensive subjects. *Nephrology Dialysis Transplantation*, Volume 32, p. iii47.

Cossa, J., Oloffs, K., Kluge, H. & Drauschke, W., 2000. Variabilities of Total and Phytate Phosphorus Contents as well as Phytase Activity in Wheat. *Tropenlandwirt*, 101(2), pp. 119-126.

Costabile, A., Santarelli, S., Claus, S. P., Sanderson, J., Hudspith, B., Brostoff, J., Ward, J. L., Lovegrove, A., Shewry, P., Jones, H. E., Whitley, A. M. & Gibson, G. R., 2014. Effect of Breadmaking Process on In Vitro Gut Microbiota Parameters in Irritable Bowel Syndrome. *PLoS ONE*, 9(10):e111225.

CREA (Aggiornamento 2019), *Tabella di composizione degli alimenti*, Roma.

CREA (Revisione 2018), *Linee guida per una sana alimentazione italiana*, Roma.

Curiel, J. A., Coda, R., Limitone, A., Katina, K., Raulio, M., Giuliani, G., Rizzello, C. G. & Gobbetti, M., 2014. Manufacture and characterization of pasta made with wheat flour rendered gluten-free using fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria. *Journal of Cereal Science*, Volume 59, pp. 79-87.

Curiel, J. A., Coda, R., Centomani, I., Summo, C., Gobbetti, M. & Rizzello, C. G., 2015. Exploitation of the nutritional and functional characteristics of traditional Italian legumes: The potential of sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 196, pp. 51-61.

Curioni, A. & Giannattasio, M., 2010. Allergie al grano. In: M. Gobbetti & A. Corsetti, a cura di *Biotechnologia dei prodotti lievitati da forno*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana, pp. 335-351.

D'Alessandro, A. & De Pergola, G., 2014. Mediterranean Diet Pyramid: A Proposal for Italian People. *Nutrients*, Volume 6, pp. 4302-4316.

De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M. R., McSweeney, P. L. H., Faccia, M., Giovine, M. & Gobbetti, M., 2003. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 87, p. 259–270.

De Angelis, M., Rossana, C., Silano, M., Minervini, F., Rizzello, C. G., Di Cagno, R., Vicentini, O., De Vincenzi, M. & Gobbetti, M., 2006. Fermentation by selected sourdough lactic acid bacteria to decrease coeliac intolerance to rye flour. *Journal of Cereal Science* Volume, 43(3), pp. 301-304.

De Angelis, M., Rizzello, C. G., Scala, E., De Simone, C., Farris, G. A., Turrini, F. & Gobbetti, M., 2007. Probiotic Preparation Has the Capacity To Hydrolyze Proteins Responsible for Wheat Allergy. *Journal of Food Protection* 135–144, 70(1), p. 135–144.

De Angelis, M., Damiano, N., Rizzello, C. G., Cassone, A., Di Cagno, R. & Gobbetti, M., 2009. Sourdough fermentation as a tool for the manufacture of low-glycemic index white wheat bread enriched in dietary fibre. *European Food Research and Technology*, 229(4), pp. 593-601.

De Angelis, M., Cassone, A., Rizzello, C. G., Gagliardi, F., Minervini, F., Calasso, M., Di Cagno, R., Francavilla, R. & Gobbetti, M., 2010. Mechanism of Degradation of Immunogenic Gluten Epitopes from *Triticum turgidum* L. var. durum by Sourdough Lactobacilli and Fungal Proteases. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(2), pp. 508-518.

De Giorgio, R., Volta, U. & Gibson, P. R., 2016. Sensitivity to wheat, gluten and FODMAPs in IBS: facts or fiction?. *Gut*, Volume 65, pp. 169-178.

De Vuyst, L. & Neysens, P., 2005. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interaction. *Trends in Food Science & Technology*, 13(1-3), pp. 43-56.

De Vuyst, L., Vrancken, G., Ravyst, F., Rimaux, T. & Weckx, S., 2009. Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiology*, 26(7), pp. 666-675.

De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S. & Leroy, F., 2016. Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 239, pp. 26-34.

De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S. & Leroy, F., 2017. Microbial Ecology and Process Technology of Sourdough Fermentation. In: S. Sariaslani & G. M. Gadd, a cura di *Advances in Applied Microbiology*. s.l.:Elsevier, pp. 49-160.

Decock, P. & Cappelle, S., 2005. Bread technology and sourdough technology. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), pp. 113-120.

D'Egidio, M. G., 2004. I cereali. In: P. Cabras & A. Martelli, a cura di *Chimica degli alimenti*. Padova: Piccin Nuova Libreria, pp. 183-207.

Dewettinck, K., Van Bockstaele, F., Kuhne, B., Van de Walle, D., Courtens, T. M. & Gellynck, X., 2008. Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception. *Journal of Cereal Science*, 48(2), pp. 243-257.

Di Cagno, R., De Angelis, M., Lavermiococca, P., De Vincenzi, M., Giovannini, C., Faccia, M. & Gobbetti, M., 2002. Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), pp. 623-633.

Di Cagno, R., De Angelis, M., Auricchio, S., Greco, L., Clarke, C., De Vincenzi, M., Giovannini, C., D'Archivio, M., Landolfo, F., Parilli, G., Minervini, F., Arendt, E. & Gobbetti, M., 2004. Sourdough Bread Made from Wheat and Nontoxic Flours and Started with Selected Lactobacilli Is Tolerated in Celiac Sprue Patients. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), pp. 1088-1096.

Di Cagno, R., De Angelis, M., Limitone, A., Minervini, F., Carnevali, P., Corsetti, A., Gaenzle, M., Ciati, R. & Gobbetti, M., 2006. Glucan and Fructan Production by Sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), p. 9873-9881.

Di Cagno, R., Barbato, M., Di Camillo, C., Rizzello, C. G., De Angelis, M., Giuliani, G., De Vincenzi, M., Gobbetti, M., Cucchiara, S., 2010. Gluten-free sourdough wheat baked goods appear safe for young celiac patients: a pilot study. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 51(6), pp. 777-783.

Di Giandomenico, M., 2010. Storia e sociologia dei prodotti lievitati da forno. In: M. Gobbetti & A. Corsetti, a cura di *Biotechnologia dei prodotti lievitati da forno*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana, pp. 1-10.

Diana, M., Refecas, M. & Quilez, J., 2014. Free amino acids, acrylamide and biogenic amines in gamma-aminobutyric acid enriched sourdough and commercial breads. *Journal of Cereal Science*, Volume 60, pp. 639-644.

Dihm, K., Lind, M. V., Sundén, H., Ross, A., Savolainen, O., 2017. Quantification of benzoxazinoids and their metabolites in Nordic breads. *Food Chemistry*, Volume 15, pp. 7-13.

Dimidi, E., Cox, S. R., Rossi, M. & Whelan, K., 2019. Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. *Nutrients*, 11(8), p. 1086.

Duenas, M., Fernandez, D., Hernandez, T., Estrella, I. & Munoz, R., 2005. Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(2), pp. 297-304.

Felis, G. E., Dellaglio, F. & Torriani, S., 2010. Tassonomia dei batteri lattici. In: M. Gobbetti & A. Corsetti, a cura di *Biotecnologia dei prodotti lievitati da forno*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana, pp. 71-92.

Fernández-Tomé, S. & Hernández-Ledesma, B., 2019. Current state of art after twenty years of the discovery of bioactive peptide lunasin. *Food research international*, Volume 116, pp. 71-78.

Foster-Powell, K., Holt, S. H. A. & Brand-Miller, J. C., 2002. International table of glycemic index and glycemic load values: 2002. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(1), p. 5-56.

Fretzdorff, B. & Brummer, J. M., 1992. Reduction of phytic acid during breadmaking of whole-meal breads. *Cereal Chemistry*, 69(3), pp. 266-270.

Fu, W., Rao, H., Tian, Y. & Xue, W., 2020. Bacterial composition in sourdoughs from different regions in China and the microbial potential to reduce wheat allergens. *LWT - Food Science and Technology*, Volume 117, p. 108669.

Galle, S., Schwab, C., Del Bello, F., Coffey, A., Ganzle, M. & Arendt, E., 2012. Influence of in-situ synthesized exopolysaccharides on the quality of gluten-free sorghum sourdough bread. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), pp. 105-112.

Galli, V., Mazzoli, L., Luti, S., Venturi, M., Guerrini, S., Paoli, P., Vincenzini, M., Granchi, L. & Pazzagli, L., 2018. Effect of selected strains of lactobacilli on the antioxidant and anti-inflammatory properties of sourdough. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 286, pp. 55-65.

Ganzle, M. G., 2014. Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiology*, Volume 37, pp. 2-10.

Garcia-Esteva, R. M., Guerra-Hernández, E. & Villanova, B. G., 1991. Phytic acid content in milled cereal products and breads. *Food Research International*, Volume 32, pp. 217-221.

Gatto, V. & Torriani, S., 2004. Microbial population changes during sourdough fermentation monitored by DDGE analysis of 16S and 26S rRNA gene fragments. *Annals of Microbiology*, 54(1), pp. 31-42.

Gentilcore, D., 2015. Il pane nell'Europa moderna tra dietetica e alimentazione. In: G. Archetti, a cura di *La civiltà del pane. Storia, tecniche e simboli dal Mediterraneo all'Atlantico*. Milano: Fondazione CISAM, pp. 1132-1149.

Gerez, C. L., Font de Valdez, G. & Rollan, G. C., 2008. Functionality of lactic acid bacteria peptidase activities in the hydrolysis of gliadin-like fragments. *Letters in applied microbiology*, 47(5), pp. 427-432.

Giampaoli, S., Strazzullo, P., Galeone, D., Donfrancesco, C., Russo, O., Palmieri, L., Ippolito, R. & Vanuzzo, D., 2014. Il consumo di sodio e di potassio nell'alimentazione della popolazione adulta italiana. *Rivista Società Italiana di Medicina Generale*, Volume 2, pp. 27-28.

Giampaoli, S., Krogh, V., Grioni, S., Palmieri, L., Gulizia, M. M., Stamier, J. & Vannuzzo, D., 2015. Comportamenti alimentari degli italiani: risultati dell'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare. *Epidemiologia e Prevenzione*, 39(5-6), pp. 373-379.

Giorilli, P., 2003. Il lievito e gli agenti lievitanti chimici. In: P. Giorilli & E. Lipetskaia, a cura di *Panificando*. Milano: Franco Lucisano Editore, pp. 112-120.

Giuliani, G., Benedusi, A., Di Cagno, R., Rizzello, C. G. De Angelis, M., Gobbetti, M. & Cassone, A., 2014. *Method for partial degradation of gluten*. PCT, Brevetto n. WO2014033765A1.

Gobbetti, M., 1998. The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends in Food Science & Technology*, 9(7), pp. 267-274.

Gobbetti, M., 2010. Fisiologia e biochimica dei batteri lattici. In: M. Gobbetti & A. Corsetti, a cura di *Biotechnologia dei prodotti lievitati da forno*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana, pp. 153-166.

Gobbetti, M., Corsetti, A., Settanni, L. & Calasso, M., 2010. Enzimi, esopolisaccaridi e batteriocine. In: M. Gobbetti & A. Corsetti, a cura di *Biotechnologia dei prodotti lievitati da forno*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana, pp. 197-202.

Gobbetti, M., Di Cagno, R. & De Angelis, M., 2010. Functional Microorganisms for Functional Food Quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(8), pp. 716-727.

Gobbetti, M., Rizzello, C. G., Di Cagno, R. & De Angelis, M., 2014. How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. *Food Microbiology*, Volume 37, pp. 30-40.

Gobbetti, M., Pontonio, E., Flannino, P., Rizzello, C. G., Di Cagno, R. & De Angelis, M., 2018. How to improve the gluten-free diet: The state of the art from a food science T perspective. *Food Research International*, Volume 110, pp. 22-32.

Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Calasso, M., Archetti, G. & Rizzello, C. G., 2019. Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 302, pp. 103-113.

Granatiero, G., 2015. Il pane base della dieta mediterranea. In: G. Archetti, a cura di *La civiltà del pane. Storia, tecniche e simboli dal Mediterraneo all'Atlantico*. Milano: Fondazione CISAM, pp. 1895-1901.

Granito, M., Frias, J., Doblado, R., Guerra, M., Champ, M. & Vidal-Valverde, C., 2002. Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*) by natural fermentation. *European Food Research and Technology*, Volume 214, pp. 225-231.

Greco, L., Gobbetti, M., Auricchio, R., Di Mase, R., Landolfo, F., Oaoari, F., Di Cagno, R., De Angelis, M., Rizzello, C. G., Cassone, A., Terrone, G., Timpone, L., D'Aniello, M. & Maglio, M., 2011. Safety for Patients With Celiac Disease of Baked Goods Made of Wheat Flour Hydrolyzed During Food Processing. *Clinical Gastroenterology and hepatology*, Volume 9, pp. 24-29.

Guerzoni, M. E. & Gianotti, A., 2010. Fisiologia e biochimica dei lieviti. In: M. Gobbetti & A. Corsetti, a cura di *Biotechnologia dei prodotti lievitati da forno*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana, pp. 138-151.

Guidotti, M. C., 2005. L'alimentazione nell'antico Egitto. In: *Cibi e sapori nel mondo antico*. Livorno: Sillabe, pp. 18-24.

Guillon, F. & Champ, M., 2000. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. *Food Research International*, 33(3-4), pp. 233-245.

Hanhineva, K., Keski-Rahkonen, P., Lappi, J., Katina, K., Pekkinen, J., Savolainen, O., Timonen, O., Jussi, P., Mykkanen, H. & Poutanen, K., 2014. The Postprandial Plasma Rye

Fingerprint Includes Benzoxazinoid-Derived Phenylacetamide Sulfates. *The Journal of Nutrition*, Volume 144, pp. 1016-1022.

Hansen, A. & Schieberle, P., 2005. Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends in Food Science & Technology*, Volume 16, pp. 85-94.

Hartikainen, K., Putanen, K. & Katina, K., 2014. Influence of bioprocessed wheat bran on the physical and chemical properties of dough and on wheat bread texture. *Cereal Chemistry*, 91(2), pp. 115-123.

Hassan, E. G., Awad Alkareem, A. M. & Mustafa, A. M. I., 2008. Effect of Fermentation and Particle Size of Wheat Bran on the Antinutritional Factors and Bread Quality. *Pakistan Journal of Nutrition* 7 (4): 521-526, 2008, 7(4), pp. 521-526.

Hassani, A., Procopio, S. & Becker, T., 2015. Influence of malting and lactic acid fermentation on functional bioactive components in cereal-based raw materials: a review paper. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(1).

Hatoum, R., Labrie, S. & Fliss, I., 2012. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*, Volume 3, p. 421.

He, F. J. & MacGregor, G. A., 2009. A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes. *Journal of Human Hypertension*, 23(6), pp. 363-384.

Heran, B. S., My Wong, M., Heran, I. K. & Wright, J. M., 2008. Blood pressure lowering efficacy of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors for primary hypertension. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 4, p. CD003823.

Hjortmo, S., Patring, J., Jastrebova, J. & Andlid, T., 2008. Biofortification of folates in white wheat bread by selection of yeast strain and process. *International Journal of Food Microbiology*, 127(1-2), pp. 32-36.

Hole, A. S., Rud, I., Grimmer, S., Sigl, S., Narvhus, J., Sahlstrom, S., 2012. Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(25), pp. 6369-6375.

Houben, A., Gotz, H., Mitzscherling, M. & Becker, T., 2010. Modification of the rheological behavior of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) dough. *Journal of Cereal Science*, 51(3), pp. 350-356.

Huang, X., Schuppan, D., Rojas Tovar, L. E., Zevallos, V. F., Loponen, J. & Ganzle, M., 2020. Sourdough Fermentation Degrades Wheat Alpha-Amylase/Trypsin Inhibitor (ATI) and Reduces Pro-Inflammatory Activity. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(7), p. 943.

Italmopa, 2020. *I nuovi trend di consumo del pane in Italia*. [Online] Available at: http://www.italmopa.com/wp-content/uploads/2020/01/Conferenza-Italmopa-Sigep-2020_Comunicato-stampa.pdf [Consultato il giorno 16 Ottobre 2020].

Izzo, J. L. & Weir, M. R., 2011. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Journal of clinical hypertension*, 13(9), pp. 667-675.

Jayachandran, M., Chen, J., Chunf, S. S. M. & Xu, B., 2018. A critical review on the impacts of β -glucans on gut microbiota and human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, Volume 61, pp. 101-110.

Jekle, M., Houben, A., Mitzsherling, M. & Becker, T., 2010. Effects of selected lactic acid bacteria on the characteristics of amaranth sourdough. *Journal of the science of food and agriculture*, 90(13), pp. 2326-2332.

Johansson, L., Tuomainen, P., Anttila, H., Rita, H. & Virkki, L., 2007. Effect of processing on the extractability of oat β -glucan. *Food Chemistry*, 105(4), pp. 1439-1445.

Jose, P. A. & Raj, D., 2015. Gut microbiota in hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 25(4), pp. 403-409.

Karaman, K., Sagdic, O. & Durak, Z. M., 2018. Use of phytase active yeasts and lactic acid bacteria isolated from sourdough in the production of whole wheat bread. *LWT - Food Science and Technology*, Volume 91, pp. 557-567.

Kariluoto, S. et al., 2004. Effect of Baking Method and Fermentation on Folate Content of Rye and Wheat Breads. *Cereal Chemistry*, 81(1), pp. 134-139.

Kariluoto, S., Aittamaa, M., Korhola, M., Salovaara, H., Liisa, V. & Vieno, P., 2006. Effects of yeasts and bacteria on the levels of folates in rye sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), pp. 137-143.

Katina, K., 2006. *Sourdough: a tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread*. s.l.:VTT Publications 569.

Katina, K., Liukkonen, K. H., Kaukovirta-Norja, A., Adlercreutz, H., Heinonen, S. M., Lampi, A. M., Pihlava, J. M. & Poutanen, K., 2007a. Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *Journal of Cereal Science*, Volume 46, p. 348–355.

Katina, K., Laitila, A., Juvonen, R., Liukkonen, K. H., Kariluoto, S., Piironen, V., Landberg, R., Aman, P. & Poutanen, K., 2007b. Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye. *Food Microbiology*, Volume 24, pp. 175-186.

Katina, K., Juvonen, R., Laitila, A., Flander, L., Nordlund, E., Kariluoto, S., Piironen, V. & Poutanen, K., 2012. Fermented Wheat Bran as a Functional Ingredient in Baking. *Cereal Chemistry*, 89(2), pp. 126-134.

Kies, A. K., De Jonge, L. H., Kemme, P. A. & Jongbloed, A. W., 2006. Interaction between Protein, Phytate, and Microbial Phytase. In Vitro Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 54, pp. 1753-1758.

Kitts, D. D. & Weiler, K., 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current pharmaceutical design*, 9(16), pp. 1309-1323.

Koraki, M., Ganzle, M. J. & Vogel, R. F., 2002. Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), pp. 958-965.

Kulp, K., 2003. Bakers's Yeast and Sourdough Technologies in the Production of U.S. Bread Products. In: K. Kulp & K. Lorenz, a cura di *Handbook of Dough Fermentations*. New York: Marcel Dekker, pp. 109-151.

Kumar, V., Sinha, A. K., Makkar, H. P. S. & Becker, K., 2010. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry*, 120(4), pp. 945-959.

Laatikainen, R., Koskenpato, J., Hongisto, S. M., Loponen, J., Poussa, T., Hillila, M. & Korpela, R., 2016. Randomised clinical trial: low-FODMAP rye bread vs. regular rye bread to relieve the symptoms of irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 44(5), pp. 460-470.

Laatikainen, R., Koskenpato, J., Hongisto, Sanna-Maria., Loponen, J., Poussa, T., Huang, X., Sontag-Strohm, T., Salmenkari, H. & Korpela, R., 2017. Pilot Study: Comparison of Sourdough Wheat Bread and Yeast-Fermented Wheat Bread in Individuals with Wheat Sensitivity and Irritable Bowel Syndrome. *Nutrients*, 9(11), p. 1215.

Lafiandra, D. & D'Egidio, M. G., 2010. Chimica e attitudine tecnologica delle materie prime. In: M. Gobbetti & A. Corsetti, a cura di *Biotechnologia dei prodotti lievitati da forno*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana, pp. 17-38.

Lamberts, L., Joye, I. J., Belien, T. & Delcour, J. A., 2012. Dynamics of γ -aminobutyric acid in wheat flour bread making. *Food Chemistry*, 130(4), pp. 896-901.

Lang, R. & Jebb, S. A., 2003. Who consumes whole grains, and how much?. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), pp. 123-127.

Lappi, J., Selinheimo, E., Schwab, U., Katina, K., Lehtinen, P., Mykkanen, H., Kolehmainen, M. & Putanen, K., 2010. Sourdough fermentation of wholemeal wheat bread increases solubility of arabinoxylan and protein and decreases postprandial glucose and insulin responses. *Journal of Cereal Science*, 51(1), pp. 152-158.

Lappi, J., Aura, A. M., Katina, K., Nordlund, E., Kolehmainen, M., Mykkanen, H. & Poutanen, K., 2013. Comparison of postprandial phenolic acid excretions and glucose responses after ingestion of breads with bioprocessed or native rye bran. *Food & Function*, 4(6), pp. 972-981.

Lattanzi, A., Minervini, F. & Gobbetti, M., 2014. Assessment of comparative methods for storing type-I wheat sourdough. *Food Science & Technology*, 59(2), pp. 948-955.

Lattimer, J. M. & Haum, M. D., 2010. Effects of Dietary Fiber and Its Components on Metabolic Health. *Nutrients*, Volume 2, pp. 1266-1289.

Laurent, J., Timmermans, E., Stuyf, N., Verstrepen, K. J. & Courtin, C. M., 2020. Variability in yeast invertase activity determines the extent of fructan hydrolysis during wheat dough fermentation and final FODMAP levels in bread. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 236, p. 108648.

Lauri, S., 2006. La fermentazione. In: S. Lauri, a cura di *I segreti di un'arte*. Trieste: Stella Arti Grafiche, pp. 109-140.

Lauri, S., 2012. Il sale. In: S. Lauri, a cura di *Pane e pizza. Due mondi, un'unica passione*. Messina: Federazione Italiana Pizzaioli nel Mondo.

Lavermioca, P., Valerio, F. & Foschino, R., 2010. La contaminazione microbica e le infezioni virali nei prodotti lievitati da forno. In: M. Gobbetti & A. Corsetti, a cura di *Biotechnologia dei prodotti lievitati da forno*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana, pp. 221-225.

Lazzaroni, L., 2017. Dal lievito madre al pane. In: L. Lazzaroni, a cura di *Altri grani, altri pani*. Milano: Guido Tommasi Editore, pp. 116-121.

Leenhardt, F., Levrat-Verny, M. A., Chanliaud, E. & Remesy, C., 2005. Moderate Decrease of pH by Sourdough Fermentation Is Sufficient To Reduce Phytate Content of Whole Wheat Flour through Endogenous Phytase Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 53, p. 98-102.

Legislazione Italiana. 1967. Legge n.580, 4 luglio. Disciplina per la lavorazione e il commercio dei cereali, degli sfarinati, del pane e delle paste alimentari. G.U. n.189, 29 luglio

1967. DPR n. 187, 9 febbraio, 2001. G.U. n. 117, 22 maggio 2001. DPR n. 502, 30 novembre 1998. G.U. n. 25, 1 febbraio 1999.

Legislazione italiana. 2005. Decreto Ministeriale (Ministero Attività Produttive), 22 Luglio. Disciplina della produzione e della vendita di taluni prodotti dolciari da forno. G.U. n.177, 1 Agosto 2005.

Legislazione europea. 2006. Regolamento CE n. 828/2014 del Parlamento europeo e del consiglio, 20 dicembre. Indicazioni nutrizionali e sulla salute fornite sui prodotti alimentari. G.U. UE n. L404, 30 dicembre 2006.

Legislazione europea. 2014. Regolamento UE n. 828/2014 della Commissione, 30 luglio. Prescrizioni riguardanti l'informazione dei consumatori sull'assenza di glutine o sulla sua presenza in misura ridotta negli alimenti. G.U. UE n. L228, 31 luglio 2014.

Leszczyńska, J., Diowski, A., Łacka, A., Bryszewska, M., Wolska, K. & Ambroziak, W., 2009. Decrease of wheat flour allergenicity via lactic acid fermentation. *Food and Agricultural Immunology*, 20(2), pp. 139-145.

Liao, W., Wang, C. Y., Shyu, Y. T., Yu, R. C. & Ho, K. C., 2013. Influence of preprocessing methods and fermentation of adzuki beans on γ -aminobutyric acid (GABA) accumulation by lactic acid bacteria. *Journal of Functional Foods*, 5(2), pp. 1108-1115.

Liljeberg, H. G. M. & Björck, I. M. E., 1998. Delayed gastric emptying rate may explain improved glycaemia in healthy subjects to a starchy meal with added vinegar. *European Journal of Clinical Nutrition*, Volume 52, pp. 368-371.

Liljeberg, H. G. M., Lönnér, C. H. & Björck, I. M. E., 1995. Sourdough Fermentation or Addition of Organic Acids or Corresponding Salts to Bread Improves Nutritional Properties of Starch in Healthy Humans. *The Journal of Nutrition*, Volume 125, pp. 1503-1511.

Limon, R. I., Penas, E., Torino, M. I., Martinex-Villaluenga, C., Duenas, M. & Frias, J., 2015. Fermentation enhances the content of bioactive compounds in kidney bean extracts. *Food Chemistry*, Volume 172, pp. 343-352.

Lioger, D., Leenhardt, F., Demigne, C. & Remesy, C., 2007. Sourdough fermentation of wheat fractions rich in fibres before their use in processed food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volume 87, pp. 1368-1373.

Lionetti, E., Gatti, S., Pulvirenti, A. & Catassi, C., 2015. Celiac disease from a global perspective. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 29(3), pp. 365-379.

Lipetskaia, E., 2003. Le principali fasi della produzione del pane e relativi procedimenti. In: P. Giorilli & E. Lipetskaia, a cura di *Panificando*. Padova: Franco Lucisano Editore, pp. 148-180.

Liu, J., Chey, W. D., Haller, E. & Eswaran, S., 2020. Low-FODMAP Diet for Irritable Bowel Syndrome: What We Know and What We Have Yet to Learn. *Annual review of medicine*, Volume 71, pp. 303-314.

Liukkonen, K.-H., Katina, K., Wilhelmsson, A., Myllymaki, O., Lampi, A.-M., Kariluoto, S., Piironen, V., Heinonen, S.-M., Nurmi, T., Adlercreutz, H., Peltoketo, A., Pihlava, J.-M. & Hietaniemi, V., Poutanen, K., 2003. Process-induced changes on bioactive compounds in whole grain rye. *Proceedings of the Nutrition Society*, Volume 62, pp. 117-122.

Lopez, H. W., Ouvry, A., Bervas, E., Guy, C., Messenger, A., Demigne, C. & Remesy, C., 2000. Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated from Sour Doughs Degrade Phytic Acid and Improve Calcium and Magnesium Solubility from Whole Wheat Flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), pp. 2281-2285.

Lopez, H. W., Krespine, V., Guy, C., Messenger, A., Demigne, C. & Remesy, C., 2001. Prolonged Fermentation of Whole Wheat Sourdough Reduces Phytate Level and Increases Soluble Magnesium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), pp. 2657-2662.

Lopez, H. W., Duclos, V., Coudray, C., Krespine, V., Feillet-Coudrat, C., Messenger, A., Demigne, C. & Remesy, C., 2003. Making bread with sourdough improves mineral bioavailability from reconstituted whole wheat flour in rats. *Nutrition*, 19(6), pp. 524-530.

Loponen, J. & Gänzle, M. G., 2018. Use of Sourdough in Low FODMAP Baking. *Foods (Basel, Switzerland)*, 7(7), p. 96.

Luti, S., Mazzoli, L., Ramazzotti, M., Galli, V., Venturi, M., Marino, G., Lehmann, M., Guerrini, S., Granchi, L., Paoli, P. & Pazzagli, L., 2020. Antioxidant and anti-inflammatory properties of sourdoughs containing selected Lactobacilli strains are retained in breads. *Food Chemistry*, Volume 322, p.126710.

Magaluti, M., Dunelli, G., Leoncini, E., Bregola, V., Bosi, S., Cicero, A. F. G. & Hrelia, S., 2012. Bioactive Peptides in Cereals and Legumes: Agronomical, Biochemical and Clinical Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), pp. 21120-21135.

Maioli, M., Pes, M. G., Sanna, M., Cherchi, S., Dettori, M., Manca, E. & Farris, G. A., 2008. Sourdough-leavened bread improves postprandial glucose and insulin plasma levels in subjects with impaired glucose tolerance. *Acta Diabetol*, 45(2), pp. 91-96.

Mandile, R., Picascia, S., Parrella, C., Camarca, A., Gobbetti, M., Greco, L., Troncone, R., Gianfrani, C. & Auticchio, R., 2017. Lack of immunogenicity of hydrolysed wheat flour in patients with coeliac disease after a short-term oral challenge. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 46(4), pp. 440-446.

Martelli, A., 2004. Minerali. In: P. Cabras & A. Martelli, a cura di *Chimica degli alimenti*. Padova: Piccin Nuova Libreria, pp. 79-93.

Martinez-Villaluenga, C., Michalska, A., Piskula, M. K., Vidal-Valverde, C. & Zielinski, H., 2009. Effect of Flour Extraction Rate and Baking on Thiamine and Riboflavin Content and Antioxidant Capacity of Traditional Rye Bread. *Journal of Food Science*, 74(1), pp. 49-55.

McCrary, M. A., Hamaker, B. R., Lovejoy, J. C. & Eichelsdoerfer, P. E., 2010. Pulse Consumption, Satiety, and Weight Management. *Advances in Nutrition*, 1(1), pp. 17-30.

McGee, H., 2016. Paste e pastelle di cereali: pane, torte, pasticceria, pasta. In: *Il cibo e la cucina. Scienza, storia e cultura degli alimenti*. Roma: Ricca Editore, pp. 514-518.

Melini, F., Melini, V., Luziatelli, F. & Ruzzi, M., 2017. Current and Forward-Looking Approaches to Technological and Nutritional Improvements of Gluten-Free Bread with Legume Flours: A Critical Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), pp. 1101-1122.

Menezes, L. A. A. et al., 2018. Effects of Sourdough on FODMAPs in Bread and Potential Outcomes on Irritable Bowel Syndrome Patients and Healthy Subjects. *Frontiers in Microbiology*, Volume 9, p. 1972.

Meroth, C. B., Walter, J., Hertel, C., Brandt, M. J. & Hammes, W. P., 2003. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), pp. 475-482.

Michalska, A., Ceglinska, A., Amarowicz, R., Piskula, M. K., Szawara-Nowak, D. & Zielinski, H., 2007. Antioxidant Contents and Antioxidative Properties of Traditional Rye Breads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), pp. 734-740.

Minervini, F., Lattanzi, A., De Angelis, M., Di Cagno, R. & Gobbetti, M., 2012. Influence of artisan bakery- or laboratory-propagated sourdoughs on the diversity of Lactic Acid Bacterium and yeast microbiotas. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), pp. 5328-5340.

Minervini, F., De Angelis, M., Di Cagno, R. & Gobbetti, M., 2014. Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 171, pp. 136-146.

Mir, N. A., Riar, C. S. & Singh, S., 2018. Nutritional constituents of pseudo cereals and their potential use in food systems: A review. *Trends in Food Science & Technology*, Volume 75, pp. 170-180.

Mocarelli, L. & Vaquero Pineiro, M., 2015. Il lungo addio al pane nell'Italia del Novecento. In: G. Archetti, a cura di *La civiltà del pane. Sotria, tecniche e simboli dal Mediterraneo all'Atlantico*. Milano: Fondazione CISAM.

Mohammadi-Kouchesfahani, M., Hamidi-Esfahani, Z. & Azizi, M. H., 2019. Isolation and identification of lactic acid bacteria with phytase activity from sourdough. *Food Science & Nutrition*, 7(11), pp. 3700-3708.

Montanari, G., 2018. Il lievito naturale. In: G. Montanari, a cura di *pH 4.1. Scienza e artigianalità della pasta lievitata*. Torino: Chiriotti Editori, pp. 39-41.

Montemurro, M., Pontonio, E., Gobbetti, M. & Rizzello, C. G., 2019. Investigation of the nutritional, functional and technological effects of the sourdough fermentation of sprouted flours Author links open overlay panel. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 302, pp. 47-58.

Moore, J., Luther, M., Cheng, Z. & Yu, L. L., 2009. Effects of baking conditions, dough fermentation, and bran particle size on antioxidant properties of whole-wheat pizza crusts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(3), pp. 832-839.

Moroni, A. V., Arendt, E. K., Morrissey, J. P. & Del Bello, F., 2010. Development of buckwheat and teff sourdoughs with the use of commercial starters.. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1-2), pp. 142-148.

Moroni, A., Zannini, E., Sensidoni, G. & Arendt, E. K., 2012. Exploitation of buckwheat sourdough for the production of wheat bread. *European Food Research and Technology*, 234(4), p. 659–668.

Mueller, T. & Voigt, W., 2011. Fermented wheat germ extract--nutritional supplement or anticancer drug?. *Nutritional Journal*, Volume 10, p. 89.

Muir, J. G., Varney, J. E., Ajamian, M. & Gibson, P. R., 2019. Gluten-free and low-FODMAP sourdoughs for patients with coeliac disease and irritable bowel syndrome: A clinical perspective. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 290, pp. 237-246.

Nakamura, K., Naramoto, K. & Koyama, M., 2013. Blood-pressure-lowering effect of fermented buckwheat sprouts in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*, 5(1), pp. 406-415.

Naqash, F., Gani, A., Gani, A. & Masoodi, F. A., 2017. Gluten-free baking: Combating the challenges - A review. *Trends in Food Science & Technology*, Volume 66, pp. 98-107.

Ngo, D. H. & Vo, T. S., 2019. An Updated Review on Pharmaceutical Properties of Gamma-Aminobutyric Acid. *Molecules*, 24(15), p. 2678.

Nicoud, M., 2015. La dietetica antica e medievale. In: G. Archetti, a cura di *La civiltà del pane. Storia, tecniche e simboli dal Mediterraneo all'Atlantico*. Milano: Fondazione CISAM, pp. 1115-1129.

Nissar, J., Ahad, T., Naik, H. R. & Hussai, S. Z., 2017. A review phytic acid: As antinutrient or nutraceutical. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6), pp. 1554-1560.

Novotni, D., Ćurić, D., Bituh, M., Colić-Barić, I., Čukelj, N. & Škevin, D., 2011. Glycemic index and phenolics of partially-baked frozen bread with sourdough. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(1), pp. 26-33.

Nuobariene, L., Hansen, A. S., Jespersen, L. & Arneborg, N., 2011. Phytase-active yeasts from grain-based food and beer. *Journal of Applied Microbiology*, 110(6), pp. 1370-1380.

Nuobariene, L., Cizeikiene, D., Gradzeviciute, E., Hansen, Å. S.; Rasmussen, S. K., Juodeikiene, G. & Vogensen, D. K., 2015. Phytase-active lactic acid bacteria from sourdoughs: Isolation and identification. *LTW - Food Science and Technology*, 63(1), pp. 766-772.

Dorđević, T. M., Šiler-Marinković, S. S. & Dimitrijević-Branković, S. I., 2010. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chemistry*, Volume 119, pp. 957-973.

Păcularu-Burada, B., Georgescu, L. A. & Bahrim, G. E., 2020. Current approaches in sourdough production with valuable characteristics for technological and functional applications. *The annals of the University Dunarea De Jos of Galati*, 44(1), pp. 132-148.

Pagani, M. A., Bottega, G. & Mariotti, M., 2010. Tecnologia dei prodotti lievitati da forno. In: M. Gobbetti & A. Corsetti, a cura di *Biotechnologia dei prodotti lievitati da forno*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana, pp. 41-47.

Parada, J. & Aguilera, J. M., 2007. Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2), pp. R21-32.

Peñas, E., Diana, M., Firas, J., Quilez, J. & Martínez-Villaluenga, C., 2015. A Multistrategic Approach in the Development of Sourdough Bread Targeted Towards Blood Pressure Reduction. *Plant Foods for Human Nutrition*, Volume 70, pp. 97-103.

Pirkola, L., Laatikainen, R., Loponen, J., Hongisto, S.-M., Jillila, M., Nuora, A., Yang, B., Linderborg, K. M. & Freese, R., 2018. Low-FODMAP vs regular rye bread in irritable bowel syndrome: Randomized SmartPill® study. *World journal of gastroenterology*, 24(11), pp. 1259-1268.

Poitrenaud, B., 2003. Commercial starters in France. In: K. Kulp & K. Lorenz, a cura di *Handbook of Dough Fermentations*. New York: Marcel Dekker, pp. 202-228.

Polese, B., Nicolai, E., Genovese, D., Verlezza, V., La Sala, C. N., Aiello, M., Inglese, M., Incoronato, M., Sarnelli, G., De Rosa, T., Schiatti, A., Mondelli, F., Ercolini, D. & Cuomo, R., 2018. Postprandial Gastrointestinal Function Differs after Acute Administration of Sourdough Compared with Brewer's Yeast Bakery Products in Healthy Adults. *The Journal of Nutrition*, Volume 148, pp. 202-208.

Pollan, M., 2014. Una magnifica forma di pane bianco. In: M. Pollan, a cura di *Cotto. Storia naturale della trasformazione*. Milano: Adelphi Edizioni, pp. 224-271.

Požrl, T., Kopjar, M., Kurent, I., Hribar, J. & Janeš, A., 2007. Phytate Degradation during Breadmaking: The Influence of Flour Type and Breadmaking Procedures. *Czech Journal of Food Sciences*, Volume 27, pp. 29-38.

Poutanen, K., Flander, L. & Katina, K., 2009. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology*, Volume 26, pp. 693-699.

Prestamo, G., Pedrazuela, A., Penas, E., Lasuncion, M. A. & Arroyo, H., 2003. Role of buckwheat diet on rats as prebiotic and healthy food. *Nutrition Research*, 23(6), pp. 803-814.

Quaglia, G., 1984. Agenti lievitanti. In: G. Quaglia, a cura di *Scienza e Tecnologia della Panificazione*. Pinerolo: Chiriotti Editori, pp. 221-237.

Quilez, J. & Salas-Salvado, J., 2012. Salt in bread in Europe: potential benefits of reduction. *Nutrition reviews*, 70(11), pp. 666-678.

Rühmkorf, C., RübSam, H., Becker, T., Bork, C., Voiges, K., Mischnick, P., Brandt, M. J. & Vogel, R. F., 2012. Effect of structurally different microbial homoexopolysaccharides on the quality of gluten-free bread. *European Food Research and Technology*, Volume 235, pp. 139-146.

Rashmi, B. S., Gayathri, D., Vasudha, M., Prashantkumar, C. S., Swamy, C. T., Sunil, K. S., Somaraja, P. K. & Prakash, P., 2020. Gluten hydrolyzing activity of *Bacillus* spp isolated from sourdough. *Microbial Cell Factories*, 19:130.

Reale, A., Konietzny, U., Coppola, R., Sorrentino, E. & Greiner, R., 2007. The importance of lactic acid bacteria for phytate degradation during cereal dough fermentation. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), p. 2993–2997.

Rinninella, E., Cintoni, M., Mele, M. C. & Gasbarrini, A., 2019a. Irritable Bowel Syndrome (IBS) and Non-Celiac Gluten Sensitivity (NCGS): Where Is the Culprit Hiding? Nutritional Tips for Gastroenterologists. *Nutrients*, 11(10), p. 2499.

Rinninella, E., Cintoni, M., Raoul, P., Lapetuso, L. R., Scaldaferrì, F., Pulcini, G., Migglìano, G. A. D., Gasbarrini, A. & Mele, M. C., 2019b. Food Components and Dietary Habits: Keys for a Healthy Gut Microbiota Composition. *Nutrients*, 11(10), p. 2393.

Rizzello, C. G., De Angelis, M., Coda, R. & Gobbetti, M., 2006. Use of selected sourdough lactic acid bacteria to hydrolyze wheat and rye proteins responsible for cereal allergy. *European Food Research and Technology* volume, Volume 223, pp. 405-411.

Rizzello, C. G., De Angelis, M., Di Cagno, R., Camarca, A., Silano, M., Losito, I., De Vincenzi, M., De Bari, M. D., Palmisano, F., Maurano, F., Gianfrani, C. & Gobbetti, M., 2007. Highly Efficient Gluten Degradation by Lactobacilli and Fungal Proteases during Food Processing: New Perspectives for Celiac Disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), pp. 4499-4507.

Rizzello, C. G., Cassone, A., Di Cagno, R. & Gobbetti, M., 2008. Synthesis of Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Peptides and γ -Aminobutyric Acid (GABA) during Sourdough Fermentation by Selected Lactic Acid Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 56, pp. 6936-6943.

Rizzello, C. G., Coda, R., De Angelis, M., Di Cagno, R., Carnevali, P. & Gobbetti, M., 2009. Long-term fungal inhibitory activity of water-soluble extract from *Amaranthus* spp. seeds during storage of gluten-free and wheat flour breads. *International journal of food microbiology*, 131(2-3), pp. 189-196.

Rizzello, C. G., Nionelli, L., Coda, R., De Angelis, M. & Gobbetti, M., 2010a. Effect of sourdough fermentation on stabilisation, and chemical and nutritional characteristics of wheat germ. *Food Chemistry*, Volume 119, pp. 1079-1089.

Rizzello, C. G., Nionelli, L., Coda, R., Di Cagno, R. & Gobbetti, M., 2010b. Use of sourdough fermented wheat germ for enhancing the nutritional, texture and sensory characteristics of the white bread. *European Food Research and Technology*, Volume 230, pp. 645-654.

Rizzello, C. G., Nionelli, L., Coda, R. & Gobbetti, M., 2011a. Synthesis of the cancer preventive peptide lunasin by lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Nutrition and cancer*, 64(1), pp. 111-120.

Rizzello, C. G., Cassone, A., Coda, R. & Gobbetti, M., 2011b. Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. *Food Chemistry*, 127(3), pp. 952-959.

Rizzello, C. G., Coda, R., Mazzacane, F., Minervini, D. & Gobbetti, M., 2012. Micronized by-products from debranned durum wheat and sourdough fermentation enhanced

the nutritional, textural and sensory features of bread. *Food Research International*, Volume 46, pp. 304-313.

Rizzello, C. G., Mueller, T., Coda, R., Reipsch, F., Nionelli, L., Curiel, J. A. & Gobbetti, M., 2013. Synthesis of 2-methoxy benzoquinone and 2,6-dimethoxybenzoquinone by selected lactic acid bacteria during sourdough fermentation of wheat germ. *Microbial Cell Factories*, Volume 12, p. 105.

Rizzello, C. G., Curiel, J. A., Nionelli, L., Vincentini, O., Di Cagno, R., Silano, M., Gobbetti, M. & Coda, R., 2014a. Use of fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria for making wheat bread with an intermediate content of gluten. *Food Microbiology*, Volume 37, pp. 59-68.

Rizzello, C. G., Calasso, M., Campanella, D., De Angelis, M. & Gobbetti, M., 2014b. Use of sourdough fermentation and mixture of wheat, chickpea, lentil and bean flours for enhancing the nutritional, texture and sensory characteristics of white bread. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 180, pp. 78-87.

Rizzello, C. G., Hernandez-Ledesma, B., Fernandez-Tome, S., Curiel, J. A., Pinto, D., Marzani, B., Coda, R. & Gobbetti, M., 2015. Italian legumes: effect of sourdough fermentation on lunasin-like polypeptides. *Microbial Cell Factories*, Volume 14, p. 168.

Rizzello, C. G., Montemurro, M. & Gobbetti, M., 2016a. Characterization of the Bread Made with Durum Wheat Semolina Rendered Gluten Free by Sourdough Biotechnology in Comparison with Commercial Gluten-Free Products. *Journal of Food Science*, 81(9), pp. 2263-2272.

Rizzello, C. G., Losito, I., Facchini, L., Katina, K., Palmisano, F., Gobbetti, M. & Coda, R., 2016b. Degradation of vicine, convicine and their aglycones during fermentation of faba bean flour. *Scientific reports*, Volume 6, p. 32452.

Rizzello, C. G., Lorusso, A., Montemurro, M. & Gobbetti, M., 2016c. Use of sourdough made with quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour and autochthonous selected lactic acid bacteria for enhancing the nutritional, textural and sensory features of white bread. *Food Microbiology*, Volume 56, pp. 1-13.

Rizzello, C. G., Lorusso, A., Russo, V., Pirro, D., Marzani, B. & Gobbetti, M., 2017. Improving the antioxidant properties of quinoa flour through fermentation with selected autochthonous lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 241, pp. 252-261.

Rizzello, C. G., Portincasa, P., Montemurro, M., Di Palo, D. M., Lorusso, M. P., De Angelis, M., Bonfrate, L., Genot, B. & Gobbetti, M., 2019. Sourdough Fermented Breads are

More Digestible than Those Started with Baker's Yeast Alone: An In Vivo Challenge Dissecting Distinct Gastrointestinal Responses. *Nutrients*, 11(12), p. 2954.

Roszkowska, A., Pawlicka, M., Mroczek, A., Balabuszek, K. & Nieradko-Iwanicka, B., 2019. Non-Celiac Gluten Sensitivity: A Review. *Medicina (Kaunas)*, 55(6), p. 222.

Różyło, R., Rudy, S., Krzykowski, A. & Dzikowski, D., 2014. Novel Application of Freeze-Dried Amaranth Sourdough in Gluten-Free Bread Production. *Journal of Food Process Engineering*, 38(2), pp. 135-143.

Saa, D. T., Di Silvestro, R., Nissen, L., Dinelli, G. & Giannotti, A., 2018. Effect of sourdough fermentation and baking process severity on bioactive fiber compounds in immature and ripe wheat flour bread. *LWT - Food Science and Technology*, Volume 89, pp. 322-328.

Salazar, N., Gueimonde, M., de Los Reyes-Gavilán, C. G. & Ruas-Madiedo, P., 2016. Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria as Fermentable Substrates by the Intestinal Microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 3(56), pp. 1440-1453.

Salmenkallio-Marttila, M., Katina, K. & Autio, K., 2001. Effects of Bran Fermentation on Quality and Microstructure of High-Fiber Wheat Bread. *Cereal Chemistry*, 78(4), pp. 429-435.

Sandberg, A. S., Brune, M., Carlsson, N. G., Hallberg, L., Skoglund, E., Rossander-Hulthen, L., 1999. Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 70(2), pp. 240-246.

Sarasa, S. et al., 2020. A Brief Review on the Non-protein Amino Acid, Gamma-amino Butyric Acid (GABA): Its Production and Role in Microbes. *Current Microbiology*, 77(4), pp. 534-544.

Scazzina, F., Del Rio, D., Pellegrini, N. & Brighenti, F., 2009. Sourdough bread: Starch digestibility and postprandial glycemic response. *Journal of Cereal Science*, 49(3), pp. 419-421.

Scherf, K. A., Koehler, P. & Wiesere, H., 2016. Gluten and wheat sensitivities – An overview. *Journal of Cereal Science*, Volume 67, pp. 2-11.

Schwab, C., Mastrangelo, M., Corsetti, A. & Ganzle, M., 2008. Formation of oligosaccharides and polysaccharides by *Lactobacillus reuteri* LTH5448 and *Weissella cibaria* 10M in sorghum sourdoughs. *Cereal Chemistry*, Volume 85, pp. 679-684.

Shirai, K., Revah-Moiseev, S., Garcia-Garibay, M. & Marshall, V. M., 1994. Ability of some strains of lactic acid bacteria to degrade phytic acid. *Letters in Applied Microbiology*, Volume 19, pp. 366-369.

SID, 2010. *Alimentazione e diabete*. [Online] Available at: <https://www.siditalia.it/divulgazione/alimentazione-e-diabete> [Consultato il giorno 15 novembre 2020].

Silow, C., Axel, C., Zannini, E. & Arendt, E. K., 2016. Current status of salt reduction in bread and bakery products e A review. *Journal of Cereal Science*, Volume 72, pp. 135-145.

Singh, R., Salem, A., Nanavati, J. & Mullin, G. E., 2018. The Role of Diet in the Treatment of Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review. *Gastroenterology Clinics of North America*, 47(1), pp. 107-137.

SINU (IV Revisione), *Livelli di Assunzione di Riferimento di Nutrienti ed energia per la popolazione italiana*, Roma, 2019.

Solomon, T. P. J. & Blannin, A. K., 2007. Effects of short-term cinnamon ingestion on in vivo glucose tolerance. *Diabetes, obesity & metabolism*, 9(6), pp. 895-901.

Sterr, Y., Weiss, A. & Schmidt, H., 2009. Evaluation of lactic acid bacteria for sourdough fermentation of amaranth. *International Journal of Food Microbiology*, 136(1), pp. 75-82.

Stikic, R., Glamoclija, D., Demin, M., Vucelic-Radovic, B., Javanovic, Z., Milojkovic-Opsenica, D., Jacobsen, S. E. & Milovanovic, M., 2012. Agronomical and nutritional evaluation of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) as an ingredient in bread formulations. *Journal of Cereal Science Volume*, 55(2), pp. 132-138.

Stolz, P., 1999. Mikrobiologie des Sauerteiges. In: *Handbuch Sauerteig: Biologie, Biochemie, Technologie*. Hamburg: Behr's Verlag, pp. 35-60.

Struyf, N., Laurent, J., Verspreet, J., Verstrepen, K. J. & Courtin, C. M., 2017. *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* Cocultures Allow Reduction of Fermentable Oligo-, Di-, and Monosaccharides and Polyols Levels in Whole Wheat Bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(39), pp. 8704-8713.

Suo, B., Chen, X. & Yexia, W., 2021. Recent research advances of lactic acid bacteria in sourdough: Origin, diversity, and function. *Current Opinion in Food Science*, Volume 37, pp. 66-75.

Sybesma, W., Starrenburg, M., Tijsseling, L., Hoefnagel, M. H. N. & Hugenholtz, J., 2003. Effects of Cultivation Conditions on Folate Production by Lactic Acid Bacteria. *Food Microbiology*, 69(4), p. 4542-4548.

Taranto, M. P., Vera, J. L., Hugenholtz, J., De Valdez, G. F., Sesma, F., 2003. *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produces cobalamin. *Journal of Bacteriology*, 185(18), pp. 5643-5647.

Thiele, C., Ganzle, M. G. & Vogel, R. F., 2002. Contribution of Sourdough Lactobacilli, Yeast, and Cereal Enzymes to the Generation of Amino Acids in Dough Relevant for Bread Flavor. *Cereal Chemistry*, 79(1), pp. 45-51.

Tieking, M. & Ganzle, M. G., 2005. Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1), pp. 79-84.

Titta, L., 2016. Protective Smartfood. In: E. Liotta, a cura di *La dieta smartfood*. Milano: Rizzoli, pp. 121-190.

Tomassini, A., Not, T. & Ventura, A., 2011. Ages of celiac disease: From changing environment to improved diagnostics. *World Journal of Gastroenterology*, 17(32), pp. 3665-3671.

Tom, B., Dendorfer, A. & Danser, A. H., 2003. Bradykinin, angiotensin-(1-7), and ACE inhibitors: how do they interact?. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 35(6), pp. 792-801.

Torino, M. I., Limon, R. I., Martinez-Villaluenga, C., Markinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C. & Frias, J., 2013. Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. 136(2), pp. 1030-1037.

Torino, M. I., Font de Valdez, G. & Mozzi, F., 2015. Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, Volume 6, p. 834.

Tovar, L. E. R., 2020. *Degradation of Wheat Germ Agglutinin and Amylase-Trypsin Inhibitors During Sourdough Fermentation*. University of Alberta: s.n.

Turk, M., Carlsson, N. G. & Sandberg, A. S., 1996. Reduction in the levels of phytate during wholemeal bread making; Effect of yeast and wheat phytases. *Journal of Cereal Science*, Volume 23, pp. 257-264.

Turk, M., Carlsson, N. G. & Sandberg, A. S., 1996. Reduction in the Levels of Phytate During Wholemeal Bread Making; Effect of Yeast and Wheat Phytases. *Journal of Cereal Science*, Volume 23, pp. 257-264.

Turk, M., Sandberg, A. S., Carlsson, N. G. & Andlid, T., 2000. Inositol hexaphosphate hydrolysis by baker's yeast. Capacity, kinetics, and degradation products. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, Volume 48, pp. 100-104.

Van Craeyveld, V., Swennen, K., Dornez, E. & Van de Wiele, T., 2008. Structurally Different Wheat-Derived Arabinoxyloligosaccharides Have Different Prebiotic and Fermentation Properties in Rats. *The Journal of Nutrition*, 138(12), pp. 2348-2355.

Van Hung, P., 2016. Phenolic Compounds of Cereals and Their Antioxidant Capacity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(1), pp. 25-35.

Varjú, P., Farkas, N., Hegyi, P., Garami, A., Szabo, I., Illés, A., Solymar, M., Vincze, A., Balasko, M., Par, G., Bajor, J., Szucs, A., Huszar, O., Pecsí, D. & Czimmer, J., 2017. Low fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides and polyols (FODMAP) diet improves symptoms in adults suffering from irritable bowel syndrome (IBS) compared to standard IBS diet: A meta-analysis of clinical studies. *PLoS One*, 12(8), p. e0182942.

Vermeulen, N., Ganzle, M. G. & Vogel, R. F., 2007. Glutamine deamidation by cereal-associated lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), pp. 1197-2205.

Würsch, P. & Pi-Sunyer, F. X., 1997. The role of viscous soluble fiber in the metabolic control of diabetes. A review with special emphasis on cereals rich in beta-glucan. *Diabetes Care*, 20(11), pp. 1774-80.

Wang, T., He, F. & Chen, G., 2014. Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. *Journal of Functional Foods*, Volume 7, pp. 101-111.

Wannermark, B. & Jägerstad, M., 1992. Breadmaking and Storage of Various Wheat Fractions Affect Vitamin E. *Journal of Food Science*, 57(5), pp. 1205-1209.

Wehrle, K., Grau, H. & Arendt, E. K., 1977. Effects of lactic acid, acetic acid, and table salt on fundamental rheological properties of wheat dough. *Cereal Chemistry*, 74(6), pp. 739-744.

Xu, D., Zhang, H., Xi, J., Jin, Y., Chen, Y., Guo, L., Jin, Z. & Xu, X., 2020. Improving bread aroma using low-temperature sourdough fermentation. *Food Bioscience*, Volume 37, p. Article 100704.

Zalan, Z., Hegyi, F., Szabo, E., Maczo, A., Baka, E., Du, M., Liao, Y. & Jian-quan, K., 2015. Bran fermentation with lactobacillus strains to develop a functional ingredient for sourdough production. *International Journal of Nutrition and Food Science*, Volume 4, pp. 409-419.

Zannini, E., Garofalo, C. & Clementi, F., 2010. I prodotti dolciari lievitati italiani. In: M. Gobbettti & A. Corsetti, a cura di *Biotechnologia dei prodotti lievitati da forno*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana, pp. 247-251.

Zannini, E. & Arendt, E. K., 2018. Low FODMAPs and gluten-free foods for irritable bowel syndrome T treatment: Lights and shadows. *Food Research International*, Volume 110, pp. 33-41.

Zevallos, V., Raker, V., Tenzer, S., Jimenez-Calvente, C., Ashfaq-Khan, M., Rüssel, N., Pickert, G., Schild, H., Steinbrink, K. & Schuppan, D., 2017. Nutritional Wheat Amylase-Trypsin Inhibitors Promote Intestinal Inflammation via Activation of Myeloid Cells. *Gastroenterology*, 152(5), pp. 1100-1113.

Zhao, C. J., Hu, Y., Schieber, A. & Ganzle, M., 2013. Fate of ACE-inhibitory peptides during the bread-making process: Quantification of peptides in sourdough, bread crumb, steamed bread and soda crackers. *Journal of Cereal Science*, 57(3), pp. 514-519.

Zhao, C. L., Kinner, M., Wismer, W. & Ganzle, M., 2015. Effect of Glutamate Accumulation During Sourdough Fermentation with *Lactobacillus reuteri* on the Taste of Bread and Sodium-Reduced Bread. *Cereal Chemistry*, 92(2), pp. 224-230.

Zhao, C. J. & Ganzle, M., 2016. Synthesis of Taste-Active γ -Glutamyl Dipeptides during Sourdough Fermentation by *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(40), pp. 7561-7568.

Zhao, C. J., Schieber, A. & Ganzle, M. G., 2016. Formation of taste-active amino acids, amino acid derivatives and peptides in food fermentations - A review. *Food Research International*, Volume 89, pp. 39-47.

Ziegler, J., Steiner, D., Longin, F. C. H., Würschum, T., Schweiggert, R. M. & Reinhold, C., 2016. Wheat and the irritable bowel syndrome – FODMAP levels of modern and ancient species and their retention during bread making. *Journal of Functional Foods*, Volume 25, pp. 257-266.

Zielinski, H., Ciesarova, Z., Kukurova, K., Zielinska, D., Szawara-Nowak, D., Starowicz, M. & Wronkowska, M., 2017. Effect of fermented and unfermented buckwheat flour on functional properties of gluten-free muffins. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), p. 1425–1432.

RINGRAZIAMENTI

Questa Tesi di Laurea chiude un percorso formativo lungo e tortuoso, ma che è stato fondamentale per capire chi sono e cosa voglio. Per questo, ringrazio tutte le persone che hanno contribuito alla mia crescita personale, spirituale e culturale, in un elenco non esaustivo e con ordine casuale: John Lasseter, P. Francesco Cordeschi, i mister Luca Rocchi e Marcello Grassetti, i maestri Antonio Ciccotelli e Antonio Riccobelli, la Prof.ssa Maria Antonelli, i gruppi hipster, indie, rock, punk, elettro e pop, Alessandro Baricco e Charles Bukowski, John Terry e Paolo Cannavaro, Frank Merenda, Dario Bressanini, Beppe Severgnini, Gianfranco Lo Cascio, Roberto Re e Andrea Giuliodori.

Vorrei ringraziare anche Gabriele Bonci e i Panificatori Agricoli Urbani, per la rivoluzione del pane che stanno portando avanti, facendone riscoprire le essenze primordiali e al tempo stesso quelle avveniristiche. E Gabriele Raimondi, Simona Lauri, Franco Antoniazzi, Marco Gobetti, Aldo Corsetti, Carlo Giuseppe Rizzello e tutti i ricercatori che hanno studiato e svelato al mondo i segreti dell'arte bianca.

Ringrazio Slow Food, in particolare la Condotta di Civitanova Marche, per l'impegno nel valorizzare le aziende agro-alimentari locali e i loro prodotti tradizionali, contribuendo alla diffusione della cultura del cibo buono, genuino e sostenibile.

Ringrazio anche Azione Universitaria Ancona, per avermi fatto mettere in gioco e per la possibilità di rappresentare gli studenti dell'UnivPM e del mio dipartimento.

Un sentito ringraziamento al Prof. Massimo Mozzon, per avermi insegnato a guardare il cibo con approccio scientifico e non ideologico. E alla Prof.ssa Lucia Aquilanti, per avermi introdotto nel magnifico mondo della microbiologia dei lievitati. Ringrazio, infine, la Dott.ssa Federica Cardinali, per il prezioso aiuto nella stesura di questa Tesi.

Ringrazio tutti coloro che mi hanno accompagnato nel mio percorso scolastico, prima compagni di banco e poi amici, sia del Liceo che dell'UnivPM. Ringrazio "Quelli del '93", "Buttiamo su" e il "gruzzo Zero", per le incredibili esperienze vissute insieme e per il sostegno nei miei momenti bui.

Ringrazio eternamente mio nonno, Rosa, Memino e Lisa, per l'eredità di amore e dedizione, e mio padre, mia madre e mia sorella, per questa e altre innumerevoli opportunità che mi hanno concesso, per essere il posto sicuro al quale tornare, sempre.

Ringrazio, infinitamente, Clarissa, per avermi tenuto per mano in questi anni, guidandomi, affiancandomi e seguendomi, e per avermi dato la certezza di voler proseguire il mio viaggio, con lei.

Sempre grato,

Marco