



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA  
Scienze Agrarie



Curriculum Biotecnologie Microbiche Agroalimentari

Ciclo XXX

*STUDIO DELL'INFLUENZA DI INGREDIENTI ALTERNATIVI  
UTILIZZATI NEL PASSATO PER IL MIGLIORAMENTO QUALITATIVO DEI  
PRODOTTI GLUTEN-FREE*

Dr.ssa Angela Scanu

<i>Coordinatore del Corso</i>	Prof. Antonello Cannas
<i>Referente di Curriculum</i>	Dott. Severino Zara
<i>Docente Guida</i>	Prof. Antonio Piga
<i>Docente Tutor</i>	Dott. Costantino Fadda

Anno accademico 2016- 2017



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI**  
**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA**  
**Scienze Agrarie**



Curriculum Biotecnologie Microbiche Agroalimentari

Ciclo XXX

*STUDIO DELL'INFLUENZA DI INGREDIENTI ALTERNATIVI  
UTILIZZATI NEL PASSATO PER IL MIGLIORAMENTO QUALITATIVO DEI  
PRODOTTI GLUTEN-FREE*

Dr.ssa Angela Scanu

<i>Coordinatore del Corso</i>	Prof. Antonello Cannas
<i>Referente di Curriculum</i>	Dott. Severino Zara
<i>Docente Guida</i>	Prof. Antonio Piga
<i>Docente Tutor</i>	Dott. Costantino Fadda

Anno accademico 2016- 2017

# INDICE

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	1
1.1 La storia della celiachia	1
1.2 La malattia celiaca	2
1.2.1 Definizione e cause	2
1.2.2 La prevalenza della celiachia	3
1.2.3 Le diverse manifestazioni della celiachia	4
1.3 La diagnosi	9
1.3.1 Test sierologici	9
1.3.2 Biopsia	10
1.3.3 Screening genetico	10
1.3.4 La diagnosi di celiachia in Italia	11
1.3.5 La celiachia in Sardegna	11
1.4 La terapia	12
1.4.1 La dieta	12
1.4.2 La modificazione del glutine	13
1.5 L'etichettatura degli alimenti senza glutine	13
1.5.1 La Spiga barrata	15
1.6 Il mercato del <i>gluten-free</i>	15
1.7 Il ruolo del glutine negli impasti	16
1.8 I difetti dei prodotti da forno senza glutine	18
1.9 Gli ingredienti tradizionali	19
1.9.1 Le farine e gli amidi convenzionali	19
1.9.1.1 La farina di riso	19
1.9.1.2 La farina di mais	20
1.10 Le farine e gli amidi alternativi	20
1.10.1 La farina di sorgo	20
1.10.2 Il miglio e il teff	21
1.10.3 L'avena	21
1.10.4 Gli pseudo cereali	22

1.11 Ingredienti per il miglioramento nutrizionale e l'attività biologica	24
1.11.1 La fibra alimentare e gli ingredienti funzionali	25
1.11.2 I micronutrienti	26
1.11.3 Ingredienti derivati da frutta e verdura	27
1.12 Additivi per il miglioramento degli impasti e del pane	28
1.12.1 Gli idrocolloidi	28
1.12.2 Le proteine	29
1.12.3 Gli enzimi	30
1.12.4 Gli emulsionanti	32
1.13 Tecnologie per il miglioramento della qualità e della <i>shelf-life</i>	33
1.13.1 La lievitazione naturale	33
1.13.2 Processi ad alta pressione	34
1.13.3 Dimensioni delle particelle della farina	35
1.13.4 Tempo di germinazione	36
1.13.5 Tecnologie per il miglioramento della <i>shelf-life</i>	38
1.14 Indice glicemico	39
1.14.1 Indice glicemico del pane senza glutine	40
1.15 Il miele	41
1.15.1 Definizione	41
1.15.2 Composizione chimica	41
1.15.2.1 Componenti primari	41
1.15.2.2 Componenti secondari	43
CAPITOLO 2: SCOPO DEL LAVORO	46
CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI	48
3.1 Materie prime utilizzate	48
3.2 Processo di panificazione	50
3.3 Codifica dei campioni	50
3.4 Analisi sugli impasti	51
3.4.1 Monitoraggio del tempo di fermentazione	51
3.4.2 Misurazione del pH pre e post fermentazione	51

3.5	Analisi sul pane fresco	51
3.5.1	Volume specifico	51
3.5.2	Determinazione dei parametri colorimetrici e dell'indice di imbrunimento della crosta e della mollica	52
3.5.3	Attività dell'acqua	52
3.5.4	Contenuto di umidità	53
3.6	Analisi reologiche empirico-imitative sugli impasti	53
3.6.1	Determinazione delle proprietà viscosimetriche degli impasti tramite RVA	53
3.7	Analisi reologiche sul pane fresco	54
3.7.1	<i>Puncture test</i> (Test di penetrazione)	54
3.7.2	TPA ( <i>Texture profile analysis</i> )	55
3.8	Analisi dell'immagine della mollica	56
3.9	Determinazione delle frazioni polifenoliche nel pane fresco	56
3.9.1	Determinazione del contenuto di polifenoli totali	56
3.9.2	Determinazione della frazione solubile	57
3.9.3	Determinazione della frazione insolubile	57
3.9.4	Determinazione della frazione bio-accessibile	58
3.10	Analisi sensoriale	59
3.11	Analisi statistica	59
CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONI		61
4.1	Analisi sugli impasti	61
4.1.1	Monitoraggio del tempo di fermentazione	61
4.1.2	Misurazione del pH pre e post fermentazione	63
4.2	Analisi sul pane fresco	67
4.2.1	Volume specifico	67
4.2.2	Determinazione dei parametri colorimetrici e dell'indice di imbrunimento della crosta e della mollica	70
4.2.3	Attività dell'acqua ( $a_w$ )	77
4.2.4	Contenuto di umidità	79
4.3	Analisi reologiche sugli impasti	81
4.3.1	Determinazione delle proprietà viscosimetriche degli	81

impasti tramite RVA	
4.4 Analisi reologiche empirico-imitative sul pane fresco	83
4.4.1 <i>Puncture test</i> (Test di penetrazione)	83
4.4.2 TPA ( <i>Texture profile analysis</i> )	84
4.5 Analisi dell'immagine della mollica	87
4.6 Determinazione delle frazioni polifenoliche del pane fresco	90
4.6.1 Determinazione del contenuto di polifenoli totali	90
4.6.2 Determinazione della frazione solubile, insolubile e bio-accessibile	93
4.7 Analisi sensoriale	98
CAPITOLO 5: CONCLUSIONI	104
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	105

# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1 La storia della celiachia

La storia della celiachia ha inizio 10.000 anni fa quando fu introdotta la coltivazione dei cereali nella zona della “Mezza Luna Fertile” (Iran, Iraq, Siria e Israele), che successivamente si estese anche in Europa. L’introduzione del grano nell’alimentazione di queste popolazioni mise in evidenza che una significativa percentuale di individui non era in grado di tollerare questo tipo di alimento, in quanto possedeva un gruppo genetico che non riusciva a riconoscere il frumento come una proteina che poteva essere “tollerata”, ma lo considerava come un antigene nemico da cui era necessario difendersi innescando una risposta immunitaria che provoca l’atrofia dei villi della mucosa (morbo celiaco). Il primo medico che segnalò la malattia celiaca nell’adulto fu Areteo di Cappadocia nel secondo secolo dopo Cristo; egli riportò di una particolare sindrome da malassorbimento con diarrea cronica descritta da un medico greco, i segni clinici di una malattia intestinale lunga e molto difficile da curare, riferendosi ai suoi pazienti con il termine *koliakos*, che sta ad indicare “sofferenti nelle viscere”. Degli studi effettuati da Areteo sulla celiachia, esistono testimonianze da parte di medici italiani (Macrì, 1805) e inglesi, tra il XVIII ed il XIX secolo (Baillie, 1793). Un certo dottor Mathew Baillie, non allineato di Areteo, pubblicò le sue osservazioni in merito ad un disturbo diarroico degli adulti caratterizzato da malnutrizione e gonfiore addominale; Baillie suggerì un trattamento dietetico e scrisse “Alcuni pazienti sembrano sortire effetti vantaggiosi nel vivere solo nutrendosi quasi di solo riso”. Tuttavia, le considerazioni di Baillie non hanno avuto credito e sono quindi passate inosservate. Nel primo secolo dopo Cristo, il medico latino Celso introdusse il termine “celiaco” per indicare una malattia diarroica. Nel 1856, Francis Adams tradusse questo termine dal greco all’inglese, coniando l’espressione “celiaci”. Qualche anno più tardi, nel 1888 Samuel Gee, invece, fu il primo medico pediatra a identificare la celiachia nel bambino, spiegando il quadro della forma tipica stabilendo la connessione tra la dieta e la “diatesi celiaca”. Il merito principale di Samuel Gee fu quello di aver capito che la causa della malattia celiaca andava ricercata in un alimento, che tuttavia, non riuscì ad identificare. Successivamente, diversi altri medici descrissero la patologia conferendole diversi nomi.

---

Angela Scanu– Studio dell’influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum “*Biotecnologie microbiche agroalimentari*” – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

Alcune teorie suggeriscono che la celiachia si sia manifestata nell'uomo quando esso passò da una dieta a base di carne e frutta secca ad una a base di cereali ad alto contenuto proteico come il grano. Tuttavia è solo negli ultimi 50 anni che i ricercatori hanno avuto modo di conoscere meglio le sue cause e come trattarla. Oggi sappiamo che la celiachia è un'intolleranza al glutine e, in particolare, ad alcune sue componenti proteiche chiamate gliadine ed i celiaci reagiscono all'introduzione del frumento, del farro, dell'avena, della segale, del kamut, dell'orzo e del triticale. Non è da dimenticare che piccole quantità di glutine sono presenti anche in alcuni farmaci e nell'ostia dell'Eucarestia (Carcioni, 2011).

## **1.2 La malattia celiaca**

### **1.2.1 Definizione e cause**

La malattia celiaca è una malattia autoimmune su base genetica, dovuta all'intolleranza al glutine, che perdura per tutta la vita dell'individuo colpito. Il termine glutine si riferisce alle prolamine del grano (gliadina), della segale (secalina) e dell'orzo (ordeina), le quali risultano solubili in etanolo.

La patogenesi della celiachia coinvolge interazioni tra la predisposizione genetica agli antigeni leucocitari umani HLA-DQ2 e HLA-DQ8, l'esposizione ambientale e l'assunzione di glutine attraverso l'alimentazione e la risposta immunologica che porta alle tipiche lesioni della mucosa dell'intestino tenue, accompagnata dalla perdita della capacità di assorbimento da parte dei villi intestinali, con iperplasia delle cripte, e conseguente cattiva digestione e malassorbimento dei nutrienti, fattori tutti che si ripercuotono sull'intero organismo (Kagnoff, 2005).

La composizione amminoacidica di queste prolamine, caratterizzata anche dalla presenza di residui di glutamine e proline multiple, provoca la loro resistenza alla digestione proteolitica da parte degli esseri umani, pertanto la digestione incompleta delle prolamine porta all'accumulo dei peptidi glutinici nell'intestino tenue; l'incompleta digestione fa sì che i peptidi glutinici nell'intestino tenue attraversino l'epitelio penetrando la lamina propria. Una volta all'interno, i residui glutaminici dei peptidi glutinici possono essere deamminati dalla transglutaminasi tissutale (TG). Le cellule presentanti l'antigene esprimono le molecole HLA-DQ2 e HLA-DQ8, le quali mostrano affinità maggiore verso i peptidi deamminati; attraverso una sequenza di eventi le cellule presentanti gli antigeni legano i peptidi deamminati e li presentano a speciali cellule T

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari



CD4<sup>+</sup> glutine-specifiche, le quali vengono attivate per indirizzare una risposta immunologica, portando alle lesioni tipiche della mucosa dell'intestino tenue (Kagnoff, 2005; Briani et al., 2008).

Altre cause scatenanti la malattia, sono le infezioni virali, la prematura cessazione dell'allattamento al seno ed il genere. L'introduzione del glutine nel primo anno di vita e l'esposizione ad agenti infettivi, svolgono un ruolo chiave nello sviluppo della celiachia. Da alcuni studi è emerso come virus quali Adenovirus di tipo 12 (Lähdeaho et al., 1993; Kagnoff et al., 1984), epatite C (Sjöberg et al., 1997) e virus enterici (Carlsson et al., 2002), possano comportarsi da inneschi nell'insorgenza della MC. La risposta immunologica negli individui geneticamente predisposti potrebbe essere causata da una sequenza virale di 8-12 amminoacidi, condivisa con la gliadina tossica; l'epoca di insorgenza della celiachia e la prematura cessazione dell'allattamento al seno possono determinare lo scatenarsi della malattia (Ivarsson et al., 2000). Inoltre, vengono considerati fattori innescenti il sovraccarico di glutine, interventi di chirurgia gastrica e l'interruzione del fumo di sigaretta (Farrell & Kelly, 2002).

### **1.2.2 La prevalenza della celiachia**

La prevalenza della malattia celiaca (MC) è stata valutata nella popolazione generale (Alarida et al., 2011; Catassi et al., 1999). In Europa, secondo un recente studio che ha preso in esame quattro diversi Paesi, la prevalenza media della celiachia, risulta pare all'1%, con variazioni tra Paesi (0.3% in Germania, 0.9% nell'Irlanda del Nord, 1.2% in Italia e 2% in Finlandia) (Mustalahti et al., 2010). Sebbene il consumo di frumento e le frequenze dell'aplotipo HLA siano paragonabili, la prevalenza della MC cambia probabilmente come conseguenza di differenti fattori genetici (Lionetti & Catassi, 2014). Risultati simili a quelli osservati in Europa sono stati riportati anche per la popolazione statunitense (0.7%) (Fasano et al., 2003); per quanto riguarda le popolazioni sviluppate di origine europea, la prevalenza è dello 0.4% in Australia e dell'1.1% in Nuova Zelanda. In Brasile, abitato in misura maggiore da popolazioni di origine europea, è stato osservato su soggetti donatori di sangue come la prevalenza della MC vari da 1:681 (Gandolfi et al., 2000) a 1:214 (Oliveira et al., 2007). Tuttavia, questo studio sottostima la malattia, in quanto questi soggetti rappresentano una porzione sana della popolazione, che interessa soggetti prevalentemente di sesso maschile, considerando il fatto che la malattia colpisce

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

maggiormente il sesso femminile (Shah & Leffler, 2010). Per quanto riguarda i bambini in età scolare, la prevalenza è pari allo 0.5% (Gomez et al., 2001). Nei Paesi occidentali la prevalenza della malattia celiaca è in forte aumento, e in modo particolare in età pediatrica (White et al., 2013). Le ragioni dell'incremento generale della prevalenza non sono del tutto definite, ma sono correlate a fattori di tipo ambientale (variazioni nella quantità e nella qualità del glutine ingerito, tipologie di alimenti per bambini, possibili infezioni a carico dell'intestino). L'allattamento al seno, secondo uno studio, ricopre un ruolo protettivo nei confronti dei bambini (Akobeng et al., 2006), sebbene altri studi non supportino tale teoria (Størdal et al., 2013). In generale, nei paesi sviluppati per ogni caso di celiachia diagnosticato, altri 5 non lo sono, perché generalmente atipici o privi di sintomi (Catassi, Gatti, & Fasano, 2014). La più alta prevalenza della celiachia nel mondo è stata registrata in una popolazione africana originaria del Saharawi caratterizzata da occhi e capelli neri; nei bambini saharawani la prevalenza è del 5.6% (Catassi et al., 1999); la motivazione di un dato così importante è riconducibile in primo luogo a fattori genetici dovuti all'elevata consanguineità di questo popolo; infatti, i genotipi HLA-DQ2 e -DQ8 sono molto comuni nel Saharawi (Catassi et al., 2001), in secondo luogo l'assunzione di glutine risulta essere molto elevata, in quanto la farina di frumento costituisce l'alimento base di questo popolo. Nel Saharawi la celiachia viene reputata una malattia molto grave, caratterizzata da sintomatologia intestinale, anemia, arresto della crescita e da un tasso di mortalità in aumento. Nei Paesi del Nord Africa la malattia è molto comune tra gli abitanti, con una prevalenza dello 0.5% in Egitto, 0.6% in Tunisia e dello 0.8% in Libia.

Anche in Medio-Oriente e lungo la Via della Seta la celiachia è particolarmente presente (Akbari et al., 2006). In Israele la prevalenza è molto elevata: 1.1% quella basata sui test sierologici, mentre il rapporto tra la forma conclamata e silente è di 1:8.

### **1.2.3 Le diverse manifestazioni della celiachia**

- Classica o tipica: è la forma che può insorgere in qualunque periodo dell'età pediatrica, ma si manifesta solitamente tra i 6 ed i 18 mesi di vita del bambino, dopo l'introduzione di glutine nella dieta e i sintomi si verificano entro poche settimane o mesi dalla sua introduzione; sindrome da malassorbimento, con

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

diarrea cronica, dimagrimento, vomito e addome globoso e mancata crescita (Fasano & Catassi, 2001).

- Negli ultimi anni si è assistito ad un progressivo ritardo nell'esordio delle manifestazioni cliniche della celiachia in età scolare, probabilmente dovuto al fatto che questo modo di manifestarsi della malattia, oggi si riscontra con meno frequenza rispetto al passato, presumibilmente perché la tendenza a inserire alimenti contenenti glutine nel lattante dopo il 6° mese di vita ha modificato e attenuato le avvisaglie, sintomo di esordio della malattia. Oggi si riscontrano forme cliniche di malattia celiaca più attenuate o sfumate rispetto alla forma classica o forme cosiddette "atipiche". Questi bambini presentano sintomi intestinali, come dolori addominali ricorrenti, stipsi oppure sintomi extraintestinali, come bassa statura, ritardo puberale, astenia, inappetenza, alopecia, stomatite aftosa, osteoporosi, difetti dello smalto dentario, aumento delle transaminasi, miocardite autoimmune. Sono state registrate anche forme lievi di anomalie epatiche, ma in alcuni casi, seppur infrequenti ma gravi, che migliorano con la dieta senza glutine. Si è assistito, inoltre, in età pediatrica, a diversi disturbi neurologici e psichiatrici, come epilessia, atassia, ipotonia, ritardo mentale, disturbi dell'apprendimento, deficit di attenzione, emicrania associati alla celiachia (Zelnik et al., 2004). Per quanto concerne l'autismo, non è mai stata dimostrata l'associazione tra celiachia e forme autistiche. La dermatite erpetiforme, una malattia vescicolare della pelle, è una variante clinica della celiachia, la cui incidenza in età pediatrica, è pari all'1%. Altre patologie connesse alla celiachia sono la Tiroidite autoimmune, il diabete di tipo 1, l'epatopatia autoimmune, la sindrome di Down e la sindrome di Turner.
- Atipica: è una forma caratterizzata dall'assenza o da pochi sintomi gastrointestinali, ma di sintomi atipici, quali:
  - Dermatite erpetiforme: (definita spesso come celiachia cutanea), caratterizzata da rash cutaneo in corrispondenza delle ginocchia, dei gomiti e dei glutei.
  - Carenza di ferro (con o senza anemia): può talvolta rappresentare l'unico sintomo della malattia.

- Bassa statura: in molti casi viene evidenziato come l'unico sintomo in molti bambini e adolescenti affetti da celiachia. Alcuni pazienti presentano anche un'alterazione nella produzione di GFH.
- Ipoplasia dello smalto dentale.
- Epatite cronica e ipertransaminasemia.
- Osteoporosi: i pazienti celiaci hanno frequentemente una bassa densità minerale ossea, mentre i soggetti adulti sottoposti a terapia, con patologia in remissione, sembrano presentare struttura ossea analoga a quella di soggetti sani.
- Problemi neurologici: sono frequentemente associati a individui affetti da celiachia.
- Problemi di tipo ormonale: sterilità e problemi della riproduzione: abortività ripetuta in adolescenti (Fasano & Catassi, 2001). Sembrerebbe, infatti, che le donne affette da celiachia abbiano un rischio di 8-9 volte superiore rispetto alle donne sane di incorrere in aborti spontanei (Ciacci et al., 1996). Molte delle manifestazioni cliniche atipiche evidenziate, presentano comunque remissione a seguito della somministrazione di una dieta priva di glutine (Fasano & Catassi, 2001). La forma atipica risulta la più diffusa tra le varie forme di celiachia.
- Silente: la MC non si presenta con sintomatologia particolare: è presente ma è come se si “nascondesse”. La mucosa intestinale è, infatti, danneggiata analogamente alla forma tipica e atipica di celiachia. È da sottolineare il fatto, inoltre, che circa il 15% dei parenti asintomatici di individui celiaci mostra atrofia dei villi intestinali. Essa spesso si manifesta in bambini affetti da diabete di tipo 1 e nei parenti o fratelli di soggetti celiaci (Iwańczak et al., 2013). La celiachia silente non è quindi una forma da sottovalutare, in quanto, non manifestando sintomi, è difficilmente diagnosticabile.
- Latente, con 2 categorie: la forma latente di celiachia caratterizza quei soggetti che hanno una predisposizione alla celiachia (positività agli anticorpi anti-gliadina AGA ed agli anticorpi anti-endomisio EMA) ma al momento hanno una mucosa intestinale normale, che non presenta quindi atrofia dei villi intestinali (prima

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum “Biotecnologie microbiche agroalimentari”* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

categoria); della seconda categoria fanno parte gli individui che seguono una dieta contenente anche glutine, e che svilupperanno successivamente la malattia (Admou et al., 2012).

Non si pensi che in questo caso la celiachia non esista; non si è manifestata al momento, ma non è detto che col passare del tempo ciò non si verifichi: è opportuno, quindi, effettuare monitoraggi nel tempo. I soggetti affetti da celiachia latente possono manifestare lesioni della mucosa intestinale in alcuni periodi mentre presentare mucosa normale in altri. La cosiddetta slatentizzazione della malattia, ossia il suo divenire manifesta, pare possa avvenire anche in seguito a situazioni particolari come momenti di forte stress, lutti, parto, o infezione da rotavirus (un comune virus intestinale). Controlli costanti sono quindi d'obbligo per mantenere un buon stato di salute.

- **Potenziale:** La malattia potenziale celiaca (PCD) è diagnosticata quando un paziente ha un numero abnorme di anticorpi anti IgA e anti endomisio (EMA) sui test di screening del sangue (i 2 principali anticorpi celiaci) ma la biopsia sulla mucosa intestinale risulta negativa. La PCD si presenta spesso quando si esaminano le persone a rischio elevato di malattia celiaca, come i parenti di primo grado di persone celiache, diabetici di tipo 1 e/o pazienti con altre malattie autoimmuni. Molti pazienti con PCD non hanno sintomi e non accusano malessere all'ingestione di alimenti contenenti glutine. È essenziale che lo screening sia eseguito quando il paziente continui a seguire una dieta contenente glutine; infatti se l'individuo sta osservando una dieta priva di glutine, risulta difficoltoso avanzare una diagnosi definitiva (Sito 1).
- A “macchia di leopardo” o “a salto”: l'atrofia dei villi che si verifica nella celiachia può manifestarsi “a macchia di leopardo” o “a salto”, in quanto le lesioni sono focali e non omogenee su tutta la superficie dell'intestino. Le lesioni “a macchia di leopardo” non significano che la malattia non sia presente, anzi. Non riscontrare lesioni in contesti clinici specifici (risposta anticorpale positiva, eventualmente sintomi suggestivi), non mette in discussione la diagnosi, ma autorizza il medico ad inserire questa particolare forma celiaca, all'interno di quella potenziale (Sito 2);

- Refrattaria: per celiachia refrattaria si intende un insieme di sintomi persistenti o ricorrenti di malassorbimento e segni di atrofia villosa, malgrado una dieta priva di glutine seguita per più di 12 mesi (Ludvigsson et al., 2013).

Questa condizione potrebbe derivare da:

- Incompleta esclusione del glutine dalla dieta: circa il 45% dei pazienti non risponde alla dieta priva di glutine, e, metà di questi casi per ingestione involontaria del glutine (Dewar et al., 2012);
- Sensibilità differenziale al glutine: la maggior parte dei pazienti è in grado di tollerare piccole quantità di glutine (10-20 ppm), presenti in alcuni alimenti, mentre altri dovrebbero totalmente escluderli a causa di una spiccata suscettibilità degli alleli HLA presenti (Al Toma et al., 2006a) o mutazioni conosciute (Wolters et al., 2007);
- Sintomi non correlati al glutine: la presentazione sintomatica della malattia celiaca è vasta e coincide a quelle di altre condizioni, come ad esempio il gonfiore e il dolore addominale, possono essere dovuti alla sindrome dell'intestino irritabile (Sanders et al., 2001) e la diarrea potrebbe essere causata dal malassorbimento dei sali biliari e non essere influenzata dal ritiro del glutine. La malattia celiaca può essere completamente asintomatica e diagnosticata solo a seguito di sintomi dovuti ad altre condizioni. Condizioni associate: alcuni pazienti celiaci sono anche colpiti da altre patologie autoimmuni che non rispondono all'eliminazione del glutine (ad esempio, la malattia di Addison che può manifestarsi con stanchezza, diarrea e perdita di peso) (Elfstrom et al., 2007) o la gastrite autoimmune con conseguente carenza di ferro e di vitamina B<sub>12</sub> (Dickey, 2002);
- Diagnosi scorretta di celiachia: la diagnosi della celiachia talvolta è difficoltosa e spesso può essere condotta erroneamente in un importante numero di casi (Biagi et al., 2009); ad esempio la duodenosi linfocitica e lievi gradi di atrofia villosa possono essere osservati in svariate condizioni, infezioni, malattie intestinali infiammatorie e reazioni farmacologiche, soprattutto con farmaci antiinfiammatori non steroidei (FANS) (Memeo et al., 2005);
- Cause secondarie dei sintomi: la celiachia è frequentemente associata con l'intolleranza al lattosio, che persiste nonostante il recupero dei villi (Leffler et al., 2007).

### 1.3 La diagnosi

La diagnosi della celiachia può avvenire attraverso i test di screening sierologico e istologico; il primo risulta fondamentale nella diagnosi della celiachia, il secondo è raccomandato in pazienti che seguono una dieta senza glutine. È importante eseguire i test per la celiachia quando si presentano le seguenti condizioni:

1. Stato evidente di malassorbimento (diarrea cronica, perdita di peso, dolore addominale post-prandiale e gonfiore);
2. Pazienti con parenti di primo grado affetti da celiachia conclamata;
3. Pazienti asintomatici con almeno un membro della famiglia affetto da celiachia.

#### 1.3.1 Test sierologici

La diagnosi sierologica dipende dalla presenza di specifici anticorpi:

- EMA<sub>s</sub> (anticorpi anti-endomisio)
- IgA-TG2 (anticorpi anti-transglutaminasi)
- DGP (anticorpi anti-gliadina deamidata) (Ludvigsson et al., 2013).

La ricerca delle IgA-TG2 è raccomandata in pazienti con una deficienza di IGA conclamata (Dahlbom et al., 2005; Rashtak et al., 2008). Di recente l'ESPGHAN (*European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*) ha proposto delle nuove linee per la diagnosi della celiachia in età pediatrica, le quali evitano la biopsia come tecnica di conferma alla malattia. Esse suggeriscono che in pazienti in età pediatrica caratterizzati da un livello di IgA-TG2 10 volte superiore alla norma, in cui gli anticorpi anti-endomisio sono positivi su un campione di sangue prelevato separatamente, e con HLA-DQ<sub>2</sub> o HLA-DQ<sub>8</sub> positivi, la biopsia non risulta indispensabile per la conferma della diagnosi in bambini al di sotto dei 2 anni di vita (Hill & Holmes, 2008).

Nello specifico, la ricerca delle IgA è da prediligere come test singolo per la diagnosi della celiachia nei bambini al di sotto dei 2 anni di età, quando esiste un'elevata probabilità di celiachia con possibilità di deficit di IgA. Le IgA totali devono essere comunque dosate, o in alternativa, è importante misurare sia le IgA che le IgG (IgG anti-gliadina deamidata, in soggetti a rischio), inoltre in pazienti con ridotto livello di IgA o deficienza selettiva di IgA, il test basato sulle IgG (IgG DGP<sub>s</sub> e IgG TTG) deve essere eseguito (Rubio-Tapia et al., 2013).

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

Altri gruppi a rischio per i quali è raccomandata l'indagine sierologica, sono:

- Familiari del celiaco (la frequenza tra i familiari è pari a circa il 10%)
- Soggetti affetti da altre malattie autoimmuni, specialmente il diabete di tipo 1 (5-10%), le malattie tiroidee autoimmuni (5%), l'epatite autoimmune e le malattie infiammatorie croniche intestinali
- Soggetti affetti da Sindrome di Down (5-10%), di Turner e di Williams (Sito 3).

### 1.3.2 Biopsia

L'esame biptico consiste nel prelievo di un campione del tessuto dal duodeno per essere sottoposto a indagine diagnostica (Sito 4). La biopsia duodenale andrebbe eseguita a prescindere dall'esecuzione di test sierologici, e su pazienti che introducono il glutine nel momento in cui il paziente presenta sintomatologia tipica da celiachia (sintomi intestinali, anemia, perdita di peso). L'atrofia dei villi può risultare talvolta irregolare nella celiachia, pertanto è consigliabile eseguire prelievi multipli, cioè in punti diversi del duodeno, in modo tale da evitare il problema delle lesioni a "macchia di leopardo" (70% dei casi) che possono portare a falsi positivi e negativi (Prasad et al., 2010).

### 1.3.3 Screening genetico

Oltre il 99% dei celiaci possiede copia di geni che codificano per almeno una delle varianti degli antigeni leucocitari umani HLA-DQ<sub>2</sub> e HLA-DQ<sub>8</sub>. Questi alleli sono stati osservati in circa il 30-35% della popolazione caucasica, e la maggior parte delle persone che possiedono queste varianti non sviluppano la malattia. Risultati negativi per l'HLA-DQ<sub>2</sub> e HLA-DQ<sub>8</sub> rendono l'insorgenza della malattia piuttosto improbabile in pazienti in cui l'esame biptico abbia fornito una diagnosi incerta. Una nuova variante dell'antigene HLA, l'HLA-G I, è stata descritta di recente e incrementa il rischio di sviluppo della malattia, insieme ad HLA-DQ<sub>2</sub> e HLA-DQ<sub>8</sub>. (Sito 5). Tuttavia, secondo uno studio condotto su 107.000 gemelli, i geni conosciuti spiegano solo il 60% dell'ereditarietà della malattia, in particolare, i geni HLA contribuiscono in misura del 40% all'ereditarietà della celiachia, mentre esistono loci non HLA che concorrono in misura meno significativa all'ereditarietà (6% aggiuntivo). La presenza del DQ2 e/o del DQ8 è un presupposto essenziale ma non sufficiente per lo sviluppo della celiachia, condizione supportata anche

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari



dal fatto che circa il 30-40% della popolazione generale possiede l'aplotipo DQ2, ma solo l'1% di essa sviluppa la celiachia. La rilevanza diagnostica dell'HLA risiede nella sua virtù predittiva negativa, considerato che la negatività per entrambi gli aplotipi rende certamente improbabile la diagnosi. Nella prassi diagnostica della celiachia la funzione primaria della tipizzazione HLA è l'esclusione della malattia celiaca, in modo particolare nei soggetti appartenenti a gruppi a rischio di sviluppo della malattia. L'esito negativo dell'indagine genetica, rendendo improbabile lo sviluppo della malattia, rende superfluo lo screening sierologico successivo (Sito 6).

### **1.3.4 La diagnosi di celiachia in Italia**

La celiachia viene solitamente rappresentata come la punta di un iceberg, in cui solamente una piccola parte affiora in superficie. La prevalenza (una misura di frequenza usata in medicina) della celiachia sulla popolazione italiana è dell'1% circa. Si stima, tuttavia, che circa 5 celiaci su 6 non vengano diagnosticati. Secondo la Relazione al Parlamento del Ministero della Salute edizione 2015, al 31/12/2015 il numero dei pazienti effettivamente diagnosticati era pari a 182.800, ma la prevalenza stimata di questa patologia è appunto l'1% della popolazione italiana, per cui risulta chiara la sottostima della celiachia. Il numero teorico totale dei celiaci sarebbe quindi di 600.000 persone circa, delle quali 435.500 (73% dei celiaci) del tutto inconsapevoli di essere celiache. Il rapporto stimato medio di soggetti celiaci MASCHI:FEMMINE è pari a circa 1:2, pertanto il numero atteso di donne celiache è pari a circa 400.000 contro le 116.000 donne ad oggi effettivamente diagnosticate e, di conseguenza, sono oltre 284.000 quelle che non hanno ancora ricevuto la loro diagnosi. In base ai dati più recenti (2014-2015) il numero di soggetti diagnosticati è salito del + 6.2%, con 11.000 nuovi casi nel solo anno 2015, confermando la tendenza verso l'alto della diagnosi del biennio precedente (Sito 7).

### **1.3.5 La celiachia in Sardegna**

La Sardegna detiene il secondo posto, insieme alla Valle d'Aosta e alla Provincia Autonoma di Trento, riguardo la prevalenza media di soggetti celiaci (0.37%).

Nel 2015 il numero di celiaci sardi era di 6.107 su 1.658.138 abitanti, pari a 0.33% della popolazione. Di questi 6.107, solo 1.477 erano maschi, mentre i restanti 4.630 erano femmine, con un rapporto uomo-donna di 1:3, a causa della natura autoimmune della

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

malattia, con una prevalenza nella popolazione femminile pari a 0.55 (Relazione annuale al Parlamento, 2015). Secondo quanto riportato da Maria Teresa Russo, presidente regionale dell'Aic Sardegna, nell'isola, dove le malattie immunitarie sono molto diffuse, si registra un'incidenza di 1/70 individui. I dati epidemiologici in possesso del Ministero della Salute segnalano che il 50% dei pazienti affetti da celiachia è affetta da osteoporosi, come ha spiegato in un'intervista il Prof. Antonio Capone, direttore della Clinica Ortopedica dell'ospedale Marino di Cagliari, il quale denuncia come la complicanza più grave dell'osteoporosi sia la frattura del femore che attualmente coinvolge più di 90.000 pazienti all'anno. La provincia sarda che sembra avere la maggiore incidenza è Sassari, con 2.462 celiaci accertati, in particolare se paragonata a Cagliari (1.943, ma con una popolazione decisamente più numerosa); Nuoro conta 1.401 affetti, Oristano 391 (Sito 8). Si stima che in Sardegna, su circa 20.000 celiaci, circa l'80% non sappia di esserlo. Sulla base dell'attuale sottostima della patologia, l'Assessorato Regionale alla Sanità ha avviato un processo di sensibilizzazione della popolazione, e anche dei commercianti, affinché non sottovalutino eventuali sintomi, e si rendano disponibili a effettuare test diagnostici in modo tale da giungere a una diagnosi precoce della malattia.

Inoltre in Sardegna il problema riguarda anche l'impossibilità di frazionare i buoni acquisto mensili erogati dal servizio sanitario locale, per la fornitura di alimenti senza glutine, per cui il celiaco è costretto a spenderli in un unico posto, o solo in farmacia o solo in un punto vendita autorizzato (Sito 9).

## **1.4 La terapia**

### **1.4.1 La dieta**

Allo stato attuale l'unica terapia esistente per i celiaci è una rigorosa e stretta osservanza di una dieta priva di glutine che perduri per tutta la vita, al fine di ottenere la guarigione della mucosa e la prevenzione delle complicazioni dovute alla malattia (Haines, Anderson & Gibson, 2008). Tuttavia, l'eliminazione del glutine dalla dieta risulta difficoltosa, a causa delle possibili contaminazioni attraverso altri alimenti (Collin, Mäki & Kaukinen, 2004). Per salvaguardare la salute lo *United States Food and Drug Administration* ha stabilito il limite massimo di glutine a < 20 ppm (equivalenti a 10 ppm di gliadina) per gli

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

alimenti senza glutine. Il consumo giornaliero di alimenti senza glutine deve essere preso in considerazione in quanto possono concorrere a superare il limite consentito; è stato stimato, infatti, che la soglia di ingestione prolungata nel tempo in alcuni celiaci deve essere inferiore a 50 mg/d (Catassi et al., 2007), nonostante alcune persone dimostrino una maggiore sensibilità. La presenza della gliadina in cibi contaminati rappresenta un rischio non trascurabile per i celiaci (Lohiniemi et al., 2000), poiché l'ingestione anche di piccole quantità per periodi prolungati, induce ITG e biopsia positive.

#### **1.4.2 La modificazione del glutine**

Sono state messe a punto delle strategie atte a modificare il glutine in modo da rendere non tossica la gliadina. Tuttavia questa tecnica non ha riscosso particolare interesse in quanto ha portato, in primo luogo, alla perdita delle caratteristiche proprie dei prodotti da forno, inoltre al rifiuto generale verso i prodotti geneticamente modificati (OGM), e alla possibile contaminazione delle colture normali da parte di quelle OGM (Donnelly, Ellis & Ciclitira, 2011).

#### **1.5 L'etichettatura degli alimenti senza glutine**

Secondo il Regolamento 828/2014, tutti gli alimenti senza glutine, commercializzati nell'Unione Europea con la dicitura “senza glutine o “*gluten-free*” (e analoghe traduzioni), devono rispettare e garantire il limite di 20 ppm, e possono essere quindi consumati tranquillamente dai celiaci. Lo stesso limite ha valore anche negli Stati Uniti d'America.

Le disposizioni contenute nel medesimo, che ha recepito il Reg. 41/2009, sono le seguenti:

- La dicitura “senza glutine” è di natura volontaria. Qualsiasi alimento del libero commercio (gelati, salumi, caramelle, salse, ecc.) e della ristorazione, per cui le aziende/ristoratori possano garantire l'assenza di glutine (glutine < 20 ppm), può riportare la dicitura «senza glutine».
- I prodotti sostitutivi senza glutine erogati ai celiaci attraverso il SSN (inseriti nel Registro Nazionale degli alimenti senza glutine) restano soggetti all'autorizzazione dello stabilimento di produzione e alla procedura di notifica di ogni prodotto per l'inserimento nel Registro Nazionale degli Alimenti senza

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum “Biotecnologie microbiche agroalimentari”* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

glutine. Questi alimenti devono riportare l'indicazione "senza glutine, specificamente formulato per celiaci" o "senza glutine, specificamente formulato per persone intolleranti al glutine".

- Possono essere definiti "senza glutine" anche i prodotti sostitutivi ottenuti con l'utilizzo di materie prime derivanti da cereali vietati, come l'amido di frumento deglutinato, purché garantiscano un contenuto in glutine < 20 ppm nel prodotto finito.
- Il limite di glutine di 100 ppm è ammesso per i soli prodotti sostitutivi a base di ingredienti depurati di glutine/deglutinati, cioè materie prime derivanti da cereali contenenti glutine appositamente trattati. Questi prodotti possono riportare la dicitura «con contenuto di glutine molto basso».
- I prodotti "con contenuto di glutine molto basso" non possono essere inseriti nel Registro Nazionale degli Alimenti senza glutine, e pertanto non sono erogabili dall'SSN.
- I prodotti naturalmente privi di glutine non devono riportare la dicitura "senza glutine". Questo perché la norma vuole aiutare il celiaco nell'identificazione dei prodotti senza glutine tra quelli considerati "a rischio".

Il Regolamento 828/2014, sancisce la possibilità di accoppiare a "senza glutine" la dicitura aggiuntiva "adatto ai celiaci" oppure "adatto alle persone intolleranti al glutine".

In base a quanto definito dal Ministero della Salute, la dicitura "senza glutine" può essere riportata in etichetta solo se l'azienda produttrice è in grado di garantire l'assenza di ingredienti derivati da cereali vietati, e l'assenza di possibili contaminazioni durante la filiera produttiva; inoltre, prevede che le aziende includano, nel proprio piano di autocontrollo, il punto critico relativo al glutine (materie prime utilizzate, loro stoccaggio e processo di lavorazione e pulizia). Questo implica da parte degli organi competenti la verifica della veridicità di quanto riportato nel piano, assicurando ai consumatori celiaci l'idoneità dei prodotti con l'indicazione "senza glutine" in etichetta, anche se non sono presenti in prontuario o non riportino il marchio "Spiga Barrata".

### 1.5.1 La Spiga Barrata

La Spiga Barrata (figura 1) è un marchio registrato di proprietà dell'Associazione Italiana Celiachia, la quale alla fine degli anni '90 ha cominciato la Concessione Controllata all'utilizzo di questo simbolo. Tale marchio viene apposto in tutti i prodotti che rispettino il limite  $< 20$  ppm stabilito per legge, e che quindi identifichi l'idoneità al consumo da parte dei celiaci.

La Spiga indica i soli prodotti il cui processo produttivo sia stato esaminato e certificato. Infatti, a partire dal 2006, l'AIC si occupa direttamente dell'iter di valutazione dei prodotti che richiedono la spiga barrata, portando sul mercato un marchio riconosciuto universalmente, anche per consentire al celiaco di riconoscere e individuare facilmente i prodotti (Sito 10).



Figura 1: Il marchio della Spiga barrata

### 1.6 Il mercato del *gluten-free*

Il mercato del *gluten-free* nel 2016 ha raggiunto un giro d'affari di oltre 4 miliardi e mezzo di dollari, e si stima che nel 2026, la cifra sia destinata a triplicare. Questo è quello che è emerso dall'ultimo rapporto dell'Istituto di ricerche britannico Visiongain, che studia il trend nel mondo, compresa l'Italia. In Italia il mercato del *gluten-free* ha un valore di circa 300 milioni di euro, con un tasso di crescita annuo del 30%. I primi tre colossi del mercato, Schär, Molino di Ferro e Galbusera, sviluppano il 38% del giro d'affari totale italiano. Gli alimenti privi di glutine nascono per soddisfare le esigenze dei consumatori celiaci, ma vengono consumati anche da persone che hanno una particolare sensibilità al glutine, ma non possono essere definiti celiaci. Inoltre, esiste un'importante fetta rappresentata da chi sceglie il *gluten-free* come stile di vita alimentare, prescindendo

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti *gluten-free*– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

dall'intolleranza al glutine. Per tendenza, le aziende si adeguano al mercato spinta dalla crescita dei consumi e rispondendo con la produzione di alimenti senza glutine, affiancata a quella tradizionale (Sito 11).

L'Italia, regina della pasta e della pizza, ha aperto sempre più pizzerie e ristoranti attrezzati nel fornire alimenti senza glutine; inoltre, essa risulta il primo Paese in Europa nel consumo di prodotti *gluten-free*, nonostante il costo più elevato rispetto ad altri Paesi esteri, spuntando un prezzo più alto nelle farmacie che nei supermercati. L'Italia e Malta sono gli unici Paesi ad erogare ai celiaci un sussidio per l'acquisto degli alimenti senza glutine (Sito 12). L'entità del sussidio varia da regione a regione e cambia in base all'età e al sesso. Grazie al decreto Veronesi del 2001 (DM 06/2011), è possibile acquistare anche in negozi specializzati dedicati solamente ai prodotti identificati mediante il logo della Spiga Barrata.

Nel 1972, un gruppo di genitori di bambini celiaci, fondò l'Associazione Italiana Celiachia, ancora oggi attiva e con sedi presenti in tutte le regioni.

### **1.7 Il ruolo del glutine negli impasti**

Il glutine si forma durante la fase di impastamento, quando l'amido viene idratato dall'acqua: a questo punto si forma un sistema in cui il glutine trova le gliadine come solvente, e le glutenine come soluto; le glutenine polimerizzano formando la rete glutinica. Durante la formazione della rete glutinica viene attuata una fase di polimerizzazione la quale si forma per ossidazione dei ponti S-S tra i residui di cisteina delle glutenine (Sivam et al., 2010).

Il glutine è in grado di trattenere l'amido e i lipidi, i quali vengono trattenuti a loro volta, non per affinità ma per intrappolamento nella maglia durante la fase di impastamento. Di estrema importanza è la durata della fase di impastamento perché un impastamento prolungato danneggia e rompe la rete glutinica, aumentando così anche l'ossidazione dei residui di cisteina.

Il risultato è una massa viscoelastica capace di creare degli strati sottili che intrappolano il gas, consentendo all'impasto di espandersi per trasformarsi in un alimento leggero, soffice e gustoso (Cauvain & Young, 1999). Il processo di panificazione consta di diverse fasi:

1. Miscelazione degli ingredienti
2. Lievitazione dell'impasto

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

### 3. Cottura dell'impasto

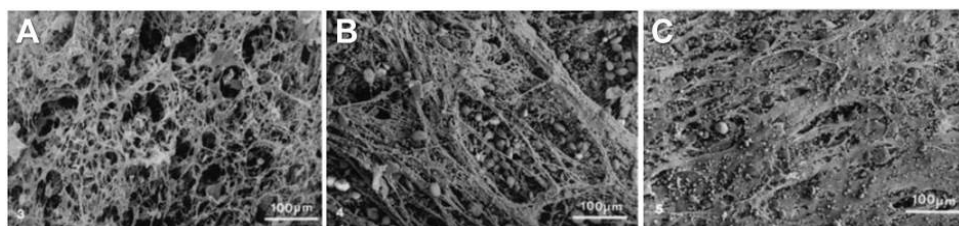
### 4. Raffreddamento

Durante la procedura di panificazione si verificano l'evaporazione dell'acqua, l'espansione del volume, la inattivazione dei lieviti e degli enzimi, la gelatinizzazione dell'amido, la coagulazione delle proteine e, infine, la formazione della crosta e della mollica.

Attraverso l'energia di impastamento vengono indotti cambiamenti conformazionali a carico della farina idratata, mediante la rottura e la formazione di legami di-solfuro (-SS-), idrofobici e a idrogeno; le bolle d'aria vengono incorporate nell'impasto per formare delle celle per la CO<sub>2</sub> prodotta dalla lievitazione (Sivan et al., 2010). La lievitazione consiste in una o più serie di fermentazioni di durata variabile (da meno di un'ora a diverse ore); essa si basa sulla fermentazione degli zuccheri, cioè sulla conversione del glucosio o altri zuccheri, in etanolo e anidride carbonica. La cottura comporta il trasferimento di massa e calore, portando alla trasformazione dell'impasto in pane. Man mano che l'impasto si riscalda, e la temperatura raggiunge i 55° C, i lieviti vengono inattivati; a 60° C circa, inizia la gelatinizzazione dell'amido, tuttavia non vi è acqua sufficiente per spingere la gelatinizzazione, e l'acqua viene trasferita dal glutine all'amido col procedere della cottura. I granuli dell'amido assorbono per rigonfiamento l'acqua ceduta dal glutine, che va incontro a un processo di gelatinizzazione e polimerizzazione. Via via che la temperatura continua a salire, l'impasto è sottoposto a una serie di cambiamenti simultanei fisici, chimici e biochimici, che portano alla trasformazione della pasta schiumosa a una struttura spugnosa della mollica, lo strato più esterno della mollica, per poi asciugarsi e dare origine alla crosta (Cauvain & Young, 1999). La colorazione della crosta dipende dalla reazione di Maillard e di caramellizzazione; la doratura avviene quando la temperatura di cottura è > 110° C. Oltre che della colorazione della crosta, la reazione di Maillard è responsabile in gran parte anche del sapore e dell'odore del pane. Una volta ultimata la cottura inizia la fase di raffreddamento attraverso cui avviene la cristallizzazione dell'amido, e l'indurimento dei granuli. Il prodotto che ne deriva possiede una struttura spugnosa, e gli elementi strutturali sono un susseguirsi di amido gelatinizzato che racchiude la maglia glutinica coagulata (Sluimer, 2007).

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari



**Figura 2:** Sviluppo del glutine durante la formazione dell'impasto al microscopio elettronico nella fase iniziale (A), intermedia (B) e nella fase finale (C)

### 1.8 I difetti dei prodotti da forno senza glutine

La produzione di prodotti da forno senza glutine, risulta difficoltosa in quanto le farine senza glutine non possiedono l'attitudine a formare una massa viscoelastica durante l'impastamento, e non esiste ingrediente alcuno in grado di sostituire il glutine e le sue proprietà uniche. Innanzitutto le farine *gluten-free* necessitano di quantitativi di acqua di gran lunga superiori rispetto alle farine convenzionali, affinché si possa ottenere una farina accettabile, inoltre l'impasto è difficile da lavorare, richiedendo, pertanto, un impastamento mediante impastatori elettrici. L'impasto senza glutine viene spesso paragonato alla pastella delle torte, a causa della sua consistenza (Moore et al., 2004); inoltre la cottura deve avvenire in teglia, in modo tale da controllare la forma e l'aspetto (Onyengo et al., 2011a). Per quanto riguarda la lievitazione, la CO<sub>2</sub> prodotta dai lieviti non viene intrappolata negli alveoli, come avviene negli impasti tradizionali, impedendo, di conseguenza all'impasto di espandersi; ciò nonostante, anche se in minor misura, una parte dei gas viene trattenuta per formare degli alveoli irregolari, e una parte, viene persa molto velocemente. Il pane finito è un prodotto denso di difetti estetici e qualitativi, quali:

- ✓ Volume ridotto
- ✓ Assenza di una struttura alveolare
- ✓ Consistenza asciutta e friabile
- ✓ Crosta fratturata
- ✓ Povero al palato
- ✓ Sapore che va incontro velocemente allo stantio.

Di fondamentale importanza è la carenza di fibre e micronutrienti, dei prodotti da forno senza glutine, se paragonati ai prodotti canonici con glutine. Tali carenze sono dovute

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari



all'utilizzo di farine raffinate e di ingredienti non arricchiti (Thompson, 2000; Kinsey et al., 2008).

Pertanto per i consumatori celiaci ne consegue un difficoltoso reperimento di prodotti esenti dai difetti tipici sopra elencati (Pszczola, 2012).

Per contrastare tali problematiche, sono state messe a punto diverse strategie che fanno uso di differenti additivi e nuove tecnologie.

## **1.9 Gli ingredienti tradizionali**

### **1.9.1 Le farine e gli amidi convenzionali**

#### **1.9.1.1 Farina di riso**

Una varietà di formulazioni *gluten-free* è stata messa a punto utilizzando farine di mais, riso, patate, cassava, o amidi di frumento come base, e proteine e idrocolloidi come agenti leganti. L'attitudine al rigonfiamento, la massima capacità di legare l'acqua ed il tasso di gelatinizzazione-retrogradazione dell'amido, dipendono dall'origine del mais (misura dei granuli, contenuto di amilosio/amilopectina e modificazioni chimico-fisiche). Questi fattori hanno un impatto sul comportamento reologico dell'impasto e sulla struttura finale del pane, l'accettabilità e la durata di conservazione.

La farina di riso è la farina più comune utilizzata nella produzione di birra, cereali per la colazione, dessert e prodotti da forno, sia tradizionali che senza glutine; essa inoltre, si presta particolarmente alla produzione di alimenti per soggetti allergici o intolleranti al frumento, perché ampiamente disponibile, economica, gradevole al palato, di colore bianco, altamente digeribile e ipoallergenica (Hager et al., 2012). Nonostante i pregi che la caratterizzano, essa presenta comunque dei limiti tecnologici nella panificazione, dovuti essenzialmente alle scarse proprietà funzionali delle sue proteine nella preparazione di alimenti. Infatti, le proteine del riso, a causa della loro natura idrofobica, sono insolubili in acqua e incapaci di formare una massa viscoelastica per via del basso tenore in prolamine; tutto ciò porta all'assenza della maglia proteica necessaria all'intrappolamento della CO<sub>2</sub> durante la lievitazione. La conseguenza di ciò è un prodotto con una struttura non in grado di trattenere la CO<sub>2</sub>, caratterizzato da un ridotto volume specifico e dalla mollica compatta, totalmente differente dal pane di frumento (He & Hosney, 1991). Per ovviare a questi inconvenienti si è reso necessario adoperare

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

differenti additivi, come idrocolloidi, proteine, emulsionanti ed enzimi, allo scopo di migliorare la struttura, il volume, l'aspetto e la durata di conservazione del pane di riso (Ylimaki et al., 1991; Gujral & Rosell, 2004b). E' necessario sottolineare il fatto che la qualità finale del prodotto finito è influenzata sia dal tipo di riso che dalla dimensione delle particelle della farina, inoltre gli effetti dipendono anche dalla quantità d'acqua utilizzata nella formulazione e dalle condizioni di lavorazione (de la Hera, Martinez & Gómez, 2013a).

### **1.9.1.2 Farina di mais**

La farina derivata dal mais macinato presenta dei limiti nella panificazione dovuti al suo sapore e al tipico colore giallo, pur nonostante si adatta alla produzione del *broa* (tipico pane portoghese prodotto con farina di frumento e di mais), nella versione senza glutine (Brites et al., 2010). Il mais bianco potrebbe essere una valida alternativa a quello giallo nella produzione di prodotti da forno senza glutine. Il pane ottenuto con il mais presenta un forte colore giallo, un basso volume specifico e una mollica compatta (Hager et al., 2012). Le farine di mais caratterizzate da particelle grossolane si prestano meglio alla produzione di prodotti da forno senza glutine, in quanto conferiscono al pane un volume maggiore e una compattezza minore della mollica, se paragonato al pane prodotto da farine a grana sottile (de la Hera et al., 2013b).

## **1.10 Le farine e gli amidi alternativi**

Negli ultimi 10 anni, le farine derivate da altri cereali, pseudo cereali, legumi, frutta e nocciole, sono state utilizzate per migliorare il valore nutrizionale e diversificare i prodotti da forno senza glutine.

### **1.10.1 Farina di sorgo**

Secondo alcuni ricercatori, la farina di sorgo può essere adoperata come ingrediente in alcune formulazioni senza glutine, in combinazione con amido di riso, di mais e di patate (Onyango et al., 2011a). Sempre secondo Onyango et al., (2011a), utilizzando una combinazione con il 50% di amido di cassava e il 50% di farina di sorgo si ottiene un pane con migliori caratteristiche della mollica e della consistenza, rispetto ai pani ottenuti da differenti combinazioni. Tale miglioramento si ipotizza sia dovuto alla capacità della

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

cassava di formare una massa elastica durante la gelatinizzazione dell'amido e che permetterebbe un ottimale intrappolamento della CO<sub>2</sub> durante la lievitazione, con conseguente incremento del volume del pane e della sua consistenza (Onyango et al., 2011a). Altre strategie hanno avuto come obiettivo il miglioramento del pane attraverso l'utilizzo di idrocolloidi, emulsionanti, proteine, enzimi (Schober et al., 2005), lievitazione con lievito madre (Schober, Bean & Boyle, 2007) e trattamento dell'impasto con l'alta pressione (Vallons et al., 2010).

### **1.10.2 Il miglio e il teff**

Il miglio (*Panicum miliaceum*) è un cereale caratterizzato da semi piccoli e comprende il miglio con le dita, il piccolo miglio, il teff ed il panico. Esistono svariati alimenti e bevande a base di miglio, provenienti dall'Africa, dall'India e dall'Asia orientale, quali il miglio scoppiato, couscous, focacce, porridge, e bevande alcoliche/analcoliche (Saleh et al., 2013). Una menzione a parte va fatta per il teff (*Eragrostis tef*), cereale molto importante in Etiopia, caratterizzato da vari colori, che vanno dal bianco al rosso o marrone; tra questi, la varietà bianca si presta maggiormente per l'uso alimentare. Il teff viene utilizzato per produrre la *injera*, una focaccia tipica fermentata; da questo utilizzo è partita l'idea di poterlo sfruttare nelle formulazioni gluten-free sotto forma di farina. In accordo a quanto dimostrato da Hager et al., (2012) è raccomandato l'uso della farina di teff solo come parte della composizione della formulazione, e non come totale, in modo tale da non compromettere la qualità sensoriale del prodotto finito.

### **1.10.3 L'avena**

L'avena (*Avena sativa*) è da sempre oggetto di controversie e dibattiti da parte della comunità scientifica e per questo è il cereale più studiato dal punto di vista clinico. Studi clinici hanno dimostrato che piccole quantità di avena possono entrare a far parte della dieta celiaca. Secondo il Codex standard del 1981, nonostante l'avena faccia parte di quei cereali contenenti glutine, ne viene comunque specificato l'utilizzo negli alimenti senza glutine a livello nazionale, al punto 6 del Codex Alimentarius, inerente i prodotti senza glutine. Nel 2007, la FDA (*Food and Drug Administration*) ha proposto negli Stati Uniti, che all'interno della definizione "gluten-free" fossero inclusi gli alimenti contenenti avena. In Finlandia invece, l'avena fa parte della normale alimentazione delle persone celiache (Peräaho et al., 2004b) che la considerano piacevole e a prezzo ragionevole.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

In realtà il problema dell'avena deriva da una possibile contaminazione crociata da parte di altri cereali contenenti glutine, in modo particolare frumento e orzo, attraverso le normali pratiche agronomiche (Hernando et al., 2008; Mujico et al., 2011). Infatti, è stato dimostrato che il consumo di avena non contaminata da glutine per periodi prolungati risulta sicura per la maggior parte dei celiaci (Janatuinen et al., 1995).

#### **1.10.4 Gli pseudo cereali**

Gli pseudo cereali sono, a differenza dei cereali (monocotiledoni), delle piante dicotiledoni, ma con semi simili, sia dal punto di vista della composizione, che da quello dell'utilizzo. Fanno parte degli pseudo cereali la quinoa (*Chenopodium quinoa*), il grano saraceno (*Fagopyrum esculentum*) e l'amaranto (*Amaranthus caudatus*, *Amaranthus hypochondriacus*, *Amaranthus caudatus*).

Gli pseudo cereali ricoprono un interesse rilevante nella produzione di prodotti da forno senza glutine, grazie al loro valore nutrizionale, al contenuto di acidi grassi, proteine ad alto valore biologico, sali minerali e componenti bioattivi (Alvarez-Jubete et al., 2009a, 2009b).

Il grano saraceno, originario dell'Asia Centrale, si è diffuso successivamente nell'Europa Centrale e dell'Est da popolazioni nomadi. Nel XIII secolo ha raggiunto una certa importanza in Italia, Austria e Germania, sebbene, la sua coltivazione subì un decremento dovuto alla coltivazione di cereali.

Il grano saraceno è particolarmente ricco di carboidrati (67-70%) (Li & Zhang, 2001), di cui il 54% circa è rappresentato da amido (Steadman et al., 2001a).

Indubbiamente la farina di grano saraceno è la più studiata nelle formulazioni gluten-free, grazie al suo colore più chiaro, e al sapore e aroma più gradevoli rispetto all'amaranto e alla quinoa. In un lavoro di Torbica et al. (2010) si è visto che con l'utilizzo della farina di grano saraceno, in misura del 50% e fino al 40% di farina a base di mais, nella formulazione, è stato ottenuto un miglioramento del valore nutrizionale, dei composti antiossidanti e della capacità antiossidante del prodotto. Nello stesso studio sono stati valutati gli effetti di differenti dosi di farina di riso semigreggio e integrale, sulla qualità del prodotto finito. È stato osservato che, aumentando del 10, 20 e 30% la farina di riso integrale, si è avuto un decremento dei punteggi attribuiti, per il gusto, gli aromi e l'aspetto, mentre non si sono avuti effetti sulla morbidezza della mollica. La farina di riso

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum “*Biotecnologie microbiche agroalimentari*” – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

integrale presenta un sapore amaro rispetto alla farina di riso semi-grezzo, che invece gode di sapore più piacevole grazie alla rimozione della lolla. Per quanto riguarda il pane nel quale è stata adoperata la farina di riso privato della lolla, rispettando le medesime percentuali utilizzate per la farina di riso integrale, è stato osservata un'elevata accettabilità, con punteggi di piacevolezza per il gusto, l'aspetto, la morbidezza e l'aroma, che variavano da 7 a 8 su 9 (1- estremamente sgradevole su 9- estremamente piacevole).

L'amaranto e la quinoa rappresentano le colture più importanti per le popolazioni Pre-Colombiane dell'America Latina. In seguito alla conquista spagnola la coltivazione di queste colture è stata eliminata, per poi riprendere successivamente su piccola scala. L'interesse nei loro confronti è cresciuta dal momento in cui si sono scoperte le proprietà nutrizionali di cui sono dotate (Alvarez-Jubete et al., 2009).

Per quanto riguarda l'amaranto, anch'esso ha trovato impiego nelle formulazioni senza glutine, come farina (Gambus, Gambus & Sabat, 2002). L'aggiunta del 2.5% di farina di amaranto su una massa totale del 12.5%, ha permesso di incrementare il contenuto di nutrienti; i risultati più incoraggianti sono stati osservati su pani preparati con il 10% di farina di amaranto: a tale concentrazione si è vista un'accettabilità da parte del consumatore pari al 50%; tuttavia, a concentrazioni più elevate (10% e 20%) l'amaranto ha reso il pane più scuro, con un volume specifico ridotto e ha indotto una forza di compressione maggiore.

Analogamente a grano saraceno e amaranto, la quinoa è stata impiegata nei prodotti da forno senza glutine. Del Castillo et al. (2009) hanno constatato come l'utilizzo della farina di quinoa in misura del 26%, su una formulazione *gluten-free*, ha provocato un'accettabilità del consumatore del 40%. Altre strategie per il miglioramento del pane ottenuto con farina di quinoa hanno previsto l'uso di lievito madre (Coda, Rizzello & Gobbetti, 2010) e la germinazione (Mäkinen, Zannini & Arendt, 2013).

Altre farine alternative sono state ottenute da radici e tuberi come la manioca (Pasqualone et al., 2010) e la patata dolce (Seguchi et al., 2012); inoltre sono stati adoperati semi di lino (Gambùs 2005) e di chia (Moreira et al., 2012), legumi, quali germe di carruba, ceci (Miñarro et al., 2012) e vinal (*Prosopis ruscifolia*), un legume tipico dell'Argentina (Bernardi et al., 2010) e soia (Shin et al., 2013). Shin e collaboratori, nel 2013 hanno sviluppato un pane senza glutine utilizzando il 100% di soia, in 4 diverse condizioni: farina di soia cruda, farina di soia pretrattata, non riscaldata, germinata e 2

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

metodi di riscaldamento (cottura a vapore e torrefazione). Il volume più elevato e la durezza della mollica più ridotta sono stati riscontrati rispettivamente nell'ordine: nel prodotto formulato con farina di soia germinata, farina di soia cruda, farina di soia torrefatta e farina di soia al vapore; il pane ottenuto con la farina trattata con calore risultava avere un minore odore e sapore di fagiolo, rispetto a quello formulato con la farina non trattata col calore. Tuttavia, il pane ottenuto con farina non trattata al calore, ha mostrato un aspetto migliore. Pertanto, da questi risultati è emerso che il pretrattamento della farina di soia ha migliorato *in toto* la qualità del pane. Utilizzando la farina di germe di carrube è stata appurata la sua abilità nel formare un impasto viscoelastico, se mescolata con amido e acqua a temperatura ambiente, grazie alla carrubina, proteina in grado di mimare le proprietà del glutine. Considerando le importanti qualità nutrizionali e socio-economiche dei legumi, sta prendendo sempre più piede nelle formulazioni senza glutine lo sviluppo di nuove farine ottenute da piselli, fagioli e lenticchie.

Demirkesen et al. nel 2010 hanno trovato come un pane contenente il 70% di farina di riso ed il 30% di farina di castagne, in una miscela contenente gomma xantano e DATEM, mostrasse buoni parametri qualitativi (durezza, volume specifico, colore e valori sensoriali). Analogamente, anche la farina di banana acerba ha permesso di ottenere buoni risultati nella produzione di pane senza glutine come fonte di amido e fibre alimentare (Siqueira et al., 2013); in un pane prodotto con il 100% di farina di banana acerba in combinazione con farina di riso e amido di patata, sono stati ottenuti risultati soddisfacenti.

### **1.11 Ingredienti per il miglioramento nutrizionale e l'attività biologica**

Come già accennato, il pane senza glutine ottenuto a partire da farine e amidi raffinati spesso presenta bassi valori intrinseci di vitamine, sali minerali e fibra alimentare, anche perché non viene arricchito o fortificato (Thompson, 2000). Nonostante ciò si è reso necessario l'arricchimento e la fortificazione di tali pani con micronutrienti e fibre, considerato il basso livello di assunzione di fibre, calcio, ferro, folati e vitamina D da parte degli individui celiaci (Thompson et al., 2005). La qualità nutrizionale dei prodotti da forno senza glutine deve essere necessariamente migliorata, mediante l'uso nella formulazione, di ingredienti dotati di proprietà nutrizionali.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

### 1.11.1 La fibra alimentare e gli ingredienti funzionali

La fibra alimentare è l'ingrediente più studiato nell'ambito delle formulazioni senza glutine; essa si è mostrata in grado di migliorare le qualità fisiche, nutrizionali, sensoriali e la *shelf-life* del pane senza glutine. Nelle formulazioni arricchite in fibre è necessario incrementare la quantità d'acqua, in quanto possiedono una spiccata capacità di legare l'acqua; infatti, una quantità ottimale d'acqua permette un'adeguata viscosità dell'impasto, la gelatinizzazione dell'amido e la denaturazione delle proteine, necessarie durante il processo di panificazione. Dalla giusta quantità d'acqua, dipende un'ottimale struttura della mollica e la consistenza del pane senza glutine arricchito in fibre alimentari (Ziobro et al., 2013). Alcune fibre alimentari, come ad esempio gli idrocolloidi, trovano largo uso nelle formulazioni, come agenti strutturali, in grado di migliorare la qualità del pane *gluten-free*, grazie alle loro proprietà strutturanti e gelificanti; questa tipologia di fibre, infatti, a contatto con l'acqua forma una struttura tipo gel a rete, utile ad incrementare la viscosità della pastella, a rafforzare i bordi degli alveoli in espansione, incrementando la ritenzione dei gas durante la cottura, e migliorando il volume, la consistenza, la struttura e l'aspetto del prodotto (Lazaridou et al., 2007). Alcuni idrocolloidi, utilizzati come agenti leganti, in ridotte quantità nelle formulazioni senza glutine, sono stati ampiamente studiati, allo scopo di migliorare la qualità nutrizionale e sensoriale, in quanto capaci di proprietà gelificanti e di ispessimento.

In uno studio, è stato osservato l'effetto dell'utilizzo di fibre provenienti da cereali (mais, grano, orzo e avena) in formulazioni GF, in differenti quantità (3.6 e 9 g/100 g di sfarinato); l'aggiunta delle fibre provenienti dal mais e dall'avena ha apportato un miglioramento in termini di volume e morbidezza della mollica (Sabanis et al., 2009a).

In uno studio portato avanti da Murray (2005) è stata osservata una riduzione della risposta glicemica in individui insulino-dipendenti, grazie all'utilizzo di fibre solubili e amido resistente nella formulazione, considerato l'elevato indice glicemico dei prodotti senza glutine (Segura & Rosell, 2011). Sono stati studiati anche gli effetti di inulina, oligofruzzosio (le fibre più studiate), B-glucano e *Psyllium*; è stata appurata, grazie all'utilizzo di queste fibre solubili come ingredienti funzionali, la regolazione del colesterolo e del glucosio nel sangue.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

Fruttani simili all'inulina (ITF<sub>s</sub>), inulina e oligofruttosio rappresentano i prebiotici più studiati;

essi rivestono un ruolo importante per quanto riguarda l'attività della flora gastrointestinale in quanto apportano benefici alla salute dell'organismo ospite (Gibson et al., 2004) ed il loro utilizzo nella dieta permette l'incremento dell'assorbimento del calcio del 70% a livello del colon (Abrams et al., 2007). Tale beneficio è molto importante negli individui celiaci, in cui l'assorbimento da parte dell'intestino tenue è compromesso dalla malattia, con conseguente ridotta densità minerale delle ossa e osteoporosi (Capriles et al., 2009a). Tuttavia, una perdita di ITF<sub>s</sub> si verifica a causa dell'idrolisi dei fruttani, insieme a un basso grado di polimerizzazione, durante la lievitazione operata da *Saccharomyces cerevisiae* e durante la cottura; i lieviti producono l'enzima invertasi che idrolizza i fruttani a basso peso molecolare, anch'essi suscettibili all'idrolisi durante la cottura (Praznik, Cieślik & Filipiak-Florkiewicz, 2002). È stato anche dimostrato che gli ITF<sub>s</sub> sono in grado di modificare la consistenza dell'impasto, migliorando anche la struttura e la ritenzione dei gas durante la cottura, migliorando di conseguenza la qualità del pane (Korus et al., 2006). La presenza degli stessi fruttani nella formulazione favorisce anche la reazione di Maillard (Hager et al., 2011); gli stessi autori hanno valutato gli effetti del B-glucano ( $f_w$ ) sulle proprietà degli impasti e del pane, e hanno osservato come esso venga parzialmente degradato durante la preparazione del pane; tuttavia frazioni ad alto peso molecolare, residue dalla degradazione, sono comunque in grado di contribuire alla viscosità, importante per quanto riguarda le funzioni intestinali.

### 1.11.2 Micronutrienti

Esistono diversi studi in cui sono stati addizionati micronutrienti (ferro e calcio) nelle formulazioni senza glutine. Gli studiosi hanno cercato di trovare composti a base di calcio e ferro che potessero essere assorbiti e che non inficiassero la qualità sensoriale del pane. Differenti composti a base di ferro (pirofostato ferrico, pirofosfato ferrico con emulsionanti, NaFeEDTA, ferro elettrolitico, gluconato ferroso, lattato ferroso e solfato ferroso) sono stati adoperati per arricchire, ad esempio, del pane a base di amaranto; è stato osservato come i prodotti più accettabili fossero quelli contenente il pirofosfato ferrico con emulsionanti ed il pirofostato ferrico (Kiskini et al., 2007). In uno studio successivo (2012) gli stessi ricercatori hanno comparato gli effetti del pirofosfato ferrico,

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari



pirofosfato ferrico con emulsionanti, ferro sodio EDTA, ferro solfato microincapsulato, e ferro elementare, sulle caratteristiche fisiche e sensoriali di pane fortificato con ferro (40 mg/Kg di composto solido); è stato osservato come l'aggiunta del pirofosfato ferrico e del NaFeEDTA, abbiano conferito al pane caratteristiche sgradevoli, quali il colore scuro della crosta e della mollica, nonché un sapore metallico. Il ferro elettrolitico, invece, ha mostrato di essere più stabile al trattamento termico, non alterando quindi il prodotto, sebbene, risultando scarsamente assorbito. È chiaro che attraverso i lavori sopracitati emergono le limitazioni dell'uso del ferro nelle formulazioni senza glutine. Krupa-Zozac et al. nel 2011 hanno valutato l'effetto dell'addizione individuale e combinata del caseinato di calcio e del citrato di calcio. In tutte le formulazioni è stato utilizzato il 2% di calcio. È stato osservato che l'aggiunta di calcio ha permesso di ottenere una mollica più soffice ed elastica e gradevole al palato; anche gli attributi sensoriali sono stati graditi dai consumatori. In un lavoro successivo (2012) gli stessi autori hanno messo a punto una formulazione arricchita col 3.9% di inulina in sostituzione della medesima quantità di amido. In tale formulazione sono state utilizzate diverse fonti di calcio (lattato di calcio, citrato di calcio, cloruro di calcio e carbonato di calcio) fornendo un quantitativo di calcio elementare pari allo 0.6% per tutti i campioni. I risultati migliori sono stati forniti dai pani contenenti carbonato di calcio. I risultati emersi dai lavori sopracitati permettono di aprire la strada verso risultati promettenti nell'ambito della fortificazione delle formulazioni senza glutine, sia in termini di biodisponibilità *in vitro* e *in vivo*, per poter sviluppare mezzi efficaci in grado di fornire i micronutrienti ai soggetti celiaci.

### **1.11.3 Ingredienti derivati da frutta e verdura**

Sono stati ottenuti risultati estremamente incoraggianti grazie all'aggiunta di ingredienti derivati da frutta e ortaggi; ad esempio, sono stati aggiunti alle formulazioni GF, purea di kiwi (Sun-Waterhouse et al., 2009), succo d'uva (Sabanis et al., 2008), semi di ribes nero (Korus et al., 2012), polpa d'arancia (O'Shea et al., 2013), farina di banana acerba (Siqueira et al., 2013). All'interno delle formulazioni sono stati sfruttati altri ingredienti funzionali, allo scopo di migliorare la qualità nutrizionale dei prodotti da forno senza glutine, quali isoflavonoidi, omega-3, probiotici, acidi grassi, proteine derivate da piselli, soia, siero di latte, olio di semi di lino, pesce, e fibre come crusca, fibre solubili, amidi resistenti, vitamine e sali minerali (Shao et al., 2009; Nachay, 2013).

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

## 1.12 Additivi per il miglioramento degli impasti e del pane

Gli additivi utilizzati per il miglioramento della qualità degli impasti e del pane, e l'estensione della *shelf-life*, comprendono idrocolloidi, proteine, enzimi, emulsionanti, conservanti e composti antiossidanti (Sluimer, 2007). Alcuni di essi vengono utilizzati anche nell'industria dei prodotti da forno senza glutine.

### 1.12.1 Gli idrocolloidi

Gli idrocolloidi vengono utilizzati da diverso tempo in una vasta gamma di formulazioni senza glutine, perché capaci di migliorare la struttura, la consistenza, la *shelf-life* e l'accettabilità del prodotto (Lazaridou et al., 2007). Gli idrocolloidi sono dei polisaccaridi ad alto peso molecolare di origine e struttura chimica differente, a natura idrofilica.

La straordinarietà degli idrocolloidi risiede nella loro capacità di interagire con l'acqua e formare struttura gel a rete, in grado di aumentare la viscosità dell'impasto, rafforzando i bordi degli alveoli in espansione, incrementando la capacità di ritenzione dei gas durante la lievitazione e la cottura, nonché migliorando il volume, la struttura, la consistenza e l'aspetto del pane. Inoltre, gli idrocolloidi hanno la capacità di rilasciare l'acqua per la gelatinizzazione dell'amido durante la cottura (Anton & Artfield, 2008).

Essi vengono classificati in base alla loro origine:

- Agar-agar e carragenina (alghe marine)
- $\beta$  -glucano e pectina (estratti vegetali)
- Gomma arabica (essudati vegetali)
- Psyllium, gomma guar
- Gomma xantano
- Metilcellulosa (MC), carbosimetilcellulosa (CMC) e idrossipropilmetilcellulosa (HPMC) (Houben et al., 2012).

Nelle formulazioni senza glutine gli idrocolloidi vengono utilizzati tal quali o in combinazione, in quantità variabili dallo 0.5 al 5% su peso fresco, anche se abitualmente non viene superato il 2% (Hager & Arendt, 2013).

Gli effetti degli idrocolloidi sono dipendenti dalla struttura chimica, dalla quantità utilizzata, dalle interazioni con altri ingredienti della formulazione, e dai parametri di

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

processo (Lazaridou et al., 2007). È stato osservato l'effetto delle proprietà gelificanti degli idrocolloidi sul volume del pane, sulla porosità della mollica, sulla consistenza e sulla struttura del pane (Zannini et al., 2012).

Gli idrocolloidi più comunemente adoperati sono l'HPMC e la gomma xantano, per via dei loro interessanti risultati sulla qualità del prodotto finale (Anton & Artfiled, 2008). Più recentemente, Hager & Arendt (2013) hanno applicato la tecnica della Response Surface Methodology (RSM) per lo studio dell'influenza singola e combinata dell'HPMC e dello xantano, in una formulazione a base di farina di mais, riso, teff o grano saraceno. I risultati ottenuti variavano in accordo con le materie prime utilizzate.

### 1.12.2 Le proteine

Le proteine sono adoperate nei prodotti da forno gluten-free, col duplice scopo di incrementare il valore nutrizionale e le proprietà sensoriali. Il loro utilizzo è anche legato al fatto che sono in grado di mimare alcune proprietà del glutine, costruendo una rete capace di migliorare le proprietà reologiche e di cottura degli impasti, nonché le proprietà sensoriali, strutturali e quelle relative alla *shelf-life*.

Le più comuni fonti proteiche utilizzate sono le uova, i latticini, i legumi ed i cereali. È necessario tenere in considerazione i problemi legati ad eventuali allergie o intolleranze (lattosio), che possono scatenarsi in soggetti predisposti, prima che vengano consumati determinati prodotti arricchiti in proteine.

Gli effetti ed i dettagli nutrizionali, chimici, reologici e tecnologici delle proteine addizionate vengono di seguito descritte (Houben et al., 2012).

Le proteine di soia vengono aggiunte sotto forma di farina di soia o concentrati o isolati di proteine di soia; la loro presenza tra le materie prime ha prodotto un miglioramento degli impasti e delle proprietà del pane (Ranhotra, Loewe & Puyat, 1975; Ribotta et al., 2004).

Le uova vengono addizionate perché la loro schiuma e le proprietà emulsionanti forniscono forma e struttura della mollica gradite; le proteine delle uova formano un film coesivo fondamentale per la ritenzione dei gas durante la cottura e coadiuvano anche la struttura del pane.

Altra fonte di proteine è data dai latticini. La loro presenza nelle formulazioni GF da una parte aumenta il volume, dall'altra migliora la consistenza, il sapore ed il colore

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

della crosta del prodotto. L'imbrunimento della crosta dovuta alla reazione di Maillard e di caramellizzazione, dipendono in larga misura dal contenuto di proteine e lattosio (Houben et al., 2012).

Per quanto riguarda le proteine provenienti da cereali in un lavoro messo a punto da Gallagher et al., (2003) è stato sviluppato un prodotto di buona qualità, grazie all'utilizzo nella formulazione di amido di frumento con siero dolce, solidi del latte e/o isolato proteici del latte e acqua. Il pane ottenuto ha mostrato la crosta scura, la mollica soffice e di colore chiaro, volume più elevato, rispetto a una formulazione di controllo.

Attraverso studi recenti, è stato appurato come, sia la carrubina, che la zeina (prolammina del mais), unite ad amido di mais e acqua, abbiano dato luogo a un impasto viscoelastico, coesivo ed estensibile, simile a quello ottenuto con il frumento. È stato inoltre osservato che l'aggiunta di farina di germe di carrube ha reso l'impasto viscoelastico, se miscelata con amido e acqua a temperatura ambiente, rendendolo anche più "lavorabile" da permetterne la cottura senza teglia (Smith et al., 2012). In altri lavori Schober et al., (2008, 2010), hanno sviluppato un prodotto ottenuto, tra gli altri ingredienti, con zeina e HPMC, miscelati con acqua a una temperatura di 40° C, e ottenendo un impasto in grado di trattenere i gas, paragonabile a quello ottenuto con frumento, con un buon volume, mollica regolare e a grana fine.

### 1.12.3 Gli enzimi

Gli enzimi vengono addizionati per migliorare le proprietà degli impasti e la qualità e la *shelf-life* del pane. Gli enzimi maggiormente oggetto di studio nei pani senza glutine sono quelli che modificano l'amido (amilasi e ciclodestrina glicotransferasi [CGT]), enzimi di connessione alle proteine (protein-glutammin- $\gamma$  - glutamiltransferasi [TG] e glucosio ossidasi [GO]), e proteasi. Le proteine presenti negli ingredienti senza glutine si mostrano in grado di trattenere i gas durante la lievitazione e la cottura. Diversi lavori hanno avuto come obiettivo lo studio della funzionalità di enzimi che inducono *cross-links*, come i TG ed i GO, utili al miglioramento delle proprietà degli impasti e del pane. I TG catalizzano reazioni acil-transferasiche, introducendo nuovi *cross-links* intra e intermolecolari tra i residui

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

amminoacidici della L-lisina e L-glutamina; i TG portano anche alla conversione di proteine solubili in polimeri proteici insolubili ad alto peso molecolare: tale rete proteica è in grado di migliorare le proprietà degli impasti e del pane (Gujral & Rosell, 2004a). Gli stessi ricercatori hanno investigato sull'aggiunta di TG in misura dell'1% in una formulazione a base di farina di riso, contenente anche il 2% di HPMC; è stato osservato che a tali concentrazioni il TG ha indotto la formazione di una rete proteica capace di aumentare la capacità di ritenzione dei gas nell'impasto, conferendo anche un maggiore volume specifico e una migliore consistenza della mollica. In una differente ricerca è stato valutato l'impatto del TG a diverse concentrazioni, e con differenti fonti proteiche (latte scremato in polvere, uova in polvere, farina di soia); è stato osservato come l'estensione della rete proteica dipendesse dalla dose enzimatica e dalle fonti proteiche utilizzate (Moore et al., 2006). Renzetti et al. (2008) hanno investigato sull'impatto del TG sulla formazione della rete proteica in formulazioni basate su farina di riso integrale, mais, avena, grano saraceno, teff e sorgo. I risultati ottenuti variavano in base alla fonte proteica: il TG aggiunto alla farina di riso integrale e di grano saraceno ha permesso di ottenere un volume maggiore, mentre non ha prodotto effetti se utilizzato con la farina di sorgo e di teff, inoltre ha mostrato effetti negativi sul pane prodotto con farina di mais. Per quanto riguarda il GO, esso catalizza l'ossidazione del glucosio ad acido gluconico e perossido d'idrogeno, portando alla formazione di legami disolfurici tra le proteine glutiniche, favorendo, pertanto, la rete proteica. Lo stesso GO è stato adoperato con l'HPMC ( $f_w$ ) in una formulazione a base di farina di riso; dallo studio è stato evidenziato un incremento del volume e una maggiore morbidezza della mollica (Gujral & Rosell, 2004b). L'effetto del TG è stato studiato anche in formulazioni basate su farina di mais e sorgo, prive di idrocolloidi. I pani a base di mais e sorgo hanno mostrato un incremento del volume specifico, mentre non si è verificato alcun miglioramento nei pani prodotti con teff e grano saraceno (Renzetti & Arendt, 2009).

Il CGT catalizza la scissione dei legami  $\alpha$ -1-4 glicosidici dell'amido e una simultanea ciclizzazione dei frammenti risultanti, portando a molecole circolari chiuse di 6, 7 o 8 unità di glucosio, rispettivamente riferite all'  $\alpha$ -,  $\beta$ - o  $\gamma$  -ciclodestrina. L'aggiunta del CGT permette di ottenere un prodotto con buon volume specifico, mollica soffice

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

e una riduzione del tasso di rafferimento. In un lavoro condotto da Gjuraj et al. (2003) si è visto come l' $\alpha$ -amilasi abbia incrementato il volume, tuttavia rendendo la mollica appiccicosa, mentre l'aggiunta di CGT ha esibito attività anti-rafferimento sulla mollica del pane di riso, maggiore rispetto a quella dovuta all' $\alpha$ -amilasi.

Nelle formulazioni senza glutine hanno trovato impiego tra gli enzimi anche le proteasi: esse hanno determinato risultati insoddisfacenti in quanto hanno prodotto effetti deleteri sulla struttura e sulla consistenza del pane formulato con farina di sorgo, grano saraceno e mais; gli effetti dannosi sono stati causati dalla degradazione delle proteine, con ottenimento di un impasto semi liquido scarsamente viscoelastico e con una scarsa capacità di trattenere i gas (Renzetti & Arendt 2009). Più recentemente è stata valutata l'aggiunta di farina pre-fermentata a opera dell'*Aspergillus oryzae*, aggiungendo una proteasi commerciale proveniente dallo stesso ceppo. L'aggiunta della proteasi ha incrementato la viscosità dell'impasto, migliorando, di conseguenza la ritenzione dei gas, il volume e l'aspetto (Hamada et al., 2013).

#### **1.12.4 Gli emulsionanti**

Gli emulsionanti non sono altro che additivi utilizzati nell'industria alimentare in generale, e in quella dei prodotti da forno. Essi hanno natura anfipatica, ciò significa che sono in grado di migrare e interfacciarsi tra due fasi immiscibili, riducendo la tensione superficiale e formando quindi un'emulsione (Nunes et al., 2009a) Il loro impiego è legato al miglioramento che apportano agli impasti e al pane, in termini di volume, riduzione della durezza della mollica e della velocità di rafferimento (Gray & Bemiller, 2003), inoltre aumentano l'assorbimento dei gas da parte dell'impasto, riducendo la tensione superficiale delle bolle gassose e ritardando il rafferimento, grazie all'interazione con i granuli di amido (Nunes et al., 2009a).

Sono stati sviluppati alcuni lavori in cui nella formulazione senza glutine sono stati impiegati gli emulsionanti. I risultati ottenuti variavano in relazione al tipo di emulsionante e alla quantità addizionata. In generale, la loro presenza migliora la qualità del pane, e più nello specifico, per quanto concerne l'aspetto, il volume e la consistenza, se addizionati nella giusta dose alla formulazione. Demirkesen et al. (2010b) hanno investigato sugli effetti dell'aggiunta combinata di diversi

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

emulsionanti sulla qualità del pane prodotto con farina di riso e lo 0.5% di DATEM, insieme allo 0.5% di gomma guar e 0.5% di xantano o xantano e farina di carrube alle medesime concentrazioni; dai risultati è emerso un incremento del volume, una texture migliore e un'accettabilità per quanto riguarda la texture con punteggi tra 4.5 e 5. In un differente lavoro sono stati scelti diversi additivi (enzimi, emulsionanti e idrocolloidi), per valutarne le proprietà sugli impasti e sul pane senza glutine; è stato possibile notare come il loro effetto abbia contribuito a diversificare le caratteristiche dei pani, e non sempre in maniera positiva, pertanto la loro presenza nella formulazione non è risultata essenziale nella produzione del pane senza glutine (Sciarini et al., 2012b). Sono stati valutati anche gli effetti dell'impiego di maltodestrine per ridurre la retrogradazione e l'indurimento della mollica (Witczak et al., 2010), amido modificato (Ziobro et al., 2012) e di additivi alimentari acidi con l'obiettivo di migliorare la consistenza e la struttura del pane (Blanco et al., 2011). I risultati ottenuti dall'aggiunta degli additivi nella formulazione dipendono dalle materie prime usate, dalla tipologia e quantità degli additivi, dalla quantità d'acqua, e dalle condizioni di processo.

### **1.13 Tecnologie per il miglioramento della qualità e della *shelf-life***

Le tecnologie atte al miglioramento della qualità del pane comprendono la lievitazione naturale, i processi ad alta pressione, il congelamento, la conservazione a freddo, la cottura parziale, il packaging in atmosfera modificata e l'utilizzo di imballaggi attivi con attività antimicrobica.

#### **1.13.1 Lievitazione naturale**

Il lievito naturale è costituito da farina, acqua e altri ingredienti, fermentati da batteri lattici e lieviti, in grado di indurre miglioramenti nel sapore, odore, valore nutrizionale, consistenza e *shelf-life* del pane. Tali benefici derivano da reazioni metaboliche dei lieviti e dei batteri lattici presenti nel lievito naturale, grazie alla produzione di eso-polisaccaridi (polimeri del saccarosio), all'acidificazione, all'attività enzimatica (proteolitica-amilolitica e fitasica), e alla produzione di composti antimicrobici (Moroni et al., 2009). La lievitazione naturale è abitualmente sfruttata con successo nella produzione di pane senza glutine a base di farina di

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

frumento e segale. È stato dimostrato il miglioramento della qualità dei prodotti da forno senza glutine, nello specifico, per quanto riguarda la texture del pane, e un ritardo nel raffermaimento, grazie all'attività anti-funginea, utilizzando farina e amido di mais, farina di riso e di grano saraceno (Pruska-Kedzior et al., 2008), farina di sorgo (Schober et al., 2007) e una miscela di amido di mais e farina di grano saraceno (Moore, Dal Bello & Arendt, 2008). Durante la fermentazione ad opera del lievito naturale alcuni batteri lattici producono una gamma di polimeri zuccherini a lunga catena (esopolisaccaridi). Essi variano nella struttura, composizione chimica e proprietà fisiche; sono in grado di migliorare la qualità del pane senza glutine, agendo da fattori prebiotici e idrocolloidi (Galle et al., 2012). In un lavoro di Coda et al. (2010) sono stati utilizzati dei batteri lattici in grado di sintetizzare acido  $\gamma$  - aminobutirrico (GABA, il maggiore neurotrasmettitore del sistema nervoso centrale) per ottenere un lievito naturale formulato con farina di amaranto, grano saraceno, quinoa e ceci, arrivando ad ottenere un prodotto con elevata accettabilità. Sui batteri lattici è stata investigata la proteolisi come strumento di degradazione del glutine, consentendo di ottenere alimenti a base di frumento per i soggetti affetti da celiachia (Di Cagno et al., 2008). Grazie a questa strategia è stato possibile scongiurare il rischio di una contaminazione da glutine.

### **1.13.2 Processi ad alta pressione**

I processi ad alta pressione hanno preso sempre più piede negli ultimi anni nelle tecnologie di produzione di pane senza glutine. Esso consiste in un trattamento non termico in cui gli alimenti vengono sottoposti all'alta pressione, dando origine a nuove strutture e texture, comprese la polimerizzazione delle proteine e la gelatinizzazione dell'amido (Vallons, Ryan & Arendt, 2011). Gli stessi autori hanno messo a punto uno studio in cui riso bianco, grano saraceno e teff sono stati sottoposti per 10 minuti a trattamenti a 200, 400 o 600 MPa; il trattamento ha prodotto la gelatinizzazione dell'amido e la polimerizzazione delle proteine da reazioni di scambio tiolo/disulfide negli impasti basati su riso bianco e teff; per quanto riguarda le proteine del grano saraceno tale meccanismo non si è verificato, a causa della mancanza di gruppi sulfidrilici. In ogni caso l'alta pressione ha prodotto un miglioramento delle proprietà viscoelastiche dell'impasto. In un differente lavoro un impasto a base di avena è stato

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari



trattato per 10 minuti a 200, 350 o 500 MPa, e aggiunta l'avena trattata ad alta pressione ad una formulazione senza glutine contenente farina di avena non trattata, e sostituendo il 10%, 20% ed il 40% della farina di avena non trattata. I risultati più soddisfacenti sono stati ottenuti con il 10% di avena trattata a 200 MPa che ha migliorato il volume della mollica, la struttura, l'aspetto, e ha ridotto la velocità di rafferimento. Tutti i trattamenti effettuati a 350 MPa hanno ridotto la qualità del pane (Huttner, Dal Bello & Arendt, 2010a). In un lavoro simile al precedente è stata sostituita la farina di sorgo non trattata, in misura del 2 e del 10%, con un impasto a base di sorgo trattato a 200 MPa per l'impasto più debole, e a 600 MPa per quello più forte. Per quanto riguarda il trattamento al 2% di sorgo trattato a 600 MPa è stato osservato un ritardo nei tempi di rafferimento, invece, per il pane contenente il 10% di farina di sorgo trattata si è visto una qualità globale scarsa e un volume ridotto. In generale i trattamenti ad alta pressione modificano le proprietà del pane rallentando anche la velocità di rafferimento.

### **1.13.3 Dimensione delle particelle della farina**

In uno studio condotto da de la Hera e collaboratori (2013) è stato studiato l'effetto della dimensione della farina di riso (fine e grossa) e dell'idratazione dell'impasto (utilizzando il 70, il 90 ed il 110% di acqua), che rappresenta uno dei parametri più critici nella panificazione senza glutine, sulle caratteristiche fisiche e sulla digestione enzimatica dell'amido del pane senza glutine. Le farine utilizzate, sono state setacciate in modo tale da avere due frazioni differenti, quella fine con una granulometria massima fino a 132  $\mu\text{m}$ , e quella cosiddetta grossa con particelle di dimensioni variabili tra 132 e 200  $\mu\text{m}$ .

Le classi di grandezza delle particelle sono state selezionate sulla base di ricerche precedenti (de la Hera et al., 2013c), in cui era stata studiata l'influenza della dimensione delle particelle della farina di mais sul pane senza glutine; lo studio aveva messo in evidenza che le particelle con dimensioni  $>180 \mu\text{m}$  avevano permesso al pane di raggiungere un volume più elevato ed una mollica più soffice.

I pani ottenuti dalle due differenti frazioni della farina di riso, sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico-fisico e reologico; è stato osservato come il volume specifico maggiore sia stato misurato nel pane prodotto con la farina grossa ad alte concentrazioni di acqua nell'impasto, benché i campioni con il 90 ed il 110% di acqua siano risultati simili (p-value  $>0.05$ ).

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

L'effetto dell'incremento dell'acqua nell'impasto sono stati più evidenti nei pani prodotti con la farina fine. Il volume specifico minore è stato osservato nei campioni ottenuti con la farina fine e il 70% di acqua, mentre quantità maggiori di acqua hanno portato alla formazione di grandi alveoli nella mollica, con un effetto più marcato nei campioni prodotti con la farina grossa.

Per quanto riguarda i parametri della *texture* della mollica, è stato osservato come i campioni di pane contenenti farina grossa, abbiano esibito una *hardness* minore rispetto a quelli prodotti con la farina fine. Una riduzione della *hardness* è stata registrata all'aumentare della quantità d'acqua nella formulazione, sebbene non vi sia stata differenza statisticamente significativa fra il 90 ed il 110% di acqua nell'impasto. Il pane con volume specifico ridotto, era caratterizzato da una durezza maggiore dovuta a una densità più importante della mollica e ad alveoli più compatti. Il parametro *cohesiveness* ha mostrato un incremento nel pane prodotto con farina fine. Valori elevati di *resilience* sono stati osservati nei pani prodotti con farina grossa e formulati con dosi maggiori di acqua. Complessivamente la combinazione migliore in termini di volume e *texture* della mollica risulta essere la frazione grossa accompagnata da una maggiore idratazione dell'impasto (90-110%)

Dal punto di vista nutrizionale, tuttavia, la combinazione migliore è stata ottenuta dal livello di idratazione più basso dell'impasto, con minore volume e una maggiore durezza per il pane. Inoltre, la riduzione dell'idratazione dell'impasto limita la gelatinizzazione dell'amido e la digeribilità dello stesso in vitro. Inoltre con la maggiore dimensione delle particelle è aumentata la quantità di amido idrolizzato e assorbito dall'intestino tenue (SDS) e dell'amido resistente (RS).

#### **1.13.4 Tempo di germinazione**

L'effetto del tempo di germinazione sulla qualità del pane senza glutine è stato valutato in uno studio condotto da Cornejo e Rosell nel 2015. Nell'esperimento sono state analizzate le caratteristiche chimico-fisiche della farina di riso integrale ed il suo effetto sulla qualità del pane senza glutine.

La prova di germinazione è stata effettuata a 28 ° C e 100% UR (umidità relativa) e condotta per 12, 24 e 48 ore; sono stati successivamente analizzati il riso integrale e il riso integrale ottenuto imbibendo il riso in acqua distillata.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

La capacità di legare l'acqua (WBC), la capacità di ritenzione idrica (WHC) e il volume di rigonfiamento (SV) sono proprietà fondamentali per il processo di panificazione e diventano sempre più importanti per la produzione di prodotti senza glutine.

È stata osservata una tendenza decrescente nelle proprietà di idratazione della farina (WBC, WHC e SV) con l'aumentare del tempo di germinazione, sebbene tale diminuzione fosse significativa solo nel caso di WBC. La capacità di ritenzione idrica (WHC) del campione di riso imbibito è risultata significativamente inferiore a quella dei campioni germinati per 12 e 24 ore. L'indice di assorbimento dell'acqua (WAI) e la forza di rigonfiamento (SP) non sono state significativamente influenzate dal tempo di germinazione, ad eccezione della germinazione a 48 ore.

Al contrario, l'indice idrosolubile (WSI) è aumentato all'aumentare del tempo di germinazione. La capacità di assorbimento dell'olio (OAC) è rimasta costante fino a 24 ore di germinazione e solo dopo 48 ore è stato osservato un aumento.

Per quanto riguarda il profilo di *pasting*, gli autori hanno osservato una progressiva riduzione della viscosità durante la fase di riscaldamento e di raffreddamento al procedere della germinazione, come osservato per i campioni imbibiti. Infatti dopo 12 ore di germinazione è stato rilevato solo un leggero aumento della viscosità di picco, mentre a 48 ore vi è stata una drastica riduzione della viscosità causata dalla degradazione dei granuli di amido. La germinazione ha ridotto la capacità dell'amilosio alla retrogradazione, il che potrebbe risultare utile per ridurre la tendenza del pane al raffermaimento. Nella panificazione senza glutine, la farina di riso possiede quindi un'adeguata funzionalità per il suo utilizzo come materia prima. La germinazione ha infatti mostrato effetti significativi sulle proprietà della farina e conseguentemente sulla qualità del pane. Dopo 24 ore di germinazione è stato osservato un miglioramento nella *texture* del pane, la quale potrebbe essere attribuita all'aumento delle attività di amilasi e alla degradazione dell'amido. Sono stati osservati miglioramenti anche nella colorazione del pane grazie alla reazione di imbrunimento non enzimatico. Tuttavia, l'eccessiva germinazione (48 ore) ha reso la farina non adatta alla panificazione.

### 1.13.5 Tecnologie per il miglioramento della *shelf-life*

La *shelf-life* del pane è influenzata dal rafferimento, perdita di umidità e deterioramento microbico. Il rafferimento del pane coinvolge l'indurimento del pane e dipende da diversi fattori, quali re-cristallizzazione dell'amilopectina e dalla migrazione/re-distribuzione dell'umidità (Gray & Bermiller 2003). La *shelf-life* del pane senza glutine è limitata a causa dell'assenza di glutine e il trasferimento dell'acqua dalla mollica alla crosta è più accentuata, con conseguente perdita di umidità (Gallagher et al., 2003b).

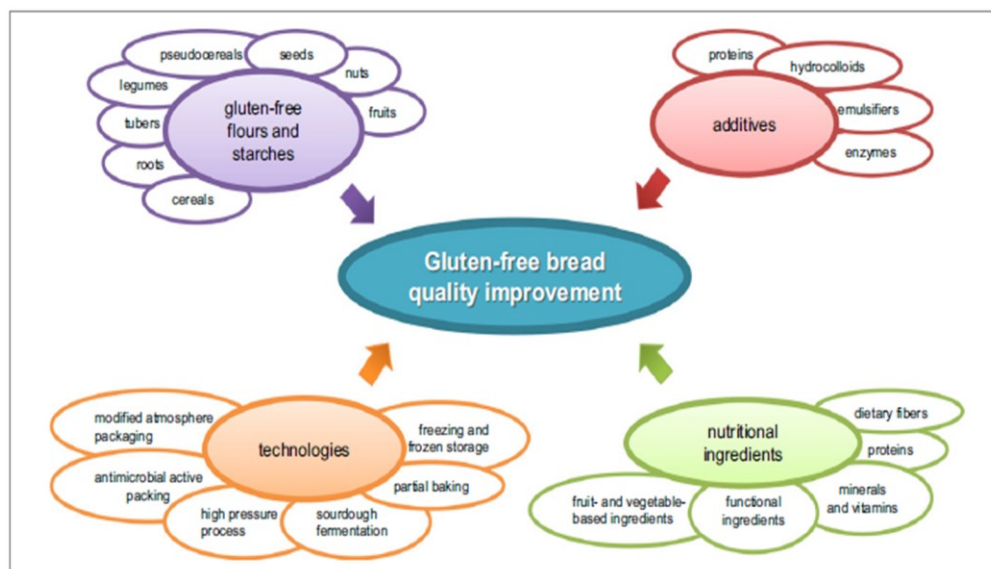
Due particolari strategie di conservazione sono state sviluppate per prolungare la *shelf-life* del pane e ridurre la proliferazione microbica, causa del precoce deterioramento del pane. La prima strategia è basata sull'utilizzo di imballaggi attivi a base di olio essenziale di cannella, dotato di proprietà antimicrobiche, mentre la seconda, sulla conservazione mediante atmosfera modificata (60% CO<sub>2</sub> e 40% N<sub>2</sub>), e la combinazione delle due tecniche. I risultati hanno mostrato un incremento della *shelf-life* dovuto all'olio essenziale di cannella, che ha inibito la proliferazione microbica, conservando inoltre, le proprietà sensoriali. I risultati ottenuti gettano le basi per ulteriori studi attraverso i quali si valuteranno le condizioni ottimali per ogni formulazione senza glutine, al fine di fornire un'accettabilità e una sicurezza microbiologica maggiore al consumatore (Gutierrez et al., 2011). È stato osservato un più veloce rafferimento del pane senza glutine formulato con farina di riso e con il 2% di HPMC, tenuto a temperatura ambiente e refrigerato a 20° e 4° C. I campioni sono stati congelati e tenuti a -28°C per 7 giorni e dopo scongelati; il pane ha conservato proprietà simili a quelle del pane fresco, con piccoli effetti sulla *texture* della mollica.

In un lavoro portato avanti da Sciarini et al., (2012a) è stato valutato l'effetto della cottura parziale del pane senza glutine e come l'aggiunta della gomma xantano e del CMC abbia influenzato il processo. La tecnologia della cottura parziale si divide in una cottura iniziale di 25 minuti, conservazione a 4° C per 7 giorni e una cottura finale per 15 minuti; i risultati ottenuti sui pani erano paragonabili a quelli cotti convenzionalmente. La cottura parziale ha portato alla riduzione del volume specifico, a un aspetto più denso della mollica che si è mostrata anche più dura. L'aggiunta di idrocolloidi potrebbe ovviare ai problemi scaturiti dalla cottura interrotta. I processi di congelamento e cottura parziale si adattano bene al consumo in casa del pane, che può essere congelato e scongelato, così da

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

poter essere consumato in base alle necessità, anche se è necessario sviluppare delle strategie atte al miglioramento della qualità e per l'accettabilità da parte del consumatore.



**Figura 3:** Strategie per il miglioramento della qualità del pane senza glutine

### 1.14 Indice glicemico

L'indice glicemico (IG) è stato sviluppato nel 1981 dal dottor David Jenkins dell'Università di Toronto come metodo per standardizzare la risposta glicemica ai carboidrati (zuccheri e amido) e gli alimenti contenenti carboidrati (prodotti cerealicoli, frutta, verdure, derivati del latte); esso descrive la risposta glicemica in seguito all'ingestione di 25g o 50g di carboidrati contenuti in un alimento, rispetto a 25g o 50g di carboidrati contenuti in un alimento di riferimento (pane bianco o glucosio), consumati dallo stesso individuo (Jenkins et al., 1981). Il carico glicemico (CG) ( $IG \times \text{il contenuto dei carboidrati ingeriti con la dieta}$ ) (Salmeron et al., 1997), insieme all'indice glicemico vengono utilizzati come strumenti per classificare e comparare gli alimenti in base alle loro risposte post-prandiali.

L'intestino è in grado di trasformare e scindere tutti i carboidrati provenienti dal cibo in monosaccaridi, in modo tale da poter attraversare la parete intestinale, e accedere al flusso ematico il quale li convoglia verso il fegato, convertendoli in glucosio.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

Il fegato è in grado di indirizzare il glucosio al flusso ematico, a scopo energetico; se invece nell'organismo vi è una quantità di glucosio superiore al fabbisogno cellulare, il fegato trasforma il glucosio in glicogeno per essere immagazzinato come sostanza di riserva; il glucosio rimanente nel sangue viene convertito in grasso e conservato negli adipociti dell'organismo. Affinché il glucosio del sangue non superi determinati valori, le cellule  $\beta$  del pancreas, producono l'insulina, mentre le cellule  $\alpha$ , secernono il glucagone. Entrambi gli ormoni lavorano in sinergia, in modo tale da mantenere costante il livello di glucosio nel sangue. Pertanto, quando si verifica un'assunzione eccessiva di carboidrati, la glicemia tende ad aumentare, innescando il rilascio dell'insulina, la quale riporta i livelli di glucosio all'equilibrio. Il picco insulinico è tanto maggiore quanto più alto è l'indice glicemico dei carboidrati assunti (Sito 13).

#### **1.14.1 Indice glicemico del pane senza glutine**

L'indice glicemico dei prodotti da forno senza glutine, e quindi anche del pane, risulta elevato, a causa dell'elevato contenuto zuccherino, poiché realizzati da sfarinati con un livello di raffinazione maggiore, a discapito di altri nutrienti. Dal momento che la celiachia è associata ad un'alta incidenza di diabete di tipo 1 (Murray, 2005), il mantenimento di un adeguato livello glicemico nel sangue, osservando scrupolosamente la dieta priva di glutine, è fondamentale per i soggetti affetti contemporaneamente da celiachia e diabete di tipo 1. Inoltre, l'assenza del glutine influenza la digestione degli amidi, innalzando la risposta glicemica post-prandiale (Scazzina et al., 2014).

Le informazioni relative all'indice glicemico dei prodotti senza glutine sono tuttavia ancora scarse. L'IG del pane bianco senza glutine è pari a circa  $76 \pm 5$ , quello del pane senza glutine multicereale è  $79 \pm 13$ , mentre quello relativo al pane senza glutine arricchito in fibre si riduce a  $73 \pm 4$  (Camarca et al., 2012); tale valore deriva dal fatto che la presenza delle fibre nella formulazione permette un maggiore assorbimento dell'acqua, formando un gel capace di ridurre l'indice glicemico e il colesterolo, limitando anche il rischio di insorgenza del diabete di tipo 2 nelle donne (Schulze et al., 2004).

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

## **1.15 Il miele**

### **1.15.1 Definizione**

In base al Decreto Legislativo n° 179/2004, attuazione della direttiva CE n° 110/2001, inerente la produzione e la commercializzazione del miele, esso viene definito in questo modo: “Per miele si intende la sostanza dolce naturale che le api (*Apis mellifera*) producono dal nettare di piante o dalle secrezioni provenienti da parti vive di piante o dalle sostanze secrete da insetti succhiatori che si trovano su parti vive che esse bottinano, trasformano, combinandole con sostanze specifiche proprie, depositano, disidratano, immagazzinano e lasciano maturare nei favi dell’alveare”.

In relazione alla definizione sopra citata, risulta chiara come l’origine e le differenze tra mieli derivino dalla specie botanica da cui il nettare è stato sottratto, e non dall’intervento e dalla manipolazione delle api.

È possibile distinguere tre diverse tipologie di miele, le quali si differenziano in base alla composizione botanica: miele uniflorale, miele millefiori e miele di melata; il miele uniflorale si origina da una sola specie vegetale, presentando caratteristiche ben definite e “ripetibili”; il miele millefiori è il risultato di nettari provenienti da varie specie botaniche i quali conferiscono, ciascuno con le proprie caratteristiche, sapori e odori unici; infine, il miele di melata viene prodotto dalla melata che le api raccolgono sulle piante (Palmieri et al., 2017).

### **1.15.2 Composizione chimica**

Il miele è un composto complesso costituito per gran parte da zuccheri, soprattutto fruttosio e glucosio, e da altri componenti quali sostanze azotate (amminoacidi liberi, proteine ed enzimi), acidi organici, sostanze minerali e acqua; in misura minore si riscontrano, invece, vitamine, lipidi, sostanze aromatiche, composti fenolici e HMF (idrossimetilfurfurale).

#### **1.15.2.1 Componenti primari**

##### **Acqua**

L’acqua è uno dei componenti più importanti presenti nel miele, in quanto condiziona la conservabilità e influenza la qualità del prodotto. Il contenuto ottimale d’acqua si aggira

---

Angela Scanu– Studio dell’influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum “Biotecnologie microbiche agroalimentari”* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

intorno al 17%; mieli caratterizzati da un contenuto d'acqua superiore al 18%, possono andare incontro a fermentazione e non essere più commerciabili, mentre mieli con un contenuto d'acqua inferiore al 15%, allo stato liquido risultano molto viscosi, allo stato cristallizzato esibiscono una massa compatta e pesante da lavorare, tuttavia in commercio è possibile trovare mieli con un contenuto d'acqua variabile dal 14% al 20% e oltre, nonostante il limite stabilito dalla legge sia del 20%, salvo fatte alcune eccezioni (Decreto Legislativo n° 179/2004).

### **Zuccheri**

Gli zuccheri rappresentano circa il 95% della sostanza secca del miele; dal contenuto di zuccheri dipendono diversi fattori chimici e alimentari del miele, quali l'igroscopicità, la viscosità, lo stato fisico (cristallizzato o liquido), il potere dolcificante ed il valore energetico. Gli zuccheri maggiormente presenti nel miele sono il fruttosio ed il glucosio, direttamente provenienti dall'idrolisi del saccarosio, e insieme costituiscono circa il 90% degli zuccheri totali, con una concentrazione maggiore di fruttosio rispetto al glucosio. Oltre a fruttosio e glucosio, sono presenti piccolissime quantità di altri zuccheri (di-, tri-, e polisaccaridi).

### **Acidi organici**

Il quantitativo di acidi nel miele è relativamente basso; esso determina il pH (compreso tra 3.5 e 5.5, più bassi nei mieli ottenuti da melata), contribuendo anche alla formazione dell'aroma complessivo. L'importanza della presenza degli acidi nel miele condiziona la sua stabilità microbiologica, dipendente anche dalla concentrazione zuccherina, la quale definisce una pressione osmotica maggiore. Parte degli acidi organici proviene dall'elaborazione del miele per manipolazione delle api, mentre altri si trovano già nel nettare o nella melata. L'acido più importante dal punto di vista quantitativo, è l'acido gluconico, derivato del glucosio; altri acidi sono rappresentati da acido acetico, citrico, lattico, malico, formico, ecc..

### **Composti azotati**

Nel miele sono presenti composti azotati rappresentati da amminoacidi liberi, proteine ed enzimi, in percentuale intorno allo 0.2-0.3%, tuttavia esso contiene quasi tutti gli amminoacidi essenziali e proteine di origine diversa. Una frazione proteica si trova già nel

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari



nettare o nella melata, l'altra deriva dai granuli pollinici (le cui pareti, non a caso sono formate da proteine), alcuni amminoacidi, invece, provengono dalle secrezioni ghiandolari che le api apportano durante il processo di formazione del miele. Per quanto riguarda gli enzimi, anch'essi si trovano già nel nettare o nella melata, o prodotti dalle api. La presenza degli enzimi nel miele è determinante, in quanto contribuisce alla sua formazione, partendo dal nettare o dalla melata. Oltre a ciò, la quantificazione degli enzimi del miele, riveste una notevole importanza in termini di qualità, rendendo quindi possibile la valutazione della freschezza del prodotto o rappresentando un indice di eventuali trattamenti termici, poiché essi si degradano con il passare del tempo e con il calore. I più importanti enzimi del miele sono: l'invertasi, che converte il saccarosio presente nel nettare e nella melata in glucosio e fruttosio, la glucosio-ossidasi che catalizza la reazione di ossidazione del glucosio, formando acido gluconico (l'acido più importante nel miele) e acqua ossigenata (con azione batteriostatica) e infine la diastasi, cioè un'amilasi, in parte di origine animale e in parte vegetale che converte l'amido in glucosio.

#### **1.15.2.2 Componenti secondari**

I componenti secondari sono quelli la cui composizione chimica è molto diversa tra loro, e si possono trovare in alcuni tipi di miele o in tutte, in quantità molto ridotte, ma in ogni caso molto importanti.

#### **Lipidi**

I lipidi si trovano in quantità irrilevante; si tratta di steroli, fosfolipidi, gliceridi, acidi grassi (acido palmitico e oleico) e piccoli frammenti di cera provenienti dai favi durante la fase di estrazione del miele, o di granuli di polline comunque presenti nel miele.

#### **Vitamine**

Le vitamine sono presenti in quantità pressoché irrilevante dal punto di vista nutrizionale; esse provengono dal polline contenuto nel miele; tutte le vitamine del miele sono idrosolubili e sono rappresentate in modo particolare dalla vitamina C e da alcune vitamine del gruppo B.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

## **Sali minerali**

Il quantitativo di sostanze minerali varia tra le diverse tipologie di miele, benché esso sia in generale piuttosto basso (da 0.02 a 1%). Esso risulta più ridotto nei miele di nettare (0.1-0.3%), mentre si osserva decisamente più elevato nei mieli di melata (1%).

L'elemento presente in maggior misura è il potassio, che rappresenta il 50 o addirittura il 75% del totale delle sostanze minerali. Sono presenti in misura più ridotta il sodio, il calcio, il fosforo, lo zinco, il ferro, il rame ed il manganese, mentre sono presenti in tracce il cloro, il fluoro, il cobalto, l'alluminio, ecc..

## **Composti aromatici**

I composti aromatici osservati nel miele sono sostanze che ne definiscono l'aroma e l'odore; è stato scoperto come essi abbiano origine dalle piante in cui è stato prelevato il nettare e in minima parte trasferiti dalle api. Tutt'oggi sono noti circa 600 composti aromatici, identificati in diversi mieli, rappresentati da aldeidi, chetoni, alcoli, anch'essi in grado di apportare un contributo nella composizione dell'aroma. Tali sostanze, tuttavia, hanno natura volatile e termolabile, per cui vanno facilmente incontro a degradazione.

## **HMF (Idrossimetilfurfurale)**

L'HMF è un composto che si forma in seguito all'estrazione del miele, a causa della degradazione degli zuccheri, in particolare del fruttosio, e tanto più rapidamente quanto più alta è la temperatura di conservazione e più basso è il pH del miele. La quantità di HMF, aumenta quando la temperatura di conservazione è superiore a 25-30° C, o se viene sottoposto a drastici trattamenti termici di lavorazione.

## **Composti fenolici**

Le sostanze fenoliche, sono provenienti dal regno vegetale e contribuiscono alla determinazione botanica del miele, nonché alla definizione dell'aroma, e delle proprietà organolettiche e chimico-fisiche. Questi composti si trovano in quantità molto basse e sono rappresentati da esteri, acidi fenolici, flavanoni, flavoni, flavanoli, flavonoidi e fenoli; tali componenti fenoliche concorrono alla definizione del colore del miele e degli aromi, grazie all'interazione con carotenoidi, xantofille e antociani. Alcuni componenti fenolici trovati nel miele, si ipotizza abbiano origine dalla propoli, di cui sono costituenti

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

caratteristici (Bortolotti & Marcazzan, 2017; Palmieri et al., 2017).

### **I polifenoli nel miele**

I polifenoli nel miele sono rappresentati da acidi fenolici e suoi derivati. I più importanti polifenoli identificati nel miele sono l'acido gallico, caffeico, idrossibenzoico, vanillico, p-cumarico, benzoico, ellagico, e feralico, estere fenilico dell'acido caffeico (Mattila & Kumpulainen, 2002).

## Capitolo 2

### Scopo del lavoro

Lo scopo del mio lavoro di dottorato era quello di sviluppare un pane senza glutine, variando la concentrazione della sostanza zuccherina totale del prodotto a diverse dosi di utilizzo, e impiegando il miele come sostituto parziale o totale del saccarosio (normalmente presente nel pane senza glutine), mirando a migliorare le proprietà reologiche, sensoriali e nutrizionali, aumentando l'attività antiossidante del prodotto grazie alla presenza dei polifenoli nel miele, e riducendone l'indice glicemico (IG); infatti i prodotti da forno senza glutine sono caratterizzati da un elevato contenuto zuccherino, a discapito di altri nutrienti, innalzando, di conseguenza, la glicemia e contribuendo all'insorgenza del diabete di tipo 1 nei soggetti celiaci. Il miele vanta un indice glicemico inferiore rispetto al saccarosio. In accordo con la più recente tabella dei valori dell'indice glicemico, (Atkinson, Foster-Powell & Brand-Miller, 2008), l'indice glicemico per il miele è pari a  $61 \pm 3$ , mentre quello del saccarosio è pari a  $65 \pm 4$ . È evidente che tale differenza dipende anche dal fatto che a parità di peso tra saccarosio e miele, quest'ultimo risulta composto anche da altri elementi, quali l'acqua, sali minerali, vitamine, ecc, e non da soli zuccheri. La scelta dell'utilizzo del miele deriva dalle proprietà sopra descritte, che lo contraddistinguono, e dal fatto che in letteratura non esistano lavori che facciano riferimento al suo utilizzo nella panificazione senza glutine. Tuttavia gli unici lavori reperiti riguardano il pane tradizionale. Da un primo lavoro, è emerso che utilizzando il miele in polvere in misura del 5- 10% è stato ottenuto un miglioramento della qualità del pane in termini di incremento della *shelf-life* e un ritardo nell' indurimento; a tali % il miele ha conferito al pane un volume più elevato, una mollica più soffice ed un colore più giallo (Tong et al., 2010); è stato osservato, inoltre, che se utilizzato come miglioratore non convenzionale in impasti congelati lievitati (con lievito madre, in combinazione con crioprotettori e altri additivi), rivesta un ruolo protettivo nei confronti della maglia glutinica (Minervini et al., 2011; Addo, 1997). Inoltre la sostituzione del miele in dosi che variavano dal 10 al 50%, in pane a base di cassava e frumento, ha portato a un significativo miglioramento ( $p < 0.05$ ) del gusto, del colore e dell'accettabilità complessiva. Il livello di sostituzione del miele al 30% è stato il preferito in termini di

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

gusto e di accettabilità complessiva mentre il livello di sostituzione del miele del 20% è stato prescelto in termini di colore (Adeboye et al., 2013).

In un lavoro più recente portato avanti da Babajide et al. nel 2014, su una tipologia di pane di frumento e cassava, si è visto che sostituendo lo zucchero con miele liquido in misura del 30%, sia stato registrato il volume più elevato rispetto a quello osservato sugli altri campioni ottenuti con differenti livelli di sostituzione.

Il progetto di ricerca prevedeva la produzione di pane senza glutine utilizzando il miele come parziale o totale sostituto del saccarosio, partendo da una percentuale zuccherina dell'1% fino ad un massimo del 9% sulla base % dello sfarinato (rappresentato dalla farina di riso e dall'amido di mais). Sono state ottenute 9 tipologie differenti di pane, derivanti dalle diverse concentrazioni di sostanza zuccherina (1%, 5%, 9%) e dalla percentuale di sostituzione zucchero/miele (0%, 50%, 100%). La dose zuccherina massima utilizzata era del 9%, in quanto quella massima trovata in letteratura (Pongjaruvat et al., 2014).

## Capitolo 3

### Materiali e metodi

#### 3.1 Materie prime utilizzate

Ai fini della sperimentazione, sono stati utilizzati gli ingredienti riportati in tabella 1. Le quantità utilizzate sono state calcolate in base alla percentuale degli sfarinati (amido di mais e farina di riso).

**Tabella 1:** Ingredienti utilizzati nel processo di panificazione

Ingredienti	Quantità utilizzata % (*)
Farina di riso	50%
Amido di mais	50%
Gomma guar	1.5%
Fibra di psyllium	1.5%
Olio di girasole	6%
Lievito di birra	3%
Cloruro di sodio	1.8%
Saccarosio	(in base alla tesi presa in esame)
Miele millefiori	(in base alla tesi presa in esame)
Acqua distillate	90%

*\*determinato come percentuale sulla base degli sfarinati*

**Tabella 2:** Composizione approssimativa chimica e nutrizionale degli ingredienti senza glutine (Fonte: Collar et al., 2015)

Ingredienti	Umidità	Proteine	Grassi	Ceneri	Carboidrati digeribili	Fibra alimentare totale
	Ingredienti (g/per 100g di prodotto)					
<b>Farina</b>						
<b>Riso</b>	14	7.1	1.3	0.8	76.5	0.22
<b>Amido</b>						
<b>Mais</b>	12	0.3	0	0	88	0
<b>Fibra alimentare</b>						
<b>Gomma Guar</b>	7	5	0	1	0	88
<b>Fibra di Psyllium</b>	10	2.5	0.5	2	4	81 <sup>1</sup>
<b>Tensioattivi</b>						
<b>Olio di girasole</b>	0	0	92 <sup>2</sup>	0	0	0

<sup>1</sup>44 fibra solubile, 36 fibra insolubile.

<sup>2</sup>11.1% grassi saturi.

**Tabella 3:** Composizione chimica e nutrizionale del miele millefiori

<b>Ingredienti</b>	<b>g/100 g</b>
Grassi	0
Di cui acidi grassi	0
Carboidrati	80
Di cui zuccheri	8
Proteine	0
Sale	0

### **3.2 Processo di panificazione**

L'amido, la farina e le fibre alimentari sono stati versati nella planetaria ed è stata avviata l'impastatrice (Kitchen Aid Professional 1.3 HP Motor) a velocità 1, in modo tale da miscelare le polveri a secco per qualche secondo; successivamente sono stati aggiunti gradualmente l'olio di girasole, le soluzioni di acqua e zucchero e/o miele, acqua e sale, ed infine la soluzione di acqua e lievito, tutte precedentemente sciolte; l'impastamento è avvenuto in una prima fase a velocità 1 per 5 minuti, ed in una seconda fase a velocità 2, sempre per 5 minuti; al termine, l'impastatrice è stata bloccata in modo tale da rimuovere l'impasto dalla frusta e quindi è stata riavviata alla stessa velocità, per 3 minuti aggiuntivi. L'impasto formato è stato distribuito all'interno di cassette, le quali sono state alloggiare nella cella di lievitazione (Tecnomac) per il tempo necessario ad un aumento del volume circa del doppio dell'impasto, per un periodo di tempo variabile (in base alla prova sperimentale), a 30° C e al 90% di umidità relativa. Al termine della fermentazione le cassette sono state infornate a 200° C per 70 minuti, in forno elettrico (Europa bakery&pastry). Una volta trascorso il tempo necessario alla cottura, il pane è stato lasciato raffreddare per almeno 2 ore in modo tale da essere sottoposto alle analisi successive.

### **3.3 Codifica dei campioni**

I campioni sono stati codificati nel modo seguente per quanto riguarda la sostanza zuccherina totale:

Controllo all'1% di sostanza zuccherina totale: CZ (1%)

Controllo al 5% di sostanza zuccherina totale: CZ (5%)

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari



Controllo al 9% di sostanza zuccherina totale: CZ (9%)

E per la % di sostituzione zucchero-miele:

0% di sostituzione: SM (0%)

50% di sostituzione: SM (50%)

100% di sostituzione: SM (100%).

### **3.4 Analisi sugli impasti**

#### **3.4.1 Monitoraggio del tempo di fermentazione**

50 g di impasto sono stati distribuiti all'interno di un cilindro graduato, livellando con l'ausilio di una spatola, e posti in cella di lievitazione per il monitoraggio del tempo di fermentazione. Il monitoraggio è stato effettuato a intervalli di tempo regolari, così ripartiti:

- il primo è stato osservato dopo 15 minuti dall'introduzione dei cilindri e delle cassette nella cella di lievitazione;
- i successivi controlli sono stati effettuati a intervalli di 10 minuti fino al raggiungimento di un valore pari a 110 mL, valore al quale corrispondeva il raddoppio del volume dell'impasto.

Il monitoraggio del tempo di fermentazione si è protratto oltre il tempo necessario al raddoppio del volume, in maniera tale da valutare anche il tempo al quale l'impasto è andato incontro a collasso.

L'analisi è stata effettuata in doppio.

#### **3.4.2 Misurazione del pH pre e post- fermentazione**

Una piccola quantità di impasto è stata utilizzata per la misurazione del pH, prima dell'inizio del processo fermentativo e al suo termine, utilizzando il misuratore di pH Orion model 230 A e una sonda per alimenti solidi. La misurazione è avvenuta in doppio.

### **3.5 Analisi sul pane fresco**

#### **3.5.1 Volume specifico**

Il volume specifico di ogni pane è stato calcolato come il rapporto tra il volume del pane ed il suo peso (mL/g). Il volume è stato determinato in seguito al raffreddamento del pane, utilizzando il metodo standard AACC 10-05.01 o metodo del *Rapeseed Displacement*

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

(AACC, 2005) adattato. I campioni di pane sono stati alloggiati in una vaschetta per uso alimentare a volume noto, precedentemente riempito con dei semi di colza. Il volume occupato dai semi di colza (mL), è stato sostituito dal pane e corrisponde al volume occupato dal pane stesso.

### **3.5.2 Determinazione dei parametri colorimetrici e dell'indice di imbrunimento della crosta e della mollica**

Il colore della crosta e della mollica sono stati misurati utilizzando il colorimetro (Minolta, Osaka Japan CR-300), prendendo in considerazione i parametri colorimetrici, luminosità ( $L^*$ ), indice di rosso ( $a^*$ ), e indice di giallo ( $b^*$ ) e l'indice di imbrunimento (IB). L'indice di imbrunimento viene definito come il grado di purezza del colore marrone di un alimento (Buera et al., 1986) ed è stato calcolato con la formula  $100-L$ . I risultati relativi ai parametri colorimetrici misurati, sono stati espressi in accordo con lo spazio di colore della scala Hunter Lab. Le misurazioni sono state effettuate su tre zone differenti della crosta (parte centrale e estremità) di sei pagnotte per singolo campione.

### **3.5.3 Attività dell'acqua ( $a_w$ )**

L'attività dell'acqua ( $a_w$ ) rappresenta il rapporto tra la pressione di vapore presente al di sopra dell'alimento ( $p_v$ ), ad una certa temperatura, e la pressione di vapore dell'acqua pura ( $P^*$ ) alla medesima temperatura (Mathlouthi, 2001).

$$a_w = \frac{p_v}{P^*}$$

Essa indica il grado in cui l'acqua è "legata" a un alimento, e quindi la disponibilità a comportarsi come solvente e partecipare a reazioni chimiche, biochimiche e alla proliferazione dei microrganismi nei processi di produzione, imballaggio e conservazione alimentare. Conoscere il valore dell'attività dell'acqua consente di predire quali microrganismi saranno fonte di deterioramento e infezione, mantenere la stabilità negli alimenti, ridurre al minimo le reazioni di imbrunimento non enzimatiche e di ossidazione lipidiche spontanee, prolungare l'attività di vitamine ed enzimi negli alimenti e ottimizzare le proprietà fisiche dell'alimento come la *texture* e la *shelf-life* (Fontana, 2000).

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

Per la misurazione dell'attività dell'acqua ( $a_w$ ) la mollica del campione è stata sminuzzata e posta all'interno di una capsula di plastica e utilizzando un igrometro elettronico (Hygroskop BT-RS1). La misurazione dell'attività dell'acqua è avvenuta in triplo per ogni singolo campione ed i valori sono stati riportati in RH %.

### 3.5.4 Contenuto di umidità

Il contenuto di umidità è stato calcolato in due step in accordo con *Approved Method 44-15A* (AACC International 2010). Nel 1° step sono state sminuzzate 2 fette di pane provenienti da due pagnotte, e poste all'interno di una vaschetta per alimenti, la quale è stata pesata e posta sopra una stufa per facilitare l'essiccazione del campione, per un periodo di 24/48 ore a seconda del tasso dell'umidità esterna. Una volta essiccato il campione, le vaschette sono state lasciate raffreddare prima di essere nuovamente pesate. Sono stati annotati i valori del peso iniziale (relativo al pane fresco) e del peso finale (relativo al pane essiccato), ed è stata calcolata la differenza tra i 2, per ottenere un primo valore.

La formula per il calcolo del contenuto di umidità è la seguente:

$$\%U_t = A + \frac{(100 - A) * B}{100}$$

La misurazione del contenuto di umidità è stata eseguita in doppio per ogni singolo campione.

## 3.6 Analisi reologiche sugli impasti

### 3.6.1 Determinazione delle proprietà reologiche empirico-imitative degli impasti tramite RVA

#### Operazioni preliminari

100 grammi di impasto sono stati pesati all'interno di vaschette per uso alimentare (sono stati annotati i valori dei pesi) e tenute a  $-80^{\circ}$  C per una notte; in seguito i campioni sono stati trasferiti all'interno di un liofilizzatore per una settimana, nuovamente pesati per verificare l'entità della perdita di umidità, e quindi macinati finemente con un mixer (Moulinex A320R1/AP0-5315R). Il Rapid Visco Analyser (RVA-4, Newport Scientific, Warriewood, Australia) metodo 162 dell'ICC Standard è stato utilizzato per valutare le proprietà di *pasting* degli impasti senza glutine. Circa 3.5 g di campione è stato

---

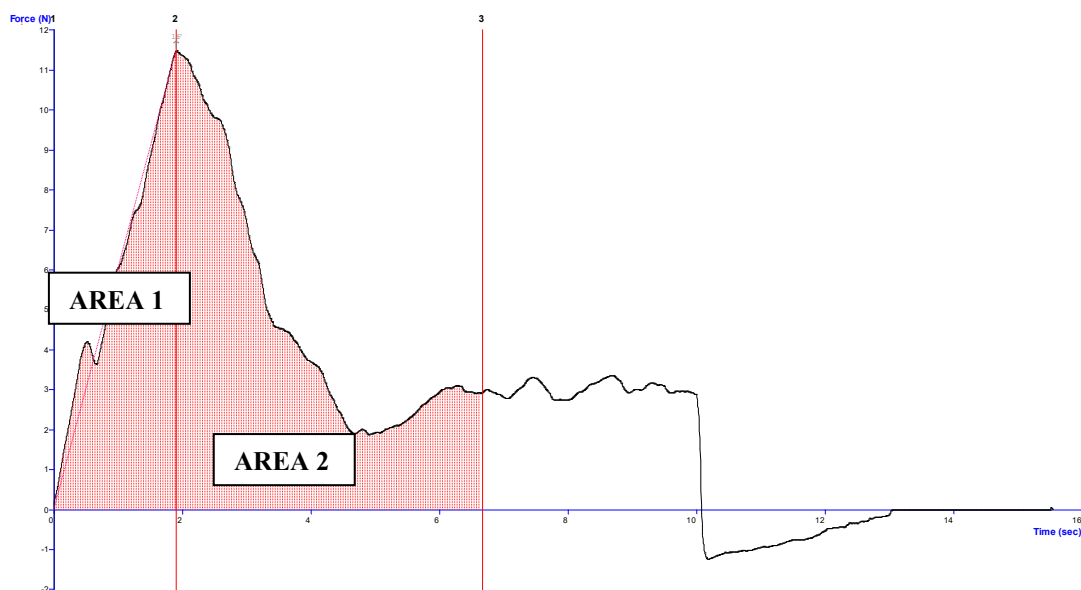
Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

polverizzato accuratamente e pesato nel contenitore di alluminio (*canister*) di prova a cui sono stati aggiunti 25 ml di acqua distillate, tenendo conto di un'umidità finale del 14%, ed il contenuto è stato miscelato accuratamente per evitare la formazione di grumi. Il canister è stato quindi posizionato nello strumento il quale è stato poi avviato. I risultati sono stati automaticamente tracciati in tipiche curve da cui sono stati dedotti i profili di *pasting* (temperature, peak viscosity, hold viscosity, final viscosity, visc@, breakdown, setback 1 e setback 2). Tutti i parametri sono stati calcolati dalle curve di *pasting* utilizzando il software Thermocline v.2.2 (Collar, 2003). Ogni misurazione è stata effettuata in doppio.

### 3.7 Analisi reologiche empirico-imitative sul pane fresco

#### 3.7.1 *Puncture test* (Test di penetrazione)

Il test di penetrazione è stato eseguito sulla crosta utilizzando la sonda in acciaio inox SPMS/3 con il dinamometro texture analyser (Stable Micro System, Surrey, UK); l'analisi è avvenuta su tre parti diversi del pane: la prima nella parte centrale, la seconda e la terza alle due estremità. La velocità del pre-test era di 10 mm/sec, quella del test e del post-test di 3 mm/sec, con una distanza di 30 mm e una trigger force pari a 5 g. I parametri presi in considerazione sono stati: la forza (N), il gradiente (N/sec), l'area 1 (mm<sup>2</sup>) e l'area 2 (mm<sup>2</sup>) deducibili attraverso la curva in figura 4.



**Figura 4:** Tipica curva di penetrazione di un campione di pane

### 3.7.2 TPA (*Texture Profile Analysis*)

La terminologia della TPA è il frutto del lavoro di Szczesniak, nel 1963, il quale ha definito i parametri della TPA, come durezza, coesione, elasticità, adesività, gommosità, resilience e masticabilità.

Tuttavia, molti autori hanno proposto varie modifiche ai loro nomi o alle definizioni date. Tutti i parametri primari e secondari sopra descritti, sono stati determinati attraverso il test della TPA.

Le fette di spessore di 3 cm sono state compresse al 50% della loro altezza originale in un test di doppia compressione di “*Texture Profile Analysis*” (TPA) a una velocità di 1 mm/s, con un ritardo di 30 secondi tra la prima e la seconda compressione. Le proprietà primarie (*hardness*, *cohesiveness*, *springiness* e *resilience*) e *chewiness* (proprietà meccanica secondaria) sono state calcolate dal grafico TPA. Le misurazioni sono state effettuate su sei fette centrali di due pani preparati al giorno 0 (due ore dopo la cottura).

L’analisi è stata effettuata utilizzando il dinamometro texture analyser TA-XT2i (Stable Micro System, Surrey, UK) con una sonda in acciaio inox di 20 mm di diametro. I parametri che sono stati presi in considerazione sono la durezza (*hardness*), la *springiness*, la *cohesiveness* e la *resilience* deducibili attraverso il grafico in figura 5.

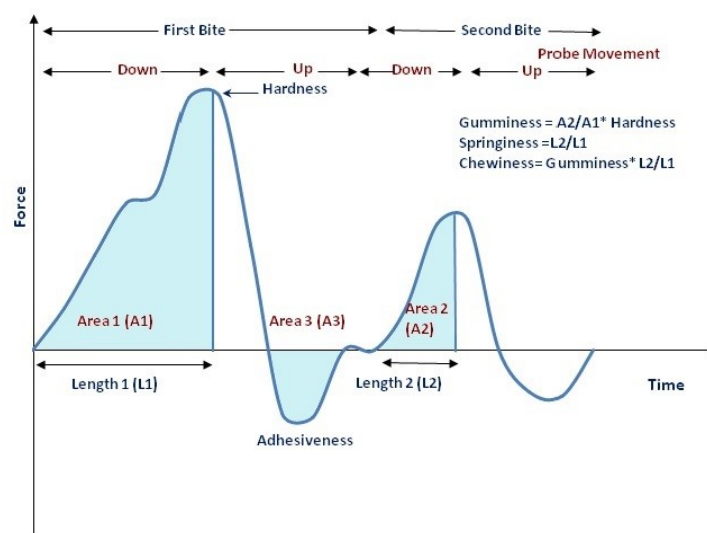


Figura 5: Tipica curva TPA.

### 3.8 Analisi dell'immagine della mollica

È stata messa a punto su sei fette selezionate da due differenti pani, escludendo quelle interessate dalla penetrazione della sonda; le fette sono state sottoposte a scansione, utilizzando lo scanner Epson Perfection V500 Photo, e analizzando le immagini mediante il software Image J. L'area della mollica presa in esame era di 4x4 cm dalla parte centrale della fetta, con una risoluzione di 200 dpi. I parametri misurati sono il numero di alveoli, l'area media alveolare, l'area totale alveolare e l'area alveolare espressa in percentuale.

### 3.9 Determinazione delle frazioni polifenoliche nel pane fresco

#### 3.9.1 Determinazione del contenuto di polifenoli totali

La determinazione del contenuto di polifenoli totali è stata effettuata secondo la metodica di Pathak et al. (2016), modificata. Essa consta di 2 fasi:

##### Estrazione del campione:

La procedura di estrazione si utilizza per la determinazione del contenuto totale di polifenoli e dell'attività antiossidante.

- 4 g di campione finemente macinato sono stati miscelati con 10 mL di metanolo all'80%;
- la miscela ottenuta è stata sottoposta a sonicazione per 15 minuti in modo tale da agitare il campione;
- il campione è stato quindi centrifugato a 8944 x g per 15 minuti ed il surnatante ottenuto è stato filtrato, la procedura di estrazione è stata completata dopo 20 h a bassa temperatura o in frigorifero.

##### Contenuto totale di polifenoli:

- 0.5 mL di estratto sono stati sciolti in 1.8 mL di acqua distillata e successivamente sono stati aggiunti 0.2 mL di reattivo Folin-Ciocalteu;
- dopo 5 minuti sono stati aggiunti 2 mL di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7%, 1.8 mL di acqua distillata, mescolando attentamente;
- La miscela ottenuta viene incubata a temperatura ambiente per 90 minuti, e una volta sviluppato il colore, viene osservata l'assorbanza a 750 nm allo spettrofotometro, usando l'acido gallico come standard;

I risultati vengono espressi come acido gallico/100g di pane fresco (GAE/100 g).

### 3.9.2 Determinazione della frazione solubile

La determinazione della frazione solubile dei polifenoli da pane è divisa in 2 parti:

#### Preparazione dell'estratto

- 1 g di pane finemente macinato ed essiccato è stato estratto con 4 mL di metanolo acidificato (HCl/metanolo/acqua, 1:80:10 v/v) a temperatura ambiente per 2 ore. A tale scopo i campioni vengono fatti agitare su agitatori magnetici impostati alla massima velocità possibile.

L'estrazione viene ripetuta per due volte.

- I surnatanti ottenuti in seguito a ciascuna estrazione, vengono filtrati con filtri da 0.2  $\mu\text{m}$ , combinati e utilizzati per la determinazione dei polifenoli solubili usando il metodo spettrofotometrico Folin-Ciocalteu.

#### Determinazione spettrofotometrica

In un matraccio da 25 mL sono stati introdotti 2 mL di estratto, 0.5 mL di Folin-Ciocalteu, e dopo 3 minuti, sono stati aggiunti 10 mL di carbonato di sodio al 7.5%.

Quindi è stato portato a volume con acqua distillata.

L'assorbanza del campione è stata misurata a 750 nm, dopo un'ora di conservazione al buio. I risultati vengono espressi come acido gallico/100g di pane fresco (GAE/100 g).

### 3.9.3 Determinazione della frazione insolubile

Per la determinazione della frazione insolubile dei polifenoli, è stato utilizzato il residuo ottenuto con l'estrazione effettuata per la determinazione della frazione solubile.

Al residuo sono stati miscelati 5 mL di metanolo e acido solforico concentrati (10:1, v/v) e posto in un bagnetto termostato (FALC Instruments) per 20 ore a 85° C.

Trascorse le 20 ore, sono stati prelevati 1.5 mL del surnatante ottenuto, e posti in tubi eppendorf e posti in centrifuga (Hettich Zentrifugen Universal 32R) alla massima velocità per 10 minuti.

Successivamente, i campioni sono stati filtrati con filtri da 0.45  $\mu\text{m}$ , e si è proceduto alla preparazione del campione per la lettura spettrofotometrica.

#### Determinazione spettrofotometrica

In un matraccio da 25 mL sono stati posti 0.5 mL di estratto, 0.5 mL di Folin-Ciocalteu, e dopo 3 minuti, 10 mL di carbonato di calcio al 7.5%.

Quindi è stato portato a volume con acqua distillata.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

L'assorbanza del campione è stata misurata a 750 nm dopo un'ora di conservazione al buio.

Il contenuto di polifenoli è stato espresso come grammi di acido gallico/100 grammi di pane fresco (GAE/100 g).

### **3.9.4 Determinazione della frazione bio-accessibile**

2 g di pane finemente macinati ed essiccati sono stati miscelati con 20 mL di acqua distillata e 0.5 mL di pepsina ( $20 \text{ g L}^{-1}$  in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  HCl).

È stato aggiustato il pH fino a 2 usando  $5 \text{ mol L}^{-1}$  HCl ed è stato incubato il campione in un bagnetto termostato (FALC Instruments) per un'ora a  $37^\circ \text{ C}$ .

La simulazione della digestione gastrica è stata interrotta con l'aggiunta di  $\text{NaHCO}_3$  1M, fino al valore di pH pari a 7.2.

Quindi sono stati aggiunti al campione

- 2.5 mL di soluzione bile/pancreatina ( $2 \text{ g L}^{-1}$  di pancreatina e  $12 \text{ g L}^{-1}$  (6 g di acido colico, sale sodico + 6 g di acido deossicolico, sale sodico);
- 2.5 mL della soluzione NaCl/KCl ( $120 \text{ mmol L}^{-1}$  di NaCl e  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  di KCl);

La simulazione della digestione intestinale è stata effettuata per le successive 2.5 ore.

Al termine della simulazione, i campioni sono stati centrifugati a 3500 rpm per 10 minuti, ed il surnatante ottenuto è stato utilizzato per la determinazione dei polifenoli bioaccessibili in seguito alla rimozione delle proteine dall'estratto digestivo attraverso l'aggiunta di acido tricloroacetico (20% w/w).

#### *Precipitazione delle proteine mediante l'acido tricloroacetico (TCA)*

La precipitazione delle proteine è un passaggio necessario che precede la determinazione spettrofotometrica.

Sono stati prelevati 8 mL di estratto e sono stati aggiunti 2 mL di TCA; da quest'ultimo sono stati prelevati 2 mL e posti in vials eppendorf;

I campioni sono stati incubati per 10 minuti a  $4^\circ \text{ C}$  e in seguito centrifugati in una microcentrifuga (Costar® 10 MVSS-05900) a 13.2 Krpm per 5 minuti.

A questo punto si è proceduto con la determinazione dei polifenoli bio-accessibili usando il metodo spettrofotometrico Folin-Ciocalteu.

#### *Determinazione spettrofotometrica*

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari



In un matraccio da 25 mL sono stati posti 2 mL di estratto, 0.5 mL di Folin-Ciocalteu, e dopo 3 minuti, 10 mL di carbonato di calcio al 7.5%.

Quindi è stato portato a volume con acqua distillata.

L'assorbanza del campione è stata misurata a 750 nm dopo un'ora di conservazione al buio.

Il contenuto di polifenoli è stato espresso come grammi di acido gallico/100 grammi di pane fresco (GAE/100g).

### **3.10 Analisi sensoriale**

Al fine di determinare le ragioni della preferenza o del rigetto dei campioni di pane gluten-free, è stato effettuato un test affettivo quantitativo di accettabilità per attributi con l'obiettivo, utilizzando un punteggio edonistico, di misurare le risposte dei consumatori su specifici attributi. Ad un panel costituito da 44 consumatori (26 uomini e 18 donne di una età compresa tra 19 e 52 anni) è stato chiesto di valutare i campioni e di quantificare la preferenza usando una scala edonistica a 9 punti (1 = non mi piace per niente; 9 = mi piace tantissimo). Gli attributi valutati sono stati i seguenti: colore crosta, odore, dolcezza, aromi in bocca, consistenza crosta, consistenza mollica e accettabilità globale. Il test è stato effettuato in laboratorio (Stone, Bleibaum, & Thomas, 2012), condotto nelle cabine individuali (ISO 8589, 2007), e i dati sono stati registrati usando il software Smart Sensory Box (Sito 14). I pani gluten-free sono stati preparati nello stesso giorno in cui è stata effettuata la valutazione sensoriale. Una volta raffreddati, i pani sono stati tagliati a fette, dello spessore di 20 mm, e serviti ai consumatori in ordine randomizzato e bilanciato (Macfie, Bratchell, Greenhoff, & Vallis, 1989). Ai consumatori veniva fornita acqua per risciacquare il palato e riportare gli organi di senso alla neutralità.

### **3.11 Analisi statistica**

Per l'analisi statistica è stata applicata l'analisi della varianza a due vie (ANOVA), mentre il test del confronto fra le medie è stato eseguito in accordo con il test LSD di Fisher, con livello di significatività dello 0.05. È stato utilizzato il pacchetto STSG Statistica per Windows, version 6.0 ("Statsoft" Inc., Tulsa, OK).

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

Per quanto riguarda l'analisi sensoriale, le risposte dei consumatori sono state convertite in ranghi e le differenze fra i campioni sono state identificate usando l'Anova di Friedman, un test non-parametrico, seguito dall'LSD test ( $p < 0.05$ ).

## Capitolo 4

### Risultati e discussioni

#### 4.1 Analisi sugli impasti

##### 4.1.1 Monitoraggio del tempo di fermentazione

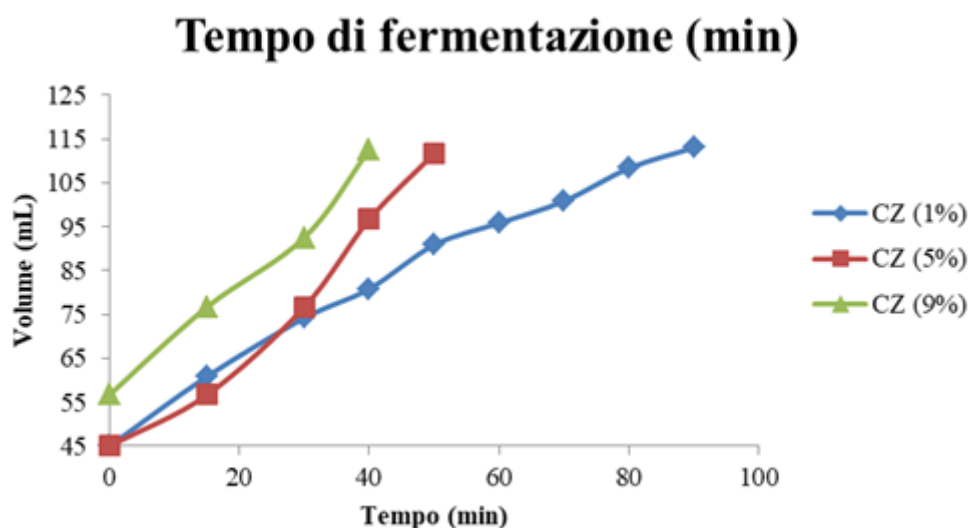
La fermentazione permette la crescita del volume dell'impasto, che acquisisce anche caratteristiche sensoriali tipiche; essa avviene quando i lieviti convertono gli zuccheri presenti nella farina in anidride carbonica e alcol (Ali et. al, 2012). Il lievito adoperato nel processo di panificazione, il *Saccharomyces cerevisiae*, converte gli zuccheri fermentiscibili presenti nell'impasto in anidride carbonica ed etanolo come prodotti principali. L'intensità dipende dalla forma del lievito e dalla disponibilità di zuccheri fermentiscibili nella farina, compreso il glucosio, il saccarosio e il maltosio prodotti dall'idrolisi di amido (Birch, Petersen & Hansen, 2013). Il processo fermentativo influenza il volume del prodotto, la forma, il colore della crosta e la struttura della mollica (Cauvain, 2001). Per tempo di fermentazione si intende il tempo necessario all'aumento del volume dell'impasto dovuto all'azione fermentativa del lievito che produce la CO<sub>2</sub>. Il tempo di fermentazione dipende da numerosi fattori: qualità delle farine, attività amilasica (Carrai, 2010) temperatura, dose di lievito, quantità e tipologia di zuccheri aggiunti, ecc.

La figura 6 mostra i dati relativi ai risultati inerenti la cinetica del tempo di fermentazione al variare della concentrazione zuccherina, dall'1% fino ad un massimo del 9%. Il tempo di fermentazione è stato monitorato ad intervalli regolari fino al raggiungimento del volume desiderato, corrispondente a circa il doppio del volume iniziale dell'impasto (110 mL). In base alla letteratura il tempo di fermentazione è strettamente dipendente dalla pressione osmotica esercitata dallo zucchero nei confronti della membrana plasmatica del lievito (seppur minore rispetto al sale quando utilizzato a parità di dose). Il grafico 6 mette in evidenza che il tempo di fermentazione è legato alla concentrazione zuccherina. Lo zucchero, infatti, viene tradizionalmente aggiunto all'impasto del pane in forma di saccarosio e in misura dell'1-2% influisce solo lievemente sulla velocità di fermentazione, in modo particolare all'inizio della fase fermentativa (Sluimer, 2007). Come previsto, quindi, il campione contenente la massima concentrazione zuccherina (9%) ha raggiunto il volume ottimale nel minor tempo (40'), alla concentrazione zuccherina intermedia (5%) il volume prefissato è stato ottenuto in circa 45', mentre il campione con la percentuale

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

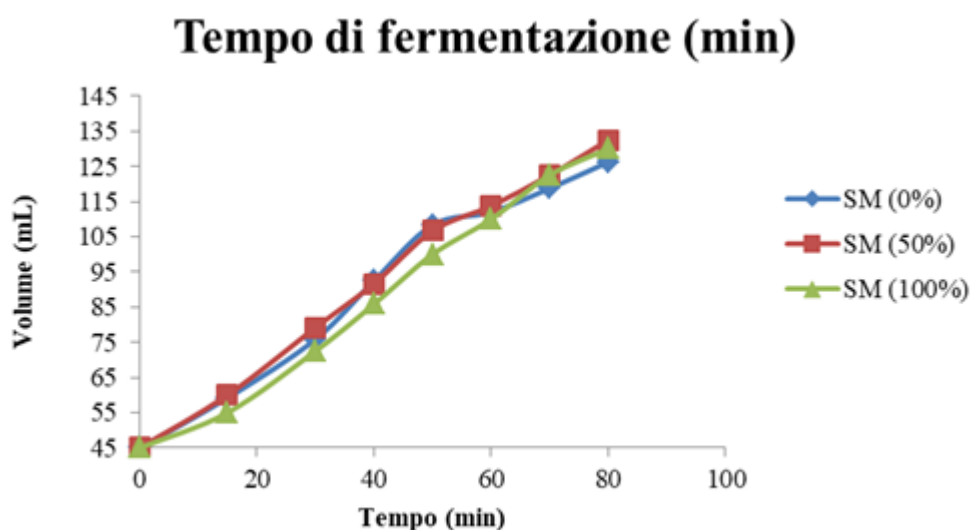
zuccherina più bassa (1%) ha raggiunto il volume desiderato in circa 90'; questi risultati sono riconducibili a una differente quantità di risorse energetiche a disposizione dei lieviti per il loro sviluppo.



**Figura 6:** Effetto della concentrazione zuccherina totale (CZ) sul tempo di fermentazione

Per quanto riguarda la sostituzione dello zucchero col miele, i risultati sono riportati nel grafico della figura 7. Come atteso, il tempo di fermentazione si è protratto con la sostituzione dello zucchero col miele, benché la differenza fra i tre campioni non sia significativa. Le differenze fra i risultati osservati nelle figure 6 e 7 sono riconducibili al fatto che la velocità di crescita dei lieviti sia in funzione della disponibilità di risorse energetiche quali ad esempio la percentuale di zuccheri fermentescibili, mentre, nei campioni dove è avvenuta la sostituzione dello zucchero col miele, si deve tener presente che il rallentamento della velocità di lievitazione può essere dovuta alla composizione del miele stesso, contenente circa il 70% di zuccheri totali tra cui fruttosio (35-50%), glucosio (25-40%), maltosio (7-10%), saccarosio (1-2%), oltre ad alcuni composti che hanno

un'attività antisettica come i polifenoli. Pertanto i lieviti hanno avuto a disposizione una quantità di risorse fermentescibili inferiore rispetto a quando la risorsa zuccherina era rappresentata da solo saccarosio. È fondamentale sottolineare il fatto che il rallentamento della velocità di fermentazione può essere dovuto al fatto che a concentrazioni di zucchero >4%, si verifica una riduzione dell'attività dell'acqua, la quale è correlata all'aumento della pressione osmotica dell'impasto.



**Figura 7:** Effetto della sostituzione zucchero-miele (SM) sul tempo di fermentazione

#### 4.1.2 Misurazione del pH pre e post-fermentazione

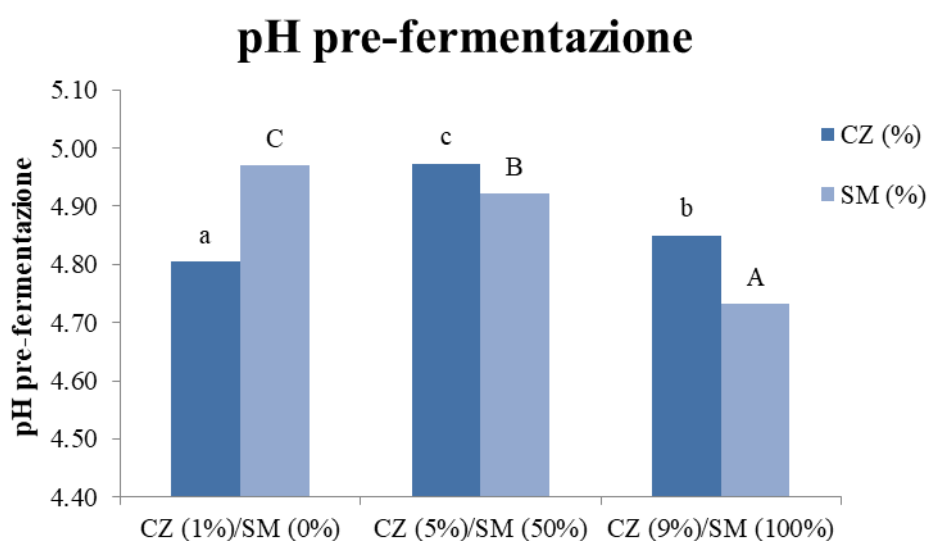
I grafici in figura 8 e 9 mettono in evidenza i risultati relativi ai valori di pH, rispettivamente pre e post fermentativo, utilizzando come fattori la percentuale totale zuccherina (CZ) e la % di sostituzione del saccarosio col miele (SM), considerando i 2 fattori alle concentrazioni bassa, intermedia e alta.

Per quanto riguarda il pH pre-fermentazione si evince come esso abbia subito un incremento con l'aumentare della percentuale zuccherina, partendo da un valore di 4.81 per la percentuale zuccherina più bassa, e raggiungendo il valore massimo alla percentuale intermedia (4.97). Tale risultato potrebbe essere dovuto al fatto che il saccarosio utilizzato nell'impasto abbia un pH moderatamente acido, pertanto l'aumento della sua percentuale può aver causato un incremento globale del pH dell'impasto. Per quanto riguarda la sostituzione del miele la letteratura suggerisce che il pH del miele derivato dal nettare presenti valori compresi tra 3.5 e 4.5 (Palmieri et al., 2017), con

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

valore medio intorno a 3.9, anche se i valori tipici si trovano nell'intervallo di 3.4-6.1 (Bogdarov, 2010c). Tale acidità deriva dalla presenza di acidi organici che si possono trovare in forma libera e in forma legata (lattoni), ma l'acido quantitativamente più importante è l'acido gluconico derivante dall'ossidazione del glucosio (Palmieri et al., 2017). Il grafico della figura 8 indica come a percentuale crescente di sostituzione il pH abbia subito una riduzione, con valori pari a 4.97 per lo 0%, 4.92 al 50% e 4.73 al 100%; è altamente probabile che tali valori siano legati proprio alla presenza di acidi organici nel miele, i quali hanno concorso all'acidificazione dell'impasto.

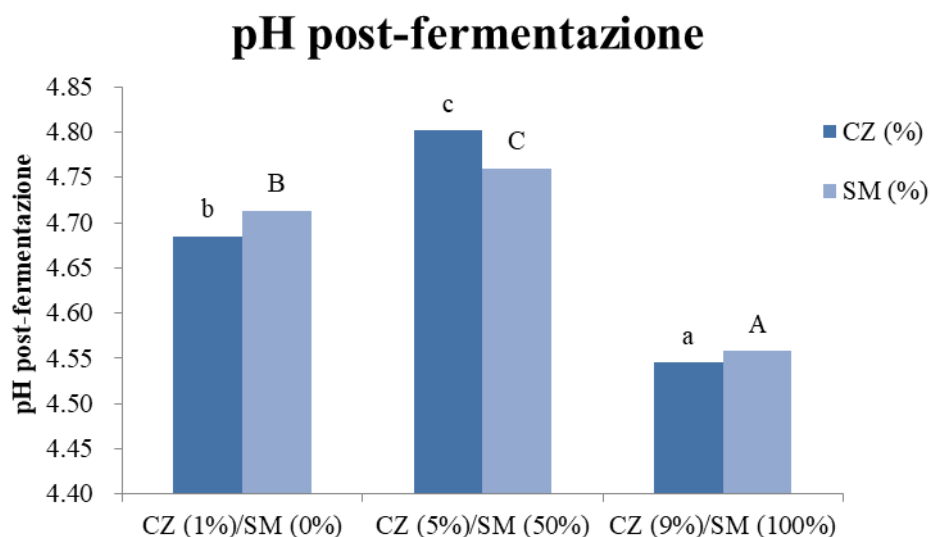


**Figura 8:** Effetto dei fattori CZ e SM sul pH pre-fermentazione  
*Significatività statistica: lettere minuscole indicano il fattore CZ, lettere maiuscole il fattore SM*

Per quanto riguarda il pH post-fermentazione (figura 9) i risultati indicano come il pH abbia mostrato valori più alti nei campioni in cui la % zuccherina di utilizzo era dell'1% (4.69) e del 5% (4.80), mentre alla massima %, si è registrata una riduzione (4.55); tale riduzione del pH post-fermentativo è imputabile alla maggiore attività fermentativa dei lieviti e quindi alla produzione di anidride carbonica e acido carbonico, tenendo presente anche il fatto che la farina ed il lievito contengono piccoli quantitativi di batteri lattici e acetici, produttori di acido lattico e acetico. La produzione di acidi gioca un ruolo importante sul pH del pane finito e sul suo sapore (Sluimer, 2007).

Il decremento del pH verificatosi al 9% di sostanza zuccherina, invece, potrebbe essere imputabile a una riduzione dell'attività dell'acqua, correlata all'effetto osmotico esercitato

dallo zucchero il quale ha portato a un rallentamento della velocità di fermentazione. Infatti a % zuccherine > del 4% si verifica un abbassamento dell'attività dell'acqua, correlata all'aumento della pressione osmotica dell'impasto (Sluimer, 2007), anche se in contrasto con quanto riportato sopra.



**Figura 9:** Effetto dei fattori CZ ed SM sul pH post- fermentazione  
*Significatività statistica: lettere minuscole indicano il fattore CZ, lettere maiuscole il fattore SM*

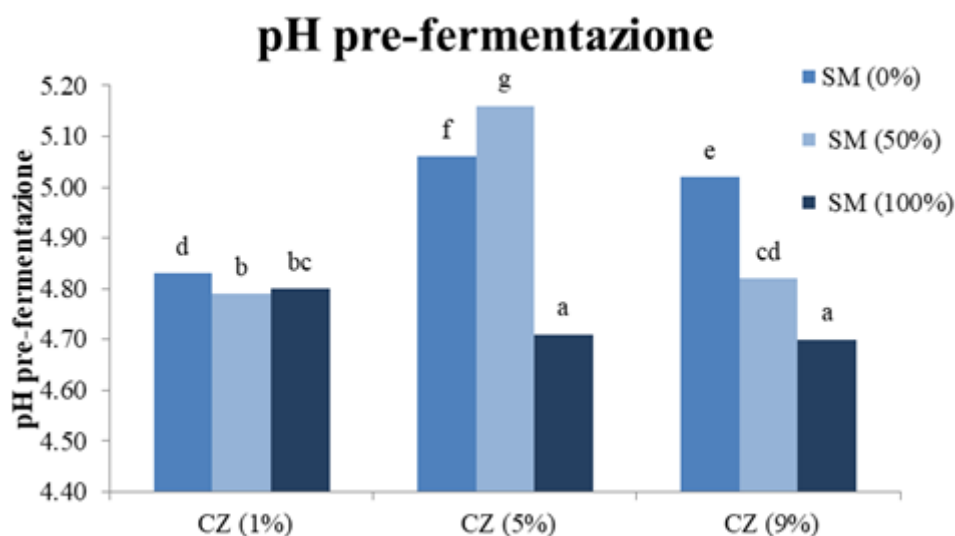
Analizzando i dati relativi alla sostituzione dello zucchero col miele (figura 9) si è visto come a un livello di sostituzione dello 0 % e del 100% il pH abbia valori rispettivamente pari a 4.71 e 4.56, mentre al 50% di sostituzione è stato osservato un importante incremento: la differenza di pH potrebbe essere dovuta nei campioni con lo 0% e 100%, a una maggiore produzione di CO<sub>2</sub> da parte dei lieviti che avevano a disposizione quantità maggiori di risorse energetiche (100% zucchero nel primo caso e 100% miele, alla massima concentrazione zuccherina, nel secondo caso), mentre nel campione al 50% di sostituzione è probabile che l'attività fermentativa abbia subito una riduzione a causa del diverso substrato energetico, rappresentato in tal caso dal 50% di zucchero e dal 50% di miele; inoltre, la riduzione di pH potrebbe essere dovuta alla presenza di acidi organici nel miele, i quali hanno contribuito a una più spinta acidificazione dell'impasto. Mediamente il pH di un impasto tradizionale, preparato con farina di frumento, acqua, sale e lievito, presenta un pH iniziale tra 5.5 e 5.8, pertanto alla luce dei risultati osservati, tutti i valori mostrati si trovano al di sotto di tale range (Sluimer, 2007).

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

In figura 10 e 11 vengono illustrati i risultati relativi all'interazione dei fattori percentuale totale zuccherina e la percentuale di sostituzione dello zucchero col miele, sul pH pre e post-fermentazione.

Nel grafico in figura 10 si può osservare come il campione che ha mostrato il valore più alto in assoluto di pH sia quello ottenuto col 5% di sostanza zuccherina totale al 50% di sostituzione (5.16), seguito da quello prodotto col 9% di sostanza zuccherina allo 0% di sostituzione (5.02); i valori più bassi sono stati osservati nei campioni al 5% e al 9% di sostanza zuccherina, entrambi al 100% di sostituzione (4.71 e 4.70). All'1% di sostanza zuccherina e a livelli di sostituzione del 50 e del 100%, il pH non ha mostrato differenze significative (rispettivamente 4.79 e 4.80), mentre gli stessi campioni, sono risultati statisticamente differenti rispetto al campione con la dose di sostituzione dello 0%. Quindi è probabile che l'aggiunta del miele, fatta eccezione per il campione al 5% di sostanza zuccherina al 50% di sostituzione, abbia portato a una riduzione del pH negli impasti prima dell'inizio dell'attività fermentativa.

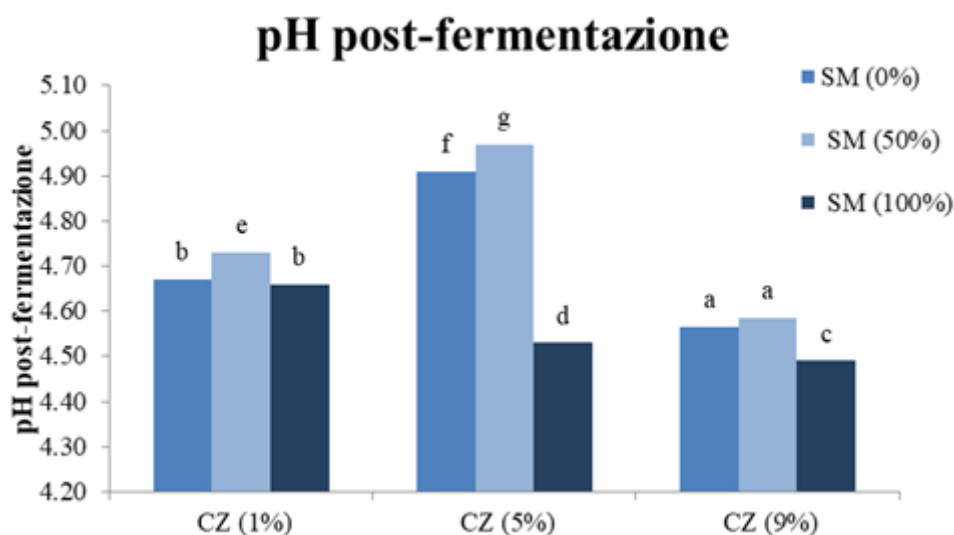


**Figura 10:** Effetto dell'interazione dei fattori CZ e SM sul pH pre-fermentazione  
*Significatività statistica: Lettere differenti indicano differenza statisticamente significativa (p-value < 0.05)*

In figura 11 i valori di pH post-fermentazione più elevati sono stati osservati rispettivamente nei campioni alla % intermedia zuccherina con un livello di sostituzione zucchero-miele dello 0% e 50%. I valori più bassi si osservano nei campioni alla massima concentrazione zuccherina e a qualsiasi livello di sostituzione zucchero-miele (4.57, 4.59, 4.49). Per ciò che concerne i campioni alla più bassa % di sostanza zuccherina, i valori



variano da 4.67 allo 0% di sostituzione, 4.73 al 50% e infine, a 4.66 per la sostituzione totale. Pertanto, laddove è stata variata, la % zuccherina, a seguito dell'attività fermentativa più intensa, ha determinato una riduzione del pH alla fine della fase fermentativa.



**Figura 1:** Effetto dell'interazione dei fattori CZ e SM sul pH post-fermentazione  
*Significatività statistica: Lettere differenti indicano differenza statisticamente significativa ( $p$ -value < 0.05)*

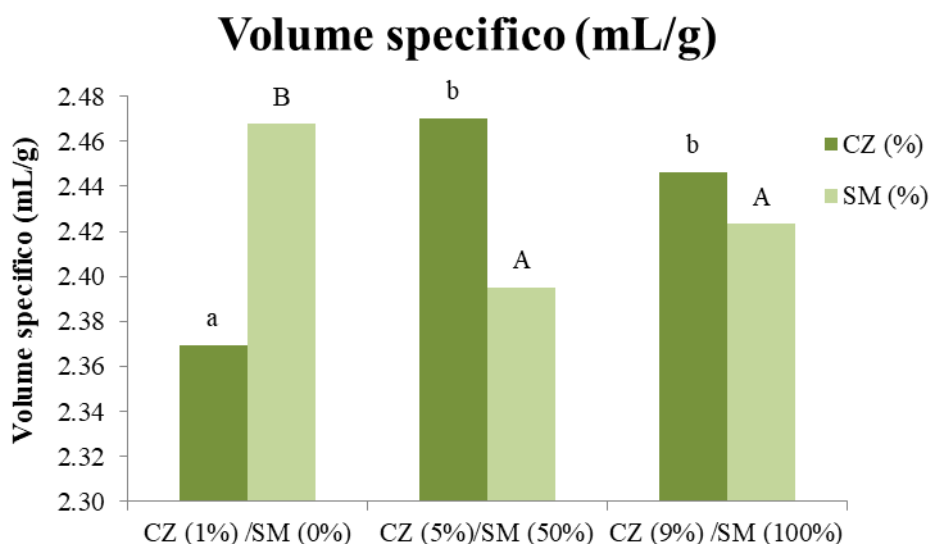
## 4.2 Analisi sul pane fresco

### 4.2.1 Volume specifico

Il volume specifico è uno dei parametri per la valutazione qualitativa del pane e viene definito come il rapporto tra il volume del pane ed il suo peso (Shittu et al., 2007). Affinché un prodotto risponda a specifici requisiti di qualità deve possedere un determinato volume specifico: infatti, un volume al di sotto di un certo valore ha un'influenza negativa sulla qualità, ma, d'altra parte, un volume maggiore non comporta necessariamente una qualità migliore (Sluimer, 2007). La letteratura suggerisce che il volume specifico aumenta durante la fase finale della fermentazione in misura di circa 1.4 L/Kg di impasto, per cui la porzione gassosa dell'impasto aumenta del 40% all'inizio della fermentazione fino all'80% al suo termine.

Il volume del pane è spesso condizionato dalla quantità e della qualità delle proteine presenti nella farina (Ragae & Abdel-Aal, 2006), così come dal tempo di lievitazione (Shittu et al., 2007).

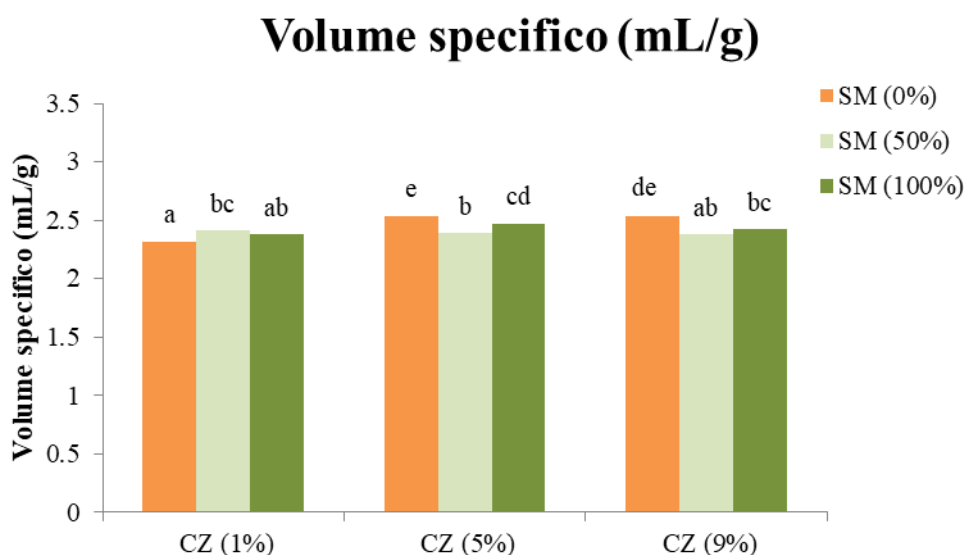
La figura 12 riporta i risultati relativi al volume specifico calcolato sui pani oggetto della sperimentazione. Dal grafico è emerso che i campioni con il livello più basso di concentrazione zuccherina abbiano fatto registrare il volume specifico più basso (2.37 mL/g); questo valore potrebbe essere ricondotto ad un minore sviluppo dell'impasto durante la lievitazione, dovuto alla ridotta % zuccherina che non ha permesso ai lieviti una proliferazione ottimale. A conferma di quanto detto in precedenza l'aumento della concentrazione zuccherina (campioni CZ 5 e CZ 9), ha prodotto un notevole incremento del volume, in particolare alla % zuccherina intermedia (2.47), e leggermente più basso per il campione al 9% (2.45) (p-value >0.05). Per quanto riguarda la sostituzione dello zucchero col miele nello stesso grafico si può osservare che il volume specifico maggiore è stato raggiunto laddove il saccarosio non è stato sostituito con il miele. L'assenza del miele si ipotizza abbia permesso un maggiore sviluppo dell'impasto da parte dei lieviti durante la fermentazione, a causa della composizione delle risorse energetiche (rappresentate da solo saccarosio); il miele oltre ad avere una composizione chimica differente dal saccarosio svolge un'azione antisettica che influisce sull'attività fermentativa dei lieviti. Alla % di sostituzione intermedia e totale, il volume ha subito una considerevole riduzione (2.40 e 2.42), probabilmente dovuta all'elevata concentrazione di miele e verosimilmente, alla presenza di acqua nel miele stesso, e come già detto sopra, alla composizione del miele stesso e alla sua attività antisettica i quali hanno rallentato la lievitazione. Tuttavia tra i 2 campioni non esiste differenza statisticamente significativa (p-value > 0.05).



**Figura 12:** Effetto dei fattori CZ e SM sul volume specifico

*Significatività statistica: lettere minuscole indicano il fattore CZ, lettere maiuscole il fattore SM*

L'effetto dell'interazione dei fattori CZ e SM sul volume specifico, è riportato in figura 13. Dal grafico è possibile appurare l'aumento del volume specifico a livelli crescenti di sostanza zuccherina totale (5% e 9%); i valori più alti sono stati misurati sui campioni allo 0% di sostituzione (entrambi 2.54 mL/g), mentre i valori più bassi all' 1% CZ (2.32, 2.41, 2.38 mL/g) e al livello intermedio di sostituzione intermedio dei campioni al 5 e al 9% CZ (2.39 e 2.38 mL/g).



**Figura 13:** Effetto dell'interazione dei fattori CZ e SM sul volume specifico

*Significatività statistica: Lettere differenti indicano differenza statisticamente significativa (p-value <0.05)*

#### 4.2.2 Determinazione dei parametri colorimetrici e dell'indice di imbrunimento della crosta e della mollica

È stato dimostrato come la misurazione strumentale del colore dei prodotti da forno sia un controllo di qualità inevitabile utile per prevedere gli effetti sulla formulazione di ingredienti o prodotti (Gallagher et al., 2003a; Gallagher et al., 2003b; Erkan et al., 2006). I parametri  $L^*$  (luminosità),  $a^*$  (indice di rosso e blu), e  $b^*$  (indice di giallo e verde) sono stati determinati per il colore della crosta e della mollica nei campioni di pane oggetto della sperimentazione.

Gli effetti della concentrazione zuccherina totale esercitati sui parametri colorimetrici e sull'indice di imbrunimento dei campioni oggetto della sperimentazione (figura 14 e 15) sono mostrati nella tabella 4. La crosta del pane ottenuto variando la percentuale zuccherina ha prodotto valori statisticamente significativi rispettivamente per i valori  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , per la crosta, e  $L^*$ ,  $a^*$  per la mollica, ( $p$ -value <0.05).  $L^*$  ha mostrato un decremento a dosi crescenti di percentuale zuccherina (CZ), sia nella crosta che nella mollica, registrando il valore più alto alla percentuale più bassa; la riduzione di  $L^*$  nella crosta a dosi crescenti di sostanza zuccherina è probabilmente legata alla reazione di Maillard tra gli zuccheri riducenti non fermentati e gli aminoacidi, che porta alla formazione di composti ad alto peso molecolare bruni chiamati melanoidine, i quali hanno contribuito alla formazione del colore della crosta (Carrai, 2010). Per quanto riguarda la sostituzione zucchero-miele (SM), l'indice di lightness ( $L^*$ ) ha rilevato lo stesso trend sia per la crosta, sia per la mollica: a livelli crescenti di sostituzione (50% e 100%) si è registrato un incremento, tuttavia senza sostanziali differenze tra campioni. I parametri  $a^*$  e  $b^*$  della crosta hanno mostrato la medesima tendenza: all'aumentare della percentuale zuccherina i valori hanno determinato un incremento, in modo particolare alla concentrazione intermedia e massima, riconducibili a un indice di rosso e giallo più spiccati, dovuti ai prodotti della reazione di Maillard.

Nella mollica,  $a^*$  ha presentato valori crescenti nei campioni di controllo, e a dosi via via più elevate di sostanza zuccherina, suggerendo pertanto un indice di rosso più alto; il parametro  $b^*$  ha determinato un aumento nei campioni in cui era avvenuta la sostituzione del miele: 3.97 per il livello intermedio, e 4.58 per il livello massimo, indicando quindi un colore più tendente al giallo e al rosso, per la possibile presenza di carotenoidi nel miele (Palmieri et al., 2017), infine in  $a^*$  non c'è stata differenza tra campioni.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

L'interazione tra i fattori % di sostanza zuccherina totale e percentuale di sostituzione zucchero-miele sui parametri colorimetrici  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  di crosta e mollica è messa in evidenza in tabella 4.

Il valore più elevato di  $L^*$  sulla crosta è stato determinato sul campione contenente l'1% di sostanza zuccherina ed il massimo livello di sostituzione, mentre il più basso è stato osservato alla massima percentuale zuccherina e allo 0% di miele. I campioni ottenuti con la più bassa concentrazione zuccherina hanno mostrato i valori più elevati, mentre quelli alla concentrazione più elevata, i valori più bassi; valori intermedi sono stati riscontrati, alla percentuale zuccherina del 5%. Per quanto riguarda il parametro  $a^*$ , il campione avente la % zuccherina intermedia (5%) e al massimo livello di sostituzione (100%) ha prodotto il valore più alto in assoluto, mentre il valore più basso è dato dal campione con la minore concentrazione zuccherina (1%) e lo 0% di miele. In generale i valori più alti sono stati riscontrati alla dose zuccherina più bassa, e quelli più alti alla concentrazione del 5%, mentre quelli intermedi sono stati osservati alla % più alta; stessa tendenza per il parametro  $b^*$ . Anche in questo caso tale risultato è sicuramente ascrivibile alla reazione di Maillard.

Nella mollica il parametro  $L^*$  ha mostrato il valore più elevato alla massima % zuccherina e al livello di sostituzione intermedia (50%), invece il valore più basso è stato misurato nel campione al 5% di sostanza zuccherina e alla dose di sostituzione dello 0%. Tuttavia la differenza tra campioni è risultata non significativa.

In merito al parametro  $b^*$  dai dati riportati in tabella emerge un incremento dei valori all'interno di ogni gruppo (1-5-9%) ( $p$ -value <0.05), dove il valore più alto è stato determinato sul pane alla massima % zuccherina e di sostituzione, il più basso risulta il medesimo nei campioni al 5% e 9% di sostanza zuccherina, con lo 0% di sostituzione.

Il colore del pane è legato alle caratteristiche chimico-fisiche delle materie prime adoperate nella panificazione, e alle reazioni chimiche che si verificano durante la cottura, a loro volta determinate dalle condizioni di processo, come la reazione di Maillard e di caramellizzazione, conosciute più generalmente come reazioni di imbrunimento non enzimatico (NEB), responsabili dell'imbrunimento dei prodotti da forno durante la cottura (Qunyi et al., 2010).

I risultati sul colore della crosta, in termini di indice di imbrunimento, sono riportati in tabella 4, dove in ascissa sono riportate le % di sostanza zuccherina totale e di

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

sostituzione zucchero-miele e in ordinata i valori relativi all'indice di imbrunimento. I dati indicano un incremento dell'indice di imbrunimento all'aumentare della % zuccherina (p-value >0.05) e rispettivamente con valori di 29.52 per l'1%, 43.53 per il 5% e 49.87 per il 9%. L'aumento è dovuto verosimilmente a un maggiore sviluppo della reazione di Maillard tra gli zuccheri riducenti contenuti nell'impasto (glucosio, fruttosio) e saccarosio e maltosio, con i composti azotati (amminoacidi). In merito alla sostituzione zucchero-miele il valore più alto si è registrato alla più bassa % di sostituzione (43.41), mentre ai livelli 50 e 100% di sostituzione i valori sono 38.99 e 40.52, dando luogo ad un indice di imbrunimento inferiore, benché tra i due campioni non esista differenza (p-value > 0.05). Questi valori sono dovuti, nel primo caso alla presenza di solo saccarosio, senza alcuna sostituzione, quindi a un maggiore sviluppo della reazione di Maillard, e laddove la sostituzione è avvenuta, alla presenza del miele nei campioni, con un effetto meno marcato della reazione di Maillard, nonostante il contenuto di zuccheri riducenti.

In tabella 4 sono riportati gli effetti dell'interazione tra i due diversi fattori sull'indice di imbrunimento della crosta e della mollica.

Per quanto riguarda la crosta, è possibile constatare come si verifichi un aumento dell'indice di imbrunimento all'aumentare della % della sostanza zuccherina (p-value <0.05) e in modo particolare alla % intermedia e più alta, con valori di 41.01, 42.60 e 46.97 al 5% di CZ, rispettivamente al 50, 0 e 100% di sostituzione, e valori pari a 42.62, 46.74 e 56.27, rispettivamente al 50, 0 e 100%. All'1% di sostanza zuccherina si può apprezzare una leggera differenza fra i 3 campioni, nei quali l'indice di imbrunimento ha subito una riduzione con l'aumentare della dose di sostituzione zucchero-miele, benché non esista differenza statisticamente significativa (p-value >0.05).

L'indice di imbrunimento della mollica è strettamente correlato al parametro L.

Dai dati (tabella 4) emerge un aumento dell'indice di imbrunimento all'aumentare della % zuccherina, in modo particolare alla % intermedia (45.42) seguita dalla % massima (45.23), ma con livelli di significatività >0.05, il valore più basso è stato misurato nel campione ottenuto con il più basso livello zuccherino (40.53).

Dai risultati emerge un incremento dell'indice di imbrunimento in modo particolare nei campioni CZ al 5%, con il più basso livello di sostituzione (45.42), seguito dal campione al medesimo livello di sostituzione, ma con la % CZ più elevata (45.23); a seguire i campioni 5% CZ e 100% di miele (42.91), 9% CZ e 100% di miele (42.37). I valori più

---

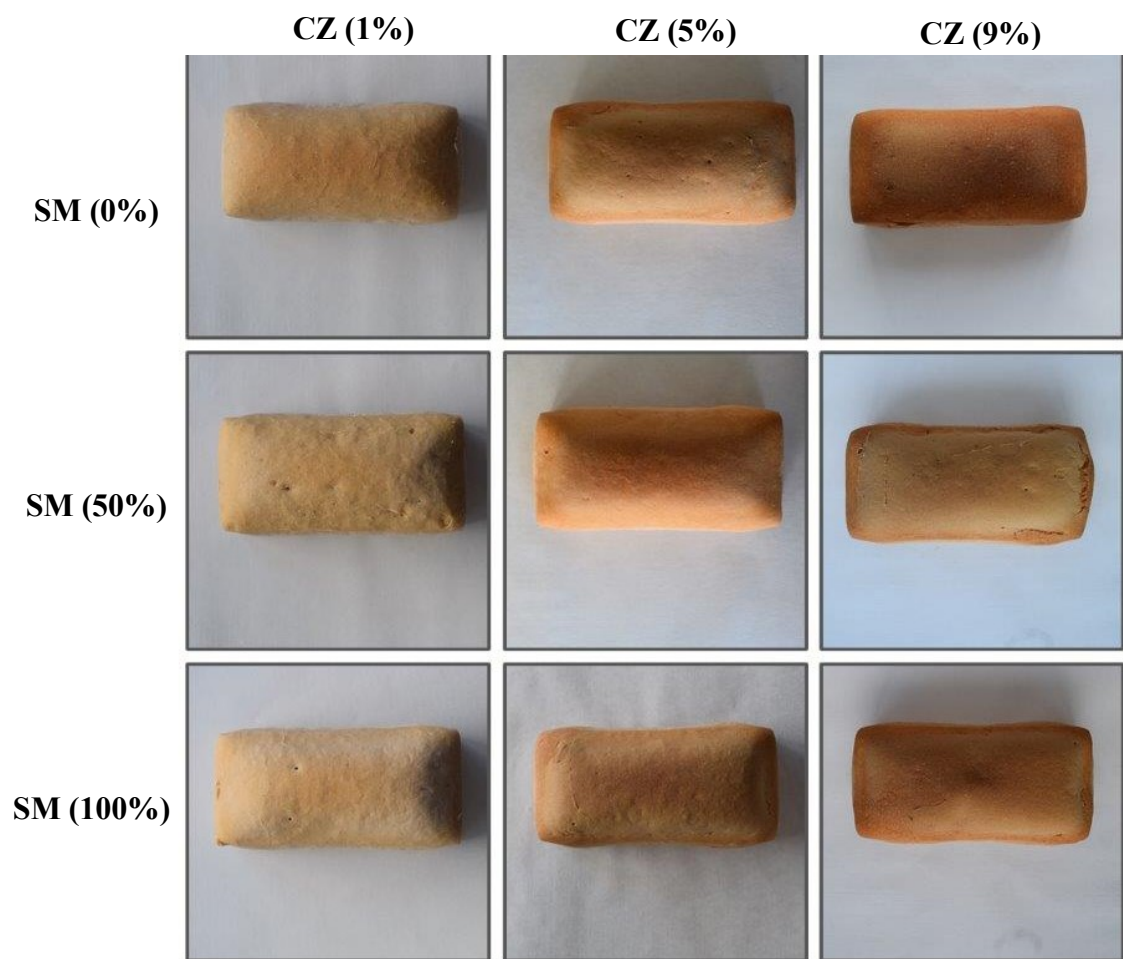
Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

bassi osservati sono stati determinati alla 1% di CZ, a dosi crescenti di sostituzione di miele (40.24, 40.99, 40.37), benchè non esista particolare differenza tra i 3 campioni, e infine al 9% CZ al livello di sostituzione intermedia (40.09).

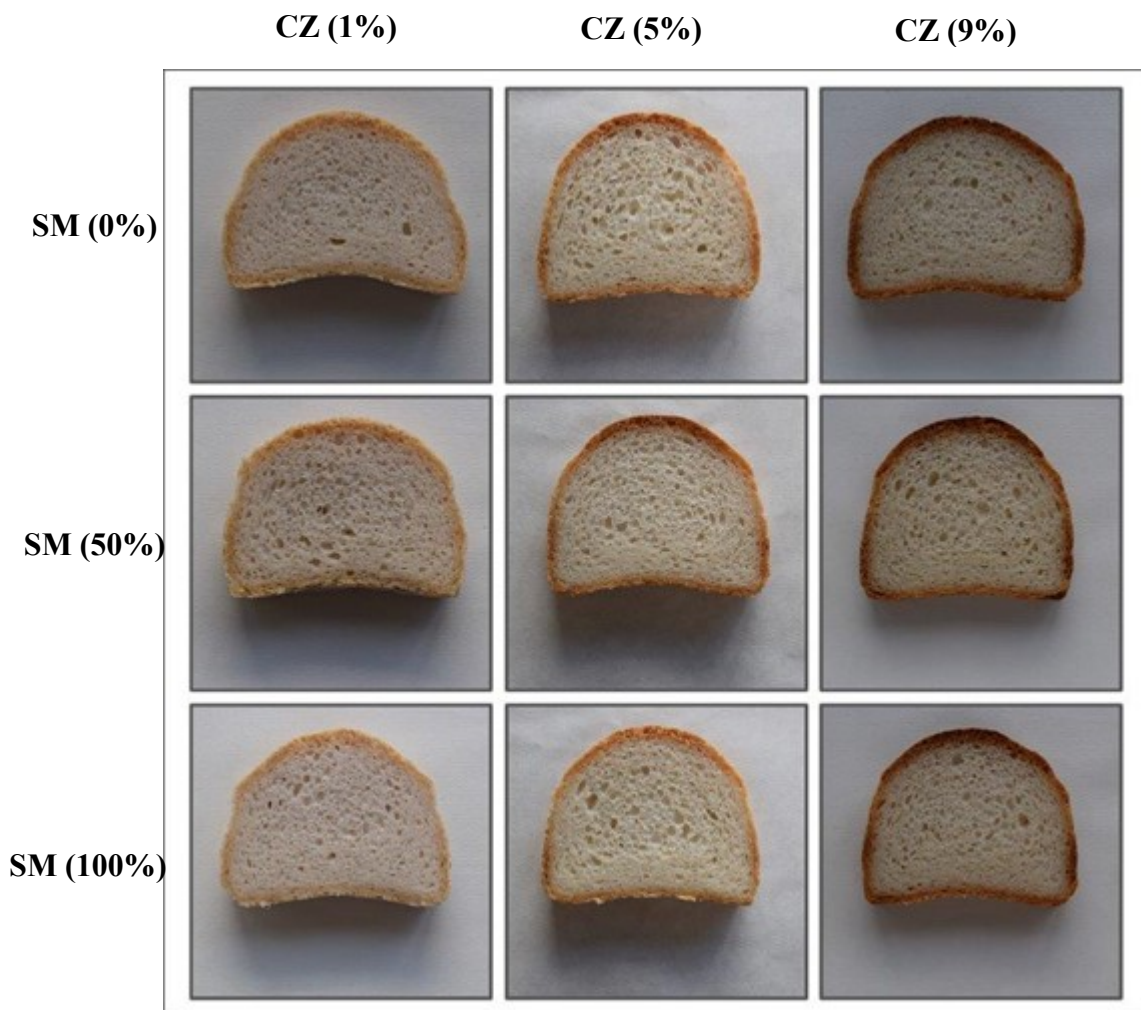
**Tabella 4:** Effetto dei fattori CZ e SM e dell'interazione sui parametri colorimetrici della crosta e della mollica  
*Significatività statistica: Lettere minuscole indicano il fattore CZ, lettere maiuscole il fattore SM*

Colore crosta	L*	a*	b*	IB	Colore mollica	L*	a*	b*	IB
<b>CZ (%)</b>					<b>CZ (%)</b>				
1	70.48c	4.04°	23.60a	29.52a	1	59.47b	-0.34b	4.18	40.53a
5	56.47b	12.10c	30.98c	43.53b	5	56.35a	-0.67a	3.94	43.65b
9	50.13a	11.37b	26.73b	49.87c	9	57.44a	-0.78a	4.09	42.56b
<b>SM (%)</b>					<b>SM (%)</b>				
0	56.59B	8.94°	25.59B	43.41B	0	56.37A	-0.58	3.65A	43.63B
50	61.01A	8.72°	27.86A	38.99A	50	58.77B	-0.54	3.97B	41.23A
100	59.48A	9.86B	27.86A	40.52A	100	58.12B	-0.67	4.58C	41.89A
<b>Interazione CZ-SM</b>					<b>Interazione CZ-SM</b>				
CZ (1%) SM(0%)	68.65b	3.64c	22.35a	31.35a	CZ (1%) SM(0%)	59.76ab	-0.33	4.09ab	40.24ab
CZ (1%) SM(50%)	70.65b	4.60c	25.00a	29.36a	CZ (1%) SM(50%)	59.02abc	-0.25	4.12ab	40.99abc
CZ (1%) SM(100%)	72.15b	3.90c	23.47ab	27.85a	CZ (1%) SM(100%)	59.63ab	-0.43	4.33bd	40.37ab
CZ (5%) SM(0%)	57.40c	11.24ab	29.92d	42.60c	CZ (5%) SM(0%)	54.58d	-0.62	3.43c	45.42e
CZ (5%) SM(50%)	58.99c	11.07ab	30.44d	41.01c	CZ (5%) SM(50%)	57.39ac	-0.66	3.81ac	42.62bc
CZ (5%) SM(100%)	53.03a	13.99d	32.60e	46.97b	CZ (5%) SM(100%)	57.09ce	-0.72	4.58de	42.91c
CZ (9%) SM(0%)	43.74d	11.93b	24.52a	56.27d	CZ (9%) SM(0%)	54.77de	-0.79	3.43c	45.23e
CZ (9%) SM(50%)	53.39a	10.50°	28.14c	46.62b	CZ (9%) SM(50%)	59.91b	-0.70	4.00ab	40.09a
CZ (9%) SM(100%)	53.26a	11.69ab	27.53c	46.74b	CZ(9%) SM(100%)	57.63abc	-0.86	4.84e	42.37abc





**Figura 14:** Immagini dei campioni di pane dopo 2 ore dalla produzione

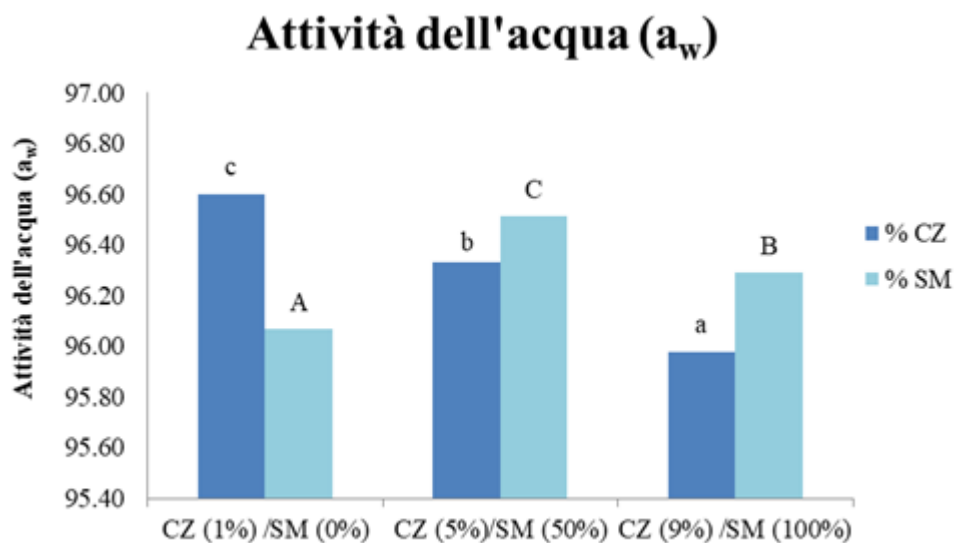


**Figura 15:** Immagini delle fette di pane dopo 2 ore dalla produzione

### 4.2.3 Attività dell'acqua ( $a_w$ )

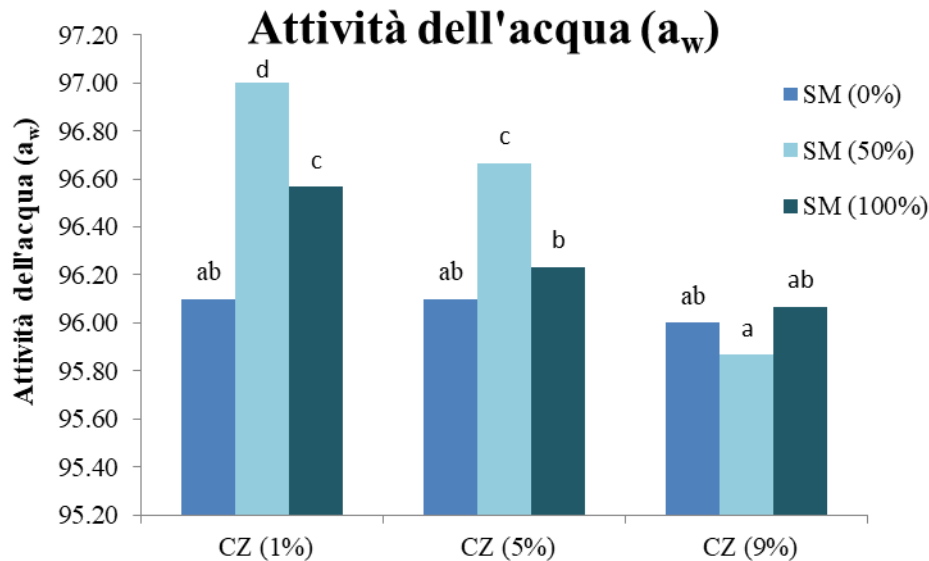
L'attività dell'acqua, a differenza del contenuto di acqua, è in grado di determinare la conservabilità di un alimento, permettendo di prevedere se determinati microrganismi saranno fattori potenziali di alterazione o rischio igienico-sanitario (Sandulachi, 2012); i valori di attività dell'acqua di alcuni alimenti possono portare al deterioramento, ad esempio, un valore di  $a_w$  di 0.60 è causa di deterioramento microbico del miele, a 0.75-0.65 porta ad alterazioni dello zucchero di canna grezzo (Beuchat, 1981).

Nella figura 16 vengono illustrati i risultati sull'attività dell'acqua misurati su pani nei quali è stata variata la % totale zuccherina, dall'1, 5 e 9%, e la % di sostituzione di miele, dallo 0, 50 e 100%. È possibile constatare come l'incremento della concentrazione zuccherina si traduca in una riduzione proporzionale dell'attività dell'acqua ( $p$ -value  $<0.05$ ); il valore più elevato è stato misurato alla dose zuccherina più bassa (96.60), mentre quello più basso (95.98), alla dose più elevata, alla % zuccherina del 5%, invece è stato osservato un valore intermedio (96.33). Per quanto riguarda gli effetti della sostituzione dello zucchero col miele, si osserva un aumento dell'attività dell'acqua con l'incremento della sostituzione zucchero miele ( $p$ -value  $<0.05$ ): infatti, i valori più elevati sono stati osservati alla dose di sostituzione maggiore e intermedia (96.29 e 96.51), mentre il valore più basso, è stato determinato allo 0% di sostituzione (96.07). La controtendenza rispetto ai campioni di controllo può essere spiegata dalla presenza di acqua nel miele (17% circa) che ha portato all'incremento dell'attività nell'acqua proprio laddove il miele è stato aggiunto alla formulazione (SM 50% e SM 100%); al massimo livello di sostituzione, tuttavia, potrebbe aver influito l'effetto osmotico esercitato dall'elevata concentrazione di miele, il quale ha determinato una riduzione meno marcata dell'attività dell'acqua.



**Figura 16:** Effetto dei fattori CZ e SM sull'attività dell'acqua  
*Significatività statistica: lettere minuscole indicano il fattore CZ, lettere maiuscole il fattore SM (p-value <0.05)*

In figura 17 vengono messi in evidenza i risultati ottenuti con l'interazione dei fattori CZ e SM. È possibile appurare come il campione che ha registrato il valore più elevato sia quello all'1% di concentrazione zuccherina, alla % intermedia di sostituzione (97), seguito dai campioni CZ (1%) SM (100%) e CZ (5%) SM (100%). I valori più bassi dell'attività dell'acqua sono stati riscontrati al massimo livello di CZ e al minimo livello di sostituzione e ciò potrebbe essere spiegato dall'effetto igroscopico delle sostanze zuccherine utilizzate e dalla composizione del miele che contiene in media il 17% di acqua.

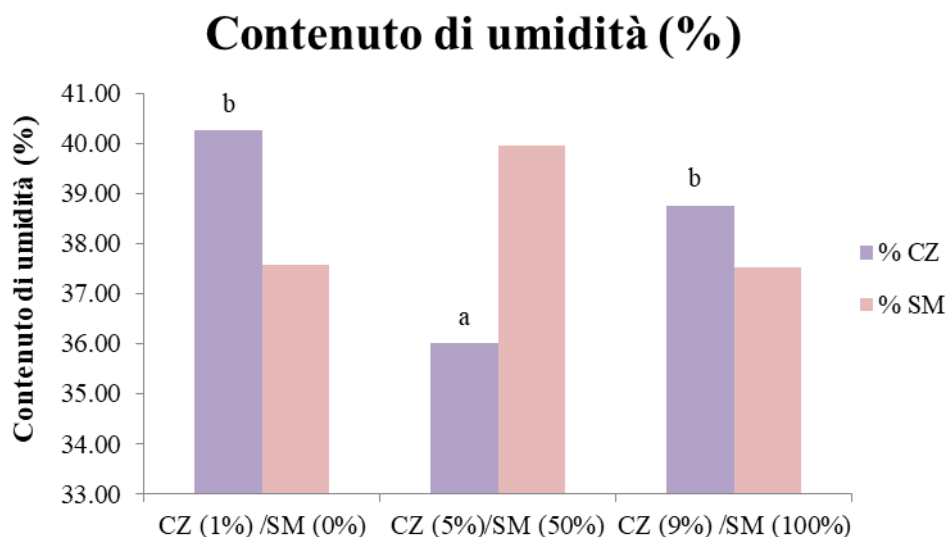


**Figura 17:** Effetto dell'interazione dei fattori CZ e SM sull'attività dell'acqua  
*Significatività statistica: lettere differenti indicano differenza statisticamente significativa (p-valore < 0.05)*

#### 4.2.4 Contenuto di umidità

L'acqua riveste un ruolo fondamentale nel controllo della gelatinizzazione dell'amido, nella consistenza dell'impasto e nella cottura. In formulazioni ricche di zuccheri l'assorbimento dell'acqua può essere inferiore al 50% rispetto a formulazioni in cui vengono adoperate farine integrali, in cui l'assorbimento può arrivare a oltre l'80% (Sluimer, 2007).

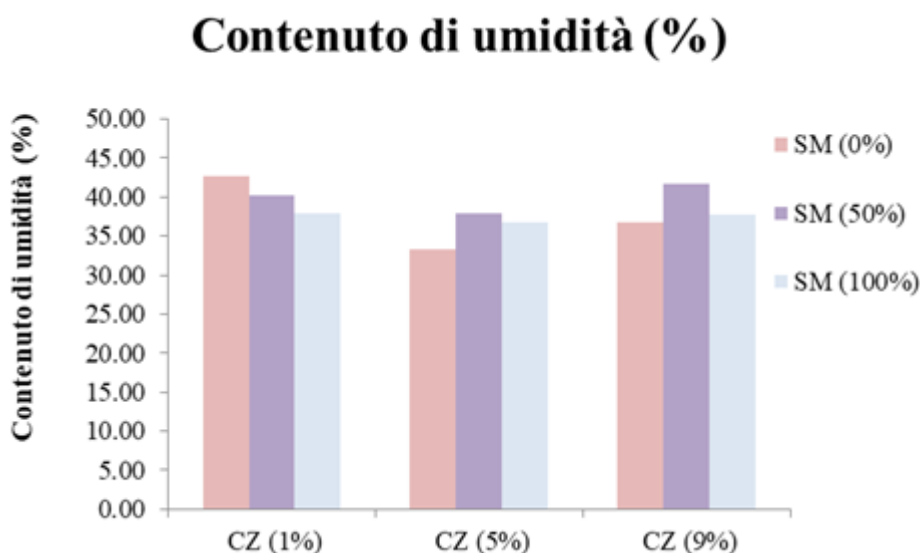
Nel grafico della figura 18 vengono mostrati i risultati osservati nei campioni oggetto dell'analisi, in cui era stata variata la % totale zuccherina e la % di sostituzione zuccheromiele. Si può appurare come il contenuto di umidità diminuisca all'aumentare della % della sostanza zuccherina (p-value > 0.05): il valore più elevato è stato misurato nel campione contenente l'1% (40.26), il più basso alla concentrazione intermedia (36.01), mentre al 9% è stato osservato un incremento dell'umidità rispetto al precedente campione. La riduzione dei valori del contenuto di umidità è riconducibile all'effetto osmotico esercitato dallo zucchero, il quale tende a legare l'acqua contenuta nell'impasto. La sostituzione del miele non ha prodotto risultati significativi.



**Figura 18:** Effetto dei fattori CZ sul contenuto di umidità  
*Significatività indicano statistica: lettere minuscole indicano il fattore CZ (p-value <0.05).*

In figura 19 vengono illustrati i risultati relativi all'interazione dei fattori % sostanza zuccherina totale e sostituzione zucchero-miele.

È possibile appurare la tendenza alla riduzione del contenuto di umidità nei campioni all'1% di sostanza zuccherina, a crescenti dosi di sostituzione di miele (42.64, 40.19, 37.94) , tuttavia senza significatività statistica (p-value >0.05).



**Figura 19:** Effetto dell'interazione dei fattori CZ e SM sul contenuto di umidità  
*Significatività statistica: Non significativo*

### **4.3 Analisi reologiche empirico-imitative sugli impasti**

#### **4.3.1 Determinazione delle proprietà viscosimetriche degli impasti tramite RVA**

I risultati inerenti le proprietà viscosimetriche degli impasti senza glutine, sono indicate nella tabella 5. Come si può evincere, il fattore CZ ha mostrato una differenza statisticamente significativa solo per quanto riguarda i parametri Total Setback e Setback, mentre il fattore SM, ha inciso esclusivamente sul parametro Setback. I 2 valori di setback fanno riferimento a ciò che succede durante l'ultima fase del test con il raffreddamento del gel che diventa via via più elastico sviluppando le proprietà tipiche dei solidi. I due parametri rappresentano quindi una misura indiretta della retrogradazione dell'amido, in particolare soprattutto per quanto riguarda l'amilosio poiché il processo di retrogradazione dell'amilopectina risulta essere più lento e strettamente dipendente dalla temperatura di conservazione e dal rapporto amido: acqua (Okoli, 1998).

Secondo quanto dimostrato da Collar (2003), i valori di Setback sono strettamente legati alla velocità di rafferimento; più nello specifico, valori elevati di Setback, si traducono in una velocità del tempo di rafferimento minore, per cui la sostituzione del miele ha influito positivamente su tale parametro.

**Tabella 5:** Effetto dei fattori CZ e SM sulle proprietà viscosimetriche degli impastiSignificatività statistica: lettere minuscole indicano il fattore CZ, lettere maiuscole il fattore SM ( $p$ -value < 0.05)

Proprietà viscosimetriche	Pasting temperature (°C)	Peak viscosity (cP)	Hold viscosity (cP)	Final viscosity (cP)	Viscosity at 95°C	Breakdown	Total Setback (cP)	Setback (cP)
<b>CZ (%)</b>								
1	81.9	2770.0	2048.2	3770.3	47.8	621.8	1622.2b	1000.3b
5	82.9	2531.0	2011.2	3428.5	42.7	519.8	1417.3ab	897.5ab
9	82.9	2461.7	1969.2	3293.3	30.5	493.7	1324.2a	831.7a
<b>SM (%)</b>								
0	82.7	2504.5	1883.2	3312.8	34.7	521.3	1329.7	808.3A
50	81.8	2611.0	2071.3	3595.2	52.3	539.7	1523.8	984.2B
100	83.1	2647.2	2074.0	3584.2	34.0	574.3	1510.2	937.0B
<b>Interazione CZ-SM</b>								
CZ (1%) SM(0%)	82.7	2572.0	1694.0	3401.0	29.5	578.0	1407.0	829.0
CZ (1%) SM(50%)	79.8	3052.0	2316.0	4171.0	77.0	736.0	1855.0	1119.0
CZ (1%) SM(100%)	83.2	2686.0	2134.5	3739.0	37.0	551.5	1604.5	1053.0
CZ (5%) SM(0%)	81.3	2577.5	2056.0	3371.5	42.5	521.5	1315.5	794.0
CZ (5%) SM(50%)	84.2	2344.0	1902.5	3288.0	51.0	441.5	1385.5	944.0
CZ (5%) SM(100%)	83.2	2671.5	2075.0	3626.0	34.5	596.5	1551.0	954.5
CZ (9%) SM(0%)	84.2	2364.0	1899.5	3166.0	32.0	464.5	1266.5	802.0
CZ (9%) SM(50%)	81.5	2437.0	1995.5	3326.5	29.0	441.5	1331.0	889.5
CZ (9%) SM(100%)	83.0	2584.0	2012.5	3387.5	30.5	575.0	1375.0	803.5



## 4.4 Analisi reologiche empirico-imitative sul pane fresco

### 4.4.1 *Puncture test* (Test di penetrazione)

Il test di penetrazione, noto anche come *puncture test*, misura la forza richiesta per spingere una sonda d'acciaio all'interno di un alimento. Lipowitz (1861, Germania) fu il primo a sviluppare uno strumento specifico per testare gli alimenti, mettendo a punto un test di penetrazione per la marmellata, mentre l'italiano Carpi (1884) sviluppò un test di penetrazione per l'olio di oliva e altri grassi (Bourne, 2002). Il test è stato eseguito facendo agire la sonda per la penetrazione del pane in tre punti specifici: al centro e alle estremità laterali. Attraverso il test è stato possibile stabilire la forza di penetrazione applicata dalla sonda sulla crosta dei campioni di pane oggetto della sperimentazione, ricavando in questo modo una "misura" della durezza della crosta. Nella tabella 6 è possibile notare che l'aumento della CZ ha determinato un incremento della durezza della crosta, espresso sia come forza sia come gradiente, non significativo fino alla percentuale intermedia della sperimentazione (16.19 N) a cui è seguito invece, per il livello più alto, un valore significativamente più basso (10.26 N). La sostituzione con il miele al contrario non ha determinato risultati statisticamente significativi (p-value >0.05). Tale comportamento potrebbe essere giustificato dalla minore durezza ed elasticità della mollica/crosta nei campioni CZ 1 e CZ 5 rispetto al campione CZ 9 dove la maggiore concentrazione zuccherina utilizzata potrebbe aver prodotto uno strato esterno più croccante e meno resistente all'ingresso della sonda come confermato dal parametro Area 2. Per quanto riguarda il fattore SM l'unico parametro che ha mostrato differenze significative è l'Area 2, relativo alla durezza della mollica nello strato sottostante la crosta. I dati confermano che il miele rispetto al saccarosio comporta un incremento proporzionale significativo di tale parametro all'aumento della percentuale di sostituzione.

**Tabella 6:** Effetto della concentrazione zuccherina totale e della sostituzione zucchero-miele sulle proprietà meccaniche della crosta

Significatività statistica: lettere minuscole indicano il fattore CZ, lettere maiuscole il fattore SM ( $p$ -value < 0.05)

Puncture test	Forza (N)	Gradiente (N/sec)	Area 1 (mm <sup>2</sup> )	Area 2 (mm <sup>2</sup> )
<b>CZ (%)</b>				
1	14.69b	7.72b	21.43	26.93b
5	16.19b	9.10b	19.89	33.19c
9	10.26a	3.05a	21.56	13.51°
<b>SM (%)</b>				
0	12.65	5.09	22.49	20.57°
50	13.76	7.06	19.93	24.59AB
100	14.72	7.71	20.47	28.48B
<b>Interazione</b>				
<b>CZ-SM</b>				
CZ (1%) SM(0%)	13.20	5.01	25.13	22.10
CZ (1%) SM(50%)	16.17	9.12	21.67	29.32
CZ (1%) SM(100%)	14.70	9.02	17.50	29.38
CZ (5%) SM(0%)	15.12	7.90	19.48	28.04
CZ (5%) SM(50%)	16.57	9.83	18.97	34.41
CZ (5%) SM(100%)	16.87	9.57	21.22	37.12
CZ (9%) SM(0%)	9.65	2.37	22.86	11.56
CZ (9%) SM(50%)	8.53	2.25	19.14	10.04
CZ (9%) SM(100%)	12.59	4.54	22.68	18.93

#### 4.4.2 TPA (*Texture Profile Analysis*)

In tabella 7 vengono riportati i risultati relativi ai parametri presi in considerazione, ottenuti variando i fattori CZ e SM. L'*hardness* ha subito una riduzione significativa all'aumentare della concentrazione totale zuccherina, registrando il valore più alto alla dose più bassa (8.96 N), ed il più basso alla dose intermedia (6.66), mentre un valore intermedio alla dose maggiore; i risultati ottenuti confermano che l'incremento della dose di zucchero nell'impasto ha aumentato la morbidezza della mollica, riducendo, di conseguenza l'*hardness* ed ha permesso di stabilire che tale incremento non è proporzionale alla dose di sostanza zuccherina utilizzata ma dopo il 5% tende a risalire (Carrai, 2010). Per la sostituzione zucchero - miele, si è verificato un aumento della durezza a percentuali di sostituzione crescenti (6.45 N per lo 0%, 8.07 N per il 50% e 8.09 N per il 100%); ciò risulta in forte contrasto da quanto riportato

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari" – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

in un lavoro da Tong et al nel 2010, in cui il miele aggiunto nella formulazione di un impasto di frumento aveva incrementato la morbidezza del pane, grazie alla presenza del fruttosio, maggiormente igroscopico rispetto al saccarosio. Pertanto non è ben chiaro il motivo per cui la variazione di concentrazione zuccherina e la sostituzione col miele nel pane senza glutine abbiano sortito l'effetto opposto. Una possibile ragione tuttavia potrebbe essere ricercata nella composizione del miele che come ben sappiamo non è costituito dal 100% di zuccheri ma anche da una quota di acqua (in media 17%).

I valori della *springiness*, hanno mostrato un leggerissimo incremento dei valori a concentrazioni crescenti di CZ, rispettivamente pari a 0.98 mm per l'1%, 0.99 mm per il 5% e 0.99 mm per il 9%, mentre la sostituzione con il miele non ha mostrato differenze significative.

Risultati simili con piccole variazioni in ogni caso significative sono state determinate nel parametro *cohesiveness* e *resilience*, in cui si è vista una diminuzione dei valori a dosi crescenti di sostituzione miele, mentre il fattore CZ non ha prodotto risultati statisticamente significativi. I dati relativi alla *chewiness* dimostrano che all'aumentare della CZ corrisponde una diminuzione della forza necessaria a masticare il campione fin dalla percentuale pari al 5%. Risultati contrari per il fattore SM in cui, parallelamente a quanto succede con il parametro *hardness*, i campioni in cui si è utilizzato solo zucchero sono più "masticabili" rispetto a quelli realizzati con una sostituzione parziale o totale del saccarosio con il miele.

L'interazione dei fattori CZ e SM sulle proprietà meccaniche della mollica sono riportate in tabella 7.

Per quanto riguarda la durezza (*hardness*), l'influenza dell'interazione dei due fattori, ha mostrato un aumento dei valori alla percentuale zuccherina inferiore, facendo registrare il valore più alto alla % di sostituzione maggiore (9.48 N), seguito da quello alla sostituzione intermedia (9.18 N; stessa tendenza ma meno evidente, per quanto riguarda le % del 5 e del 9%, in completa assenza di miele, i quali hanno mostrato i valori più bassi tra i campioni, e rispettivamente pari a 5.47 N e 5.45 N.

La masticabilità (*chewiness*), ha seguito il medesimo trend dell'*hardness*; i valori più bassi sono stati determinati negli stessi campioni in cui si erano verificati maggiori valori di *hardness*, per cui, i campioni con valori più bassi di *chewiness*, e quindi considerati "più masticabili", hanno esibito valori più alti di durezza. Anche in questo caso la sostituzione con il miele, ha influito sull'incremento dei valori per ciascuna percentuale zuccherina,

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

determinando valori più elevati proprio ai livelli intermedio e totale di sostituzione (5.33 N per il campione CZ (1%) SM (100%), seguito dal CZ (1%) SM (50%) con 4.92 N, e CZ (1%) SM (0%) con 4.62 N). I valori più bassi sono stati misurati sui campioni CZ (5%) SM (0%) con 3.13 N, CZ (9%) SM (0%) con 3.22 N, e infine sul campione CZ (5%) SM (100%) con 3.66 N.

L'interazione sul parametro *cohesiveness*, indica come i dati ottenuti siano strettamente legati alla concentrazione zuccherina, subendo un incremento all'aumentare della sua percentuale, ma anche all'aumentare della dose di sostituzione, fatta eccezione per il campione CZ (9%) SM (100%), che ha mostrato non solo il valore più basso della concentrazione zuccherina del 9%, ma anche il valore più basso in assoluto tra i campioni. Al contrario, laddove è avvenuta la sostituzione dello 0% e del 100%, sono stati osservati i valori più alti (0.60 per entrambi) a parità di percentuale zuccherina.

Infine, in relazione al parametro *resilience*, alla massima percentuale zuccherina, è stato ottenuto un aumento dei valori, in modo particolare in assenza di miele e alla sua dose di sostituzione intermedia (0.32 per entrambi), senza tuttavia determinare una differenza statisticamente significativa; il valore più basso è scaturito dalla medesima concentrazione zuccherina, ma al livello massimo di sostituzione (0.24), seguito dai campioni CZ (1%) SM (100%) (0.27), e CZ (5%) SM (0%) e (100%), benché non vi sia differenza tra di essi.

**Tabella 7:** Effetto dei fattori CZ e SM sulle proprietà meccaniche della mollica  
*Significatività statistica: lettere minuscole indicano il fattore CZ, lettere maiuscole il fattore SM (p-value <0.05)*

TPA	Hardness (N)	Springiness	Cohesiveness	Chewiness (N)	Resilience
<b>CZ (%)</b>					
1	8.95b	0.98a	0.57	4.96b	0.29
5	6.66a	0.99b	0.56	3.70a	0.28
9	7.01a	0.99b	0.57	3.92a	0.29
<b>SM (%)</b>					
0	6.45°	0.98	0.57B	3.66A	0.30B
50	8.07B	0.98	0.57B	4.52B	0.29B
100	8.09B	0.98	0.55A	4.39B	0.27A
<b>Interazione CZ-SM</b>					
CZ (1%) SM(0%)	8.17d	0.97	0.58cde	4.62de	0.31cd
CZ (1%) SM(50%)	9.18e	0.97	0.55b	4.92e	0.27b
CZ (1%) SM(100%)	9.48e	0.98	0.57bcde	5.33f	0.30bcd
CZ (5%) SM(0%)	5.74a	0.99	0.55bc	3.13a	0.28bc
CZ (5%) SM(50%)	7.72cd	0.99	0.56bc	4.30cd	0.29bc
CZ (5%) SM(100%)	6.53b	0.99	0.57bcd	3.66b	0.28bc
CZ (9%) SM(0%)	5.45a	0.99	0.60de	3.22a	0.32d
CZ (9%) SM(50%)	7.31bc	0.99	0.60e	4.34cd	0.32d
CZ (9%) SM(100%)	8.26d	0.98	0.52a	4.19c	0.24a

#### 4.5 Analisi dell'immagine sulla mollica

Nella tabella 8 sono mostrati i risultati relativi ai parametri alveolometrici della mollica, le cui immagini sono riportate in figura 20. In merito all'area media alveolare, essa fornisce un'idea della misura degli alveoli (Eduardo et al., 2014); la variazione della percentuale di concentrazione zuccherina totale ha determinato, dal punto di vista della distribuzione alveolare, un valore più elevato per la percentuale pari al 5 rispetto alle due percentuali più estreme, 1 e 9. Tale risultato, in accordo con il numero di alveoli, potrebbe essere giustificato dall'azione dei lieviti durante la fermentazione che ha determinato un elevato numero di alveoli per i campioni con le percentuali più estreme, giustificabile o da una fermentazione più lunga nel caso dell'1% o da una fermentazione più intensa e più rapida nel caso del 9%.

La sostituzione del miele, ha portato a risultati significativi solo per quanto riguarda il numero degli alveoli (p-value >0.05), in cui è stato osservato registrando un aumento a dosi crescenti di

sostituzione e in modo particolare alla % intermedia (SM 50%), probabilmente attribuibile a una fermentazione più lenta perché è noto che le specie di *Saccharomyces cerevisiae* utilizzate nella produzione di *starter* panari prediligono come substrato fermentativo il glucosio al fruttosio, che a sua volta ha portato a una più ampia distribuzione della CO<sub>2</sub> durante la lievitazione, se paragonata ai campioni di controllo SM 0%. L'area totale e l'area % non hanno determinato alcuna differenza statisticamente significativa nei campioni, per entrambi i fattori, così come il fattore SM nell'area media (p-value >0.05).

**Tabella 8:** Parametri dell'analisi dell'immagine sulla mollica  
*Significatività statistica: lettere minuscole indicano il fattore CZ, lettere maiuscole il fattore SM (p-value <0.05)*

<b>Analisi dell'immagine della mollica</b>	<b>Area totale alveolare (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Area media alveolare (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>N° alveoli</b>	<b>Area alveolare %</b>
<b>CZ (%)</b>				
1	451.00	4.88a	94.50b	50.11
5	450.33	5.61b	81.67a	50.04
9	449.21	4.68a	97.33b	49.01
<b>SM (%)</b>				
0	450.61	5.31	86.17A	50.07
50	449.41	4.72	97.33B	49.93
100	450.51	5.14	90.00AB	50.06
<b>Interazione CZ-SM</b>				
CZ (1%) SM(0%)	451.12	4.77	85.50	50.12
CZ (1%) SM(50%)	453.22	4.54	95.00	50.36
CZ (1%) SM(100%)	448.66	5.32	103.00	49.85
CZ (5%) SM(0%)	451.20	6.03	75.25	50.13
CZ (5%) SM(50%)	447.18	5.13	81.25	49.69
CZ (5%) SM(100%)	452.61	5.66	88.50	50.29
CZ (9%) SM(0%)	449.50	5.12	88.25	49.94
CZ (9%) SM(50%)	447.84	4.49	100.50	49.76
CZ (9%) SM(100%)	450.28	4.43	103.25	50.03

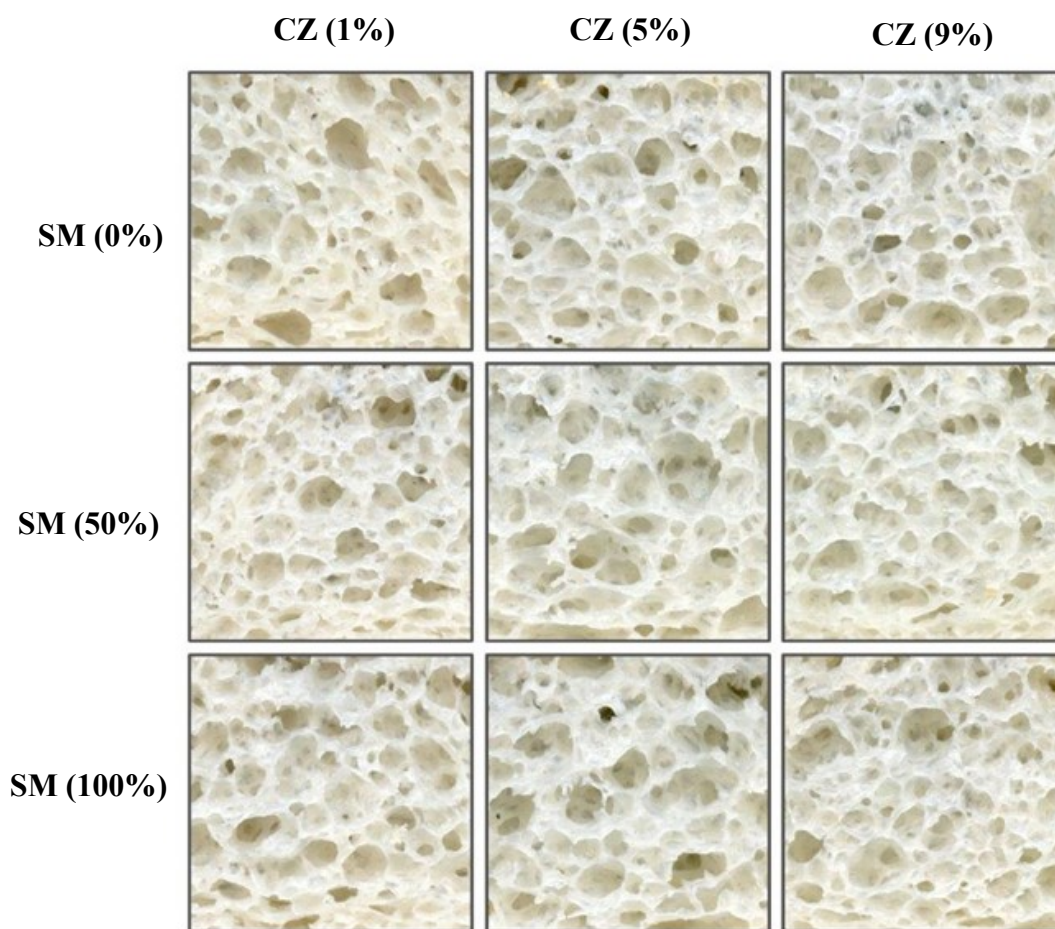


Figura 20: Immagini dell'alveolatura della mollica

#### 4.6 Determinazione delle frazioni polifenoliche del pane fresco

##### 4.6.1 Determinazione del contenuto di polifenoli totali

Le sostanze fenoliche sono i prodotti del metabolismo secondario delle piante, indispensabili a funzioni essenziali come crescita e riproduzione, intervenendo nei meccanismi di difesa contro patogeni e parassiti, e partecipando al colore della pianta. I polifenoli vengono introdotti nella nostra dieta; attraverso il consumo giornaliero di frutta, verdura e cereali, la quantità introdotta è di circa 1g/giorno, che è molto più elevata rispetto a tutti gli altri antiossidanti alimentari, come ad esempio, circa 10 volte più alta della vitamina C, e circa 100 volte più elevata della vitamina E e dei carotenoidi (Zdunczyk et al., 2006). Ne fanno parte i fenoli, i tannini ed i flavonoidi (Sito 15). I cereali contengono fitochimici unici che integrano quelli della frutta e della verdura se consumati insieme. La biodisponibilità dei composti fenolici può differire in maniera significativa nella capacità dell'organismo di assumere i polifenoli da una determinata matrice alimentare, e nell'interazione tra polifenoli e proteine ematiche, così come i

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari



trasportatori cellulari (D'Archivio et al., 2010). La classe più importante di composti fenolici nei cereali è quella degli acidi fenolici, in forma libera, solubile e insolubile. Frumento e riso contengono la percentuale più alta di polifenoli totali, anche se, tuttavia, la tipologia e la quantità dipendono dalla varietà coltivata, e dal cereale preso in considerazione, oltre che dall'area geografica (Tiwari, Brunton & Brennan, 2013). I cereali integrali sono ricchi di composti fenolici, ma il loro quantitativo nel prodotto finale varia notevolmente in base alle materie prime utilizzate della formulazione e alle tecnologie utilizzate. A tal proposito, anche il processo di panificazione influisce sul contenuto e sulla biodisponibilità dei composti fenolici nel pane; da alcuni studi è emerso come la lavorazione dell'impasto porti a una riduzione complessiva dei polifenoli totali, come l'acido ferulico, l'acido salicilico, l'acido clorogenico in vari cereali (Anson et al., 2009), raggiungendo percentuali fino al 50%, sebbene la quantità di acido ferulico libero incrementi. Anche il processo fermentativo contribuisce a incrementare la biodisponibilità dei polifenoli, sia attraverso la degradazione enzimatica nei cereali, sia grazie a quella operata dai microrganismi attivati dal lievito (Đorđević et al., 2010). Anche le condizioni di fermentazione, come la temperatura, il pH e la durata, influiscono sul contenuto di acidi fenolici, inoltre è stato dimostrato che il loro quantitativo è dipendente anche dalle condizioni di cottura. Infatti il loro quantitativo viene perso a causa della degradazione, condensazione ossidativa o decomposizione di fenoli termolabili, dovute all'alta temperatura (Alvarez-Jubete et al., 2010), sebbene in altri studi venga affermato il contrario: la cottura ha incrementato il contenuto di polifenoli totali e di acido ferulico (Lu et al., 2014). L'effetto della temperatura sui polifenoli liberi o legati, potrebbe essere imputabile alla natura e alla fonte dei polifenoli stessi, così come alla tecnologia di panificazione (lievitazione naturale o con lievito di birra) (Lu et al., 2014; Jackson & Hosney, 1986). La reazione di Maillard può contribuire anch'essa alla formazione di strutture fenoliche.

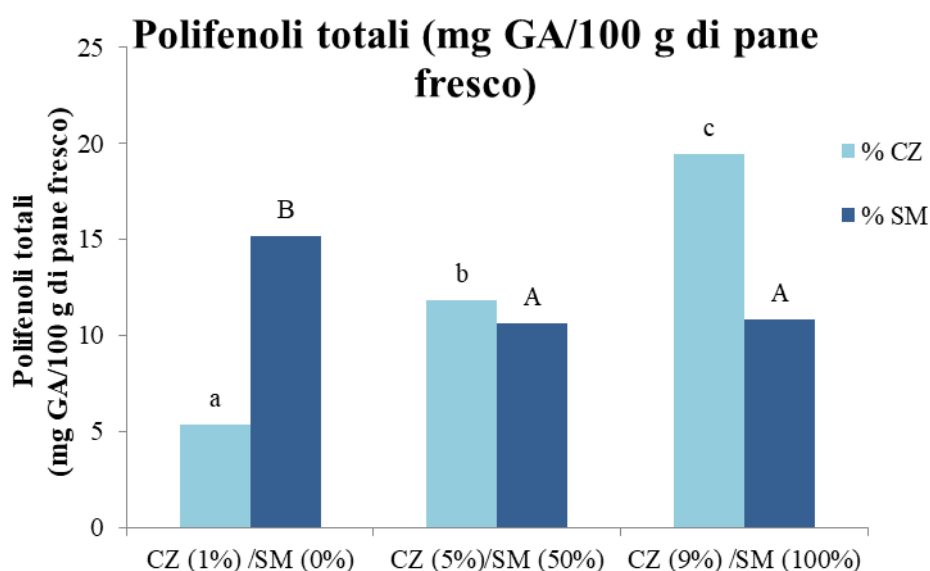
In figura 21 sono riportati i risultati sui polifenoli totali ottenuti dal pane fresco, con la variazione della sostanza zuccherina totale (CZ%) e la sostituzione zucchero miele (SM %). È chiaro come il contenuto dei polifenoli totali aumenti a dosi crescenti di CZ, in particolare al livello massimo. Con la sostituzione del miele si è assistito al fenomeno inverso: a livelli di sostituzione crescenti la quantità di polifenoli totali si è ridotta notevolmente, in particolare alla sostituzione intermedia e massima (p-value >0.05);

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

tuttavia i dati ottenuti non sono in linea con quelli attesi, e pertanto vanno considerati con cautela. È possibile avanzare due ipotesi per fornire una spiegazione quantomeno plausibile a tali risultati:

- 1) Come sopra riportato, è possibile che vi sia stata un'interferenza da parte dei prodotti di Maillard sulla lettura spettrofotometrica;
- 2) Oppure potrebbe essersi verificata un'interferenza da parte della tirosina, che a causa della sua struttura aromatica, potrebbe avere avuto un impatto sull'assorbanza (Istasse et al., 2016).



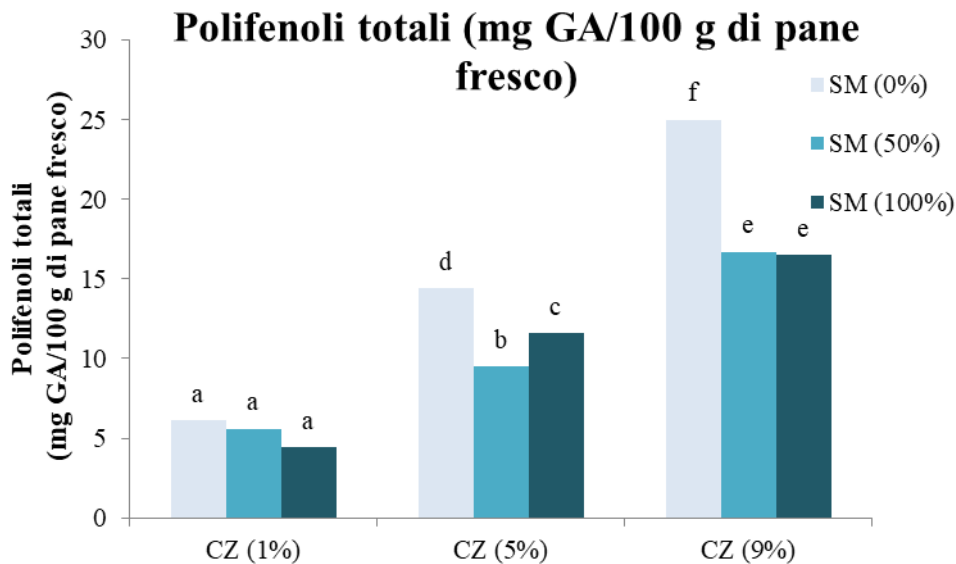
**Figura 21:** Influenza dei fattori CZ e SM sul contenuto di polifenoli totali nel pane fresco  
*Significatività statistica: lettere minuscole indicano il fattore CZ, lettere maiuscole il fattore SM (p-value <0.05)*

Nel grafico riportato in figura 22 viene specificato l'effetto dell'interazione dei fattori CZ e SM sul contenuto di polifenoli totali.

Analogamente a quanto visto analizzando i singoli fattori (Figura 21) il contenuto dei polifenoli totali ha subito un incremento a percentuali crescenti di sostanza zuccherina, e per ciascuna concentrazione si è verificata una diminuzione degli stessi a livelli di sostituzione maggiori.

I valori più bassi sono stati riscontrati alla percentuale zuccherina inferiore senza differenza significativa fra i 3 campioni in esame; alla percentuale intermedia si è

verificato un primo decremento al livello di sostituzione del 50%, per poi aumentare lievemente al livello massimo; infine in merito alla percentuale zuccherina più elevata, il quantitativo di polifenoli totali laddove è avvenuta la sostituzione (50 e 100%) è identico (p-value >0.05).



**Figura 22:** Interazione tra i fattori CZ e SM sul contenuto di polifenoli totali

Significatività statistica: lettere minuscole indicano il fattore CZ, lettere maiuscole il fattore SM (p-value <0.05)

#### 4.6.2 Determinazione della frazione solubile, insolubile e bioaccessibile dei polifenoli

I polifenoli solubili hanno generalmente funzioni antiossidanti e antimicrobiche, mentre i composti fenolici insolubili si originano principalmente dall'instaurarsi di legami covalenti di tipo estere tra composti fenolici, prevalentemente idrossicinnamati e loro derivati, e composti costituenti la parete cellulare (Bonsi, 2012).

Ad un'analisi più dettagliata, è emerso, analogamente a quanto visto riguardo i polifenoli totali, che anche la frazione solubile, conserva lo stesso trend, facendo verificare un incremento a dosi di sostanza zuccherina crescente. La sostituzione con il miele, invece non ha determinato risultati significativi (p-value >0.05) (figura 23).

Anche in questo caso, i dati non sono in linea con quelli attesi, pertanto è possibile supporre le medesime considerazioni citate nel paragrafo precedente.

L'interazione tra fattori (figura 24) ha portato a un aumento della quantità dei polifenoli solubili, a percentuali crescenti di sostanza zuccherina, registrando anche un incremento a

---

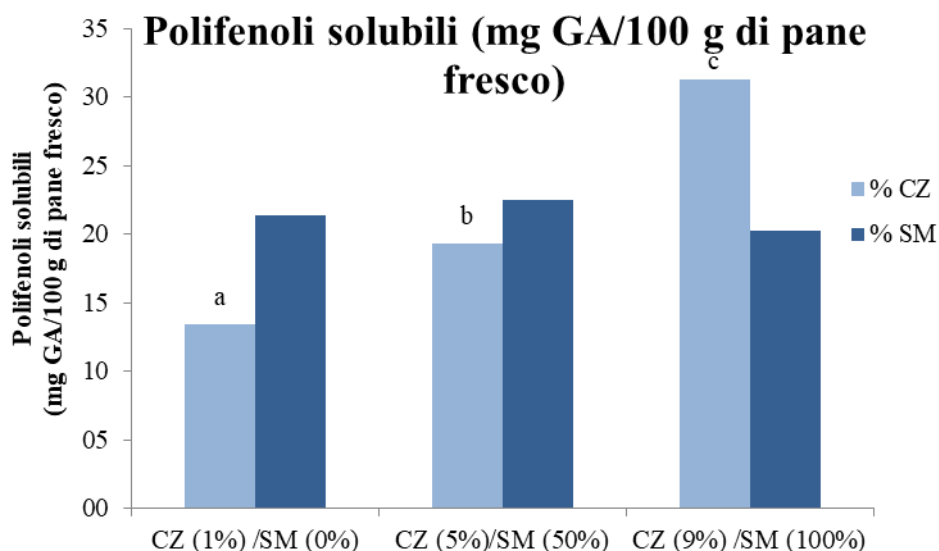
Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari" – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

dosi crescenti di sostituzione: per quanto riguarda la percentuale minima (1%), essa ha fatto registrare i valori più bassi tra tutti i campioni, e nello specifico quello in cui il miele era assente, mentre al 5% i valori non hanno evidenziato particolari differenze; il valore maggiore in assoluto è stato misurato alla massima concentrazione zuccherina, mentre la sostituzione ha avuto come conseguenza un decremento; tuttavia tra i campioni non esiste differenza significativa (p-value >0.05).

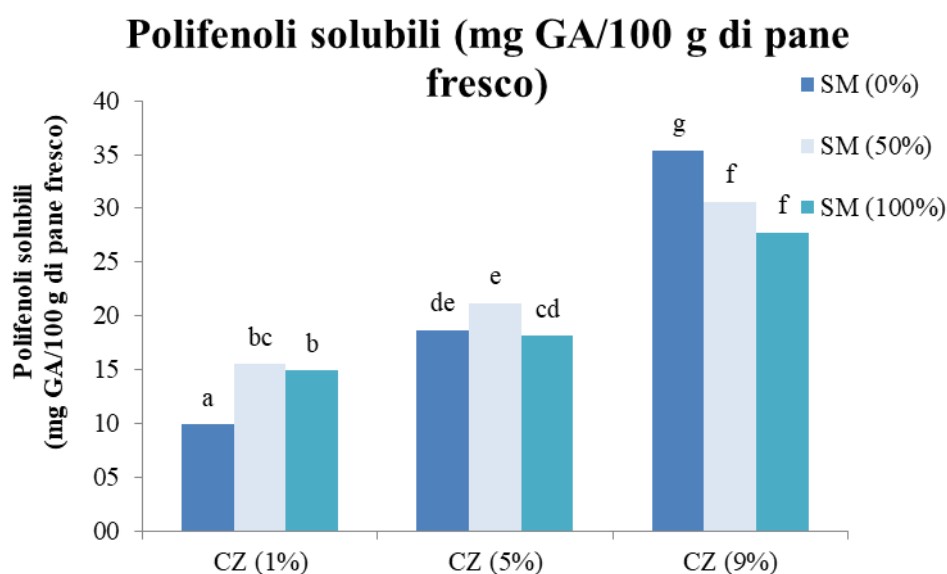
La frazione insolubile ha rappresentato la quota preponderante. La variazione dei due fattori, tuttavia in questo caso, non ha portato a differenze significative, sebbene vi sia una tendenza all'aumento, a dosi crescenti di sostanza zuccherina (figura 25). Anche l'interazione non ha portato a differenze statisticamente significative (figura 26).

Il concetto di bio-accessibilità è importante in quanto fa riferimento ai composti potenzialmente assorbibili dal lume intestinale, determinata attraverso una simulazione in vivo della digestione. Studi in vitro sono stati sviluppati per comprendere gli effetti della matrice alimentare e di diverse tecniche sulla capacità dei nutrienti dei composti bioattivi come i polifenoli, in modo tale da essere disponibili per l'assorbimento (Alminger et al., 2014). Nella figura 27 vengono riportati i risultati relativi alla frazione bio-accessibile dei polifenoli. È possibile constatare una crescita dei polifenoli all'incremento della sostanza zuccherina (5% e 9%), e una concomitante riduzione con la sostituzione zucchero-miele (50% e 100%), senza differenza tra campioni. In maniera analoga a quanto supposto nei paragrafi precedenti, riguardo i polifenoli totali e solubili si ipotizzano interferenze da parte dei prodotti di Maillard e della struttura aromatica della tirosina sull'assorbanza (Istasse et al., 2016).

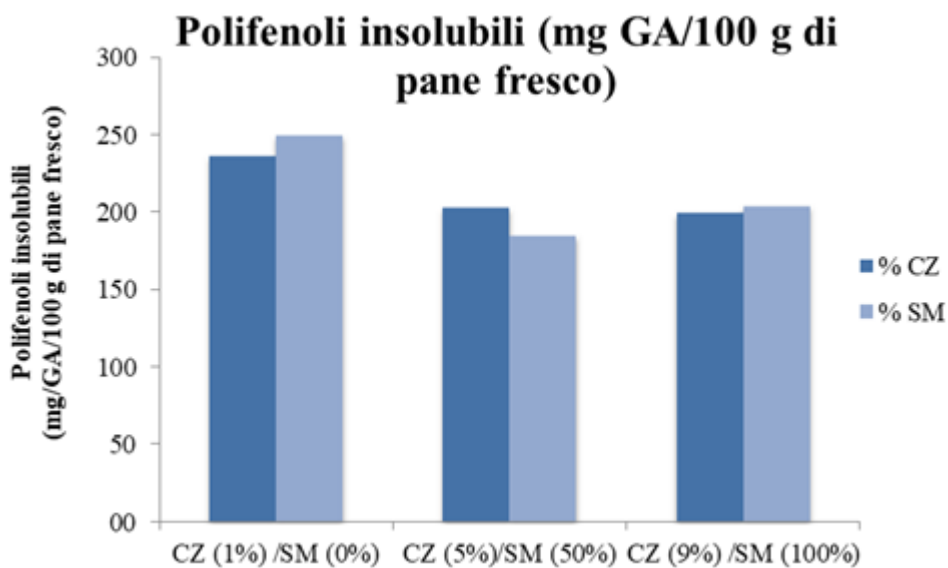
L'interazione, invece non ha determinato differenze statisticamente significative (figura 28).



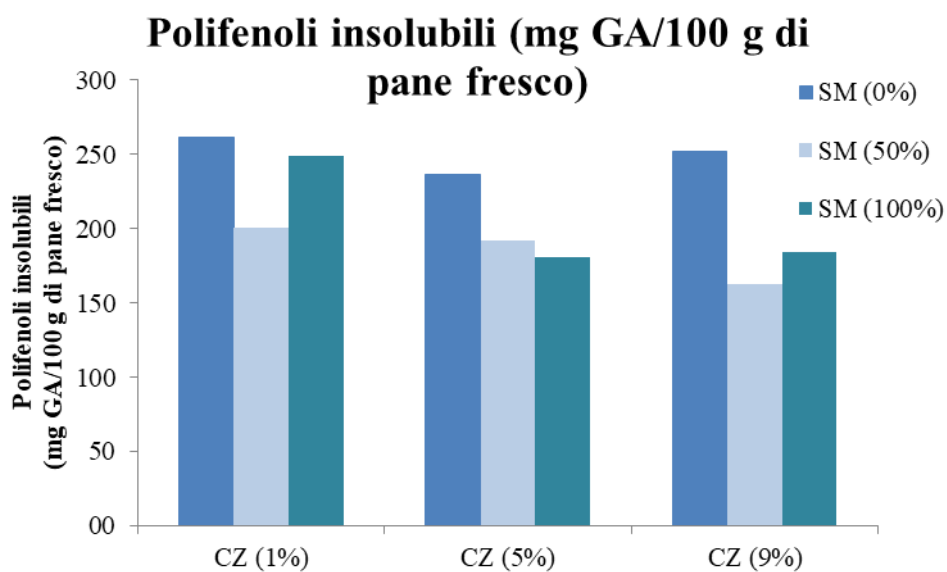
**Figura 23:** Influenza dei fattori CZ e SM sulla frazione solubile dei polifenoli nel pane fresco  
*Significatività statistica: lettere minuscole indicano il fattore CZ (p-value <0.05)*



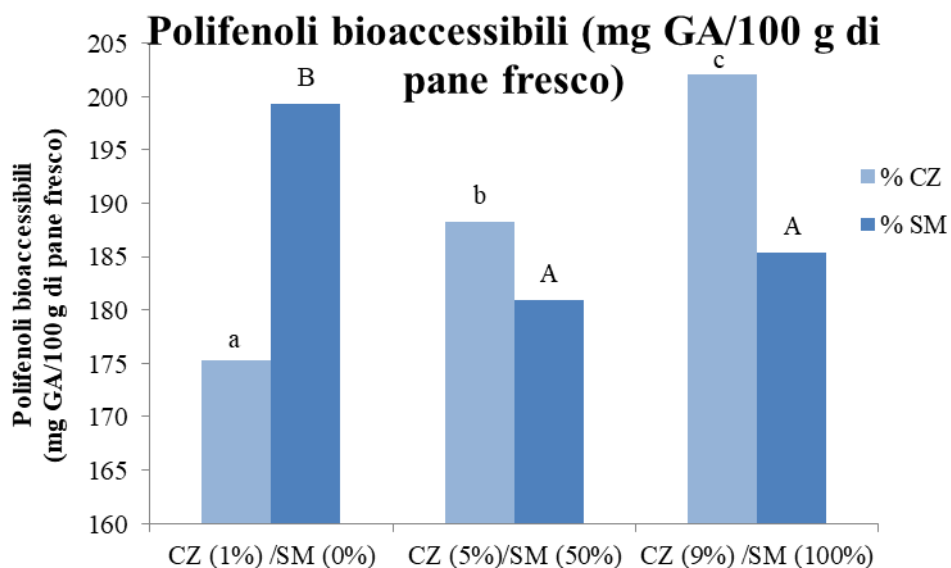
**Figura 24** Interazione tra i fattori CZ e SM sulla frazione solubile dei polifenoli nel pane fresco  
*Significatività statistica: lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (p-value <0.05)*



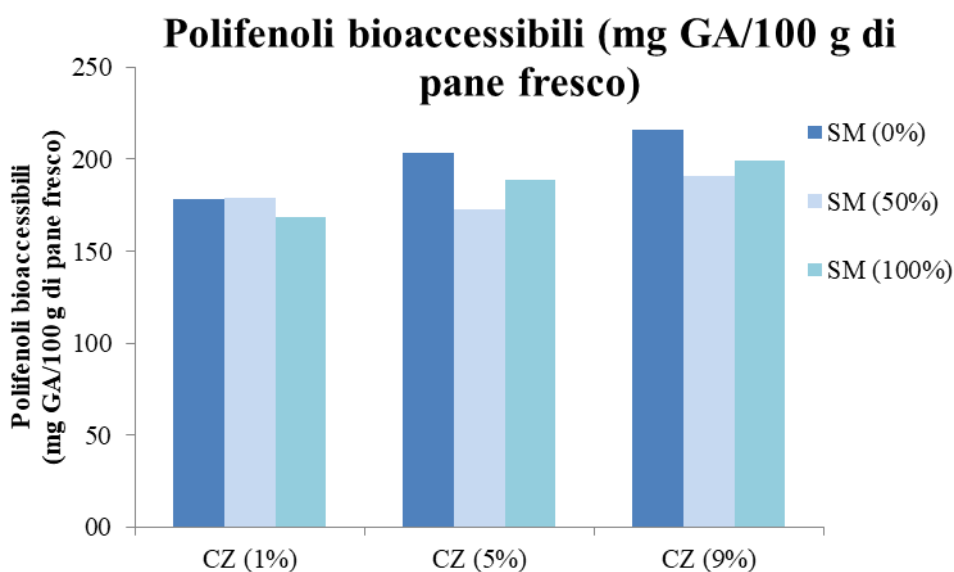
**Figura 25:** Influenza dei fattori CZ e SM sulla frazione insolubile dei polifenoli nel pane fresco  
*Significatività statistica: non significativo ( $p$ -value > 0.05)*



**Figura 26** Interazione tra i fattori CZ e SM sulla frazione insolubile dei polifenoli nel pane fresco  
*Significatività statistica: non significativo ( $p$ -value > 0.05)*



**Figura 27** Influenza dei fattori CZ e SM sulla frazione bioaccessibile dei polifenoli nel pane fresco  
*Significatività statistica: lettere minuscole indicano il fattore CZ, lettere maiuscole il fattore SM (p-value <0.05)*



**Figura 28** Interazione tra i fattori CZ e SM sulla frazione bioaccessibile dei polifenoli nel pane fresco  
*Significatività statistica: non significativo (pvalue >0.05)*

#### 4.7 Analisi sensoriale

Per valutare al meglio gli effetti dei due fattori analizzati sulle caratteristiche sensoriali dei campioni prodotti sono state effettuate tre sedute di assaggio differenti: nella prima ai giudici è stato chiesto di assaggiare i campioni contenenti l'1% di sostanza zuccherina (CZ (1%) SM (0%), CZ (1%) SM (50%), CZ (1%) SM (100%) dove 0, 50 e 100 rappresentano la percentuale di sostituzione del saccarosio con il miele); nella seconda seduta ai giudici sono stati fatti assaggiare i campioni contenenti il 5% di sostanza zuccherina (CZ (5%) SM (0%), CZ (5%) SM (50%), CZ (5%) SM (100%), e nella terza seduta i campioni che contenevano invece il 9% di sostanza zuccherina (CZ (9%) SM (0%), CZ (9%) SM (50%), CZ (9%) SM (100%). Infine l'ultima seduta è stata effettuata con i tre campioni che, nelle sedute precedenti avevano mostrato maggior gradimento per uno o più attributi da parte dei consumatori, anche se questi potevano non risultare significativamente diversi.

I risultati dell'Anova di Friedman effettuata sui campioni contenenti l'1% di sostanza zuccherina sono riportati nella tabella 9.

Dai risultati non si evincono differenze significative per quanto riguarda la piacevolezza per tutti gli attributi analizzati tranne che per il colore della crosta dove il campione con il 50% di sostituzione del saccarosio con il miele risulta significativamente preferito.



**Tabella 9:** Risultati ottenuti dall'Anova di Friedman e LSD Test ( $p < 0,05$ ) sui campioni con l'1% di sostanza zuccherina. Sono riportate le medie dei ranghi per ciascun campione e ciascun attributo e le differenze significative riscontrate. n.s. = non significativo; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ .

Campioni	Colore crosta	Odore	Dolcezza	Aromi in bocca	Consistenza crosta	Consistenza mollica	Accettabilità globale
CZ(1%) SM(0%)	1.87a	1.95	2.02	2.09	1.87	2.09	2.13
CZ(1%) SM(50%)	2.42b	2.23	1.98	1.97	2.23	2.09	2.12
CZ(1%) SM(100%)	1.71a	1.82	1.98	1.94	1.90	1.82	1.76
Significatività	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

In tabella 10 vengono riportati i risultati sui campioni al 5% di sostanza zuccherina. Come si può notare il campione con una percentuale di sostituzione del saccarosio con il miele del 50 % risulta significativamente più apprezzato per l'olfatto e la dolcezza in bocca. La presenza del miele è comunque apprezzata anche per la piacevolezza degli aromi in bocca. Non vi sono differenze significative per quanto riguarda il colore della crosta e la consistenza della crosta e della mollica, mentre l'accettabilità globale risulta superiore.

**Tabella 10:** Risultati ottenuti dall'Anova di Friedman e LSD Test ( $p < 0.05$ ) sui campioni con il 5% di sostanza zuccherina. Sono riportate le medie dei ranghi per ciascun campione e ciascun attributo e le differenze significative riscontrate. n.s. = non significativo; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

<b>Campioni</b>	<b>Colore crosta</b>	<b>Odore</b>	<b>Dolcezza</b>	<b>Aromi in bocca</b>	<b>Consistenza crosta</b>	<b>Consistenza mollica</b>	<b>Accettabilità</b>
CZ(5%) SM(50%)	1.86	2.09ab	1.71b	1.70b	1.71	1.76	1.73b
CZ(5%) SM(50%)	2.08	2.27a	2.44a	2.17a	2.14	2.02	2.30a
CZ(5%) SM(100%)	2.06	1.64b	1.85b	2.14a	2.15	2.23	1.97ab
Significatività	n.s.	**	**	*	n.s.	n.s.	*

Anche nel caso dell'analisi sui campioni al 9% di sostanza zuccherina, non sono presenti differenze significative per quanto riguarda la piacevolezza per tutti gli attributi analizzati tranne che per il colore della crosta dove il campione con il 50% di sostituzione del saccarosio con il miele risulta significativamente preferito (tabella 11).

**Tabella 11:** Risultati ottenuti dall'Anova di Friedman e LSD Test ( $p < 0.05$ ) sui campioni con il 9% di sostanza zuccherina. Sono riportate le medie dei ranghi per ciascun campione e ciascun attributo e le differenze significative riscontrate. n.s. = non significativo; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

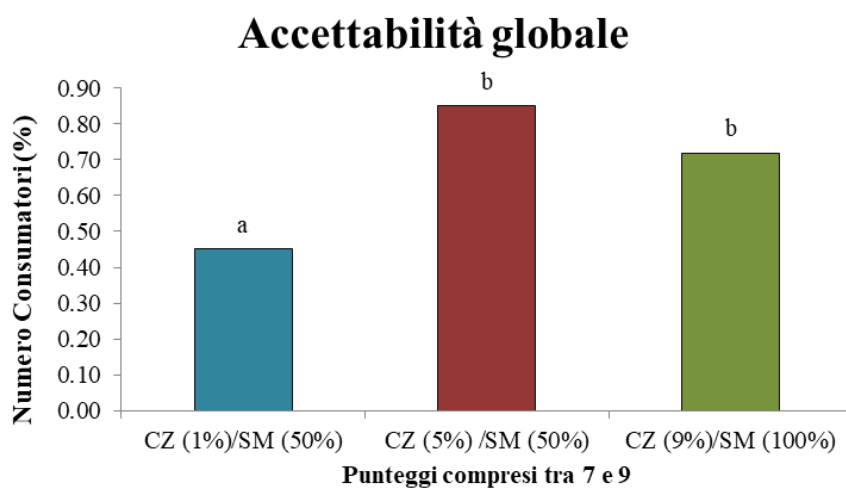
Campioni	Colore crosta	Odore	Dolcezza	Aromi in bocca	Consistenza crosta	Consistenza mollica	Accettabilità
CZ(9%) SM(0%)	1.74b	2.13	1.90	2.06	1.90	1.78	1.90
CZ(9%) SM(50%)	2.24a	2.00	2.06	1.96	1.90	2.03	1.94
CZ(9%) SM(100%)	2.02ab	1.87	2.04	1.98	2.20	2.20	2.16
Significatività	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Invece quando analizzando i risultati ottenuti fra i campioni maggiormente preferiti nelle sedute precedenti, è bene evidente la differenza di accettabilità per i tre campioni valutati. Come si può notare in tabella 12 il campione CZ (5%) SM (50%) risulta il più gradito per tutti gli attributi valutati dal panel di consumatori. Il campione, inoltre è significativamente più gradito in particolare per l'odore e la dolcezza.

**Tabella 12:** Risultati ottenuti dall'Anova di Friedman e LSD Test ( $p < 0.05$ ) sui tre campioni a differente concentrazione di sostanza zuccherina. Sono riportate le medie dei ranghi per ciascun campione e ciascun attributo e le differenze significative riscontrate. \*\*\*  $p < 0.001$ .

Campioni	Colore crosta	Odore	Dolcezza	Aromi in bocca	Consistenza crosta	Consistenza mollica	Accettabilità
CZ(1%) SM(50%)	1.30b	1.60b	1.72b	1.63b	1.50b	1.63b	1.49b
CZ(5%) SM(50%)	2.44a	2.44a	2.39a	2.38a	2.30a	2.17a	2.37a
CZ(9%) SM(100%)	2.26a	1.96b	1.89b	1.99ab	2.20a	2.20a	2.15a
Significatività	***	***	***	***	***	***	***

Infine nel grafico in figura 29 è riportata la percentuale di consumatori che ha assegnato un punteggio per l'accettabilità globale compreso tra 7 e 9: il campione CZ (5%) SM (50%) è stato valutato come maggiormente preferito dall'85 % dei consumatori, seguito dal campione CZ (9%) SM (100%).



**Figura 29:** Accettabilità globale espressa dai consumatori

## Capitolo 5

### Conclusioni

Il miele è un alimento utilizzato dall'uomo fin dall'antichità, sia a scopo curativo sia come dolcificante in campo alimentare. Lo studio da noi effettuato ha voluto colmare alcune lacune bibliografiche sul ruolo che il miele potrebbe svolgere sulle caratteristiche del pane *gluten-free*.

Durante l'attività di dottorato sono state sviluppate differenti formulazioni senza glutine variando per la prima volta sia la concentrazione zuccherina totale sia la percentuale di sostituzione del saccarosio col miele, allo scopo di valutare l'impatto di entrambi i fattori e della loro interazione sulle proprietà tecnologiche, nutrizionali e sensoriali.

Dal punto di vista tecnologico è possibile affermare che l'incremento della concentrazione di zucchero dal livello minimo già al livello intermedio consente di ottenere un miglioramento di alcuni indici qualitativi del pane come il volume specifico, colore e proprietà meccaniche al contrario della sostituzione del miele che in generale ha avuto un comportamento opposto. Tuttavia la sostituzione al 50% del saccarosio con il miele ha consentito di migliorare le proprietà viscosimetriche e la distribuzione degli alveoli rendendoli più numerosi e regolari.

Dal punto di vista nutrizionale il contenuto in polifenoli bioaccessibili è sembrato essere dipendente dal livello di sostanza zuccherina utilizzata più che dalla sostituzione parziale o totale del saccarosio con il miele.

Infine l'approfondita analisi sensoriale sul consumatore ha consentito di mettere in evidenza come a prescindere dalla percentuale di concentrazione zuccherina totale l'utilizzo del miele abbia migliorato le proprietà sensoriali dei pani prodotti.

I risultati ottenuti indicano quindi che il livello di sostanza zuccherina ottimale è il 5% che coincide con la percentuale più utilizzata nelle formulazioni per la produzione di pane senza glutine e sottolineano come il miele al 50% sia un valido ingrediente nel miglioramento delle caratteristiche dei pani *gluten-free*.

Infine, in futuro, sarebbe auspicabile avvalersi di uno strumento come la metodologia della superficie di risposta per definire al meglio la quantità di sostanza zuccherina e di miele/saccarosio in grado di ottimizzare le caratteristiche finali del pane senza glutine oltre all'utilizzo di un'analisi qualitativa per la determinazione del contenuto in sostanze antiossidanti.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

## Bibliografia

AACC (2005). *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*, 10th ed. AACC St. Paul, MN: The Association.

Abrams, S. A., Hawthorne, K. M., Aliu, O., Hicks, P. D., Chen, Z., & Griffin, I. J. (2007). An inulin-type fructan enhances calcium absorption primarily via an effect on colonic absorption in humans. *The Journal of Nutrition*, 137(10), 2208-2212.

Adams, F. (Ed.). (1856). *The extant works of aretaeus: the cappadocian* (Vol. 27). Sydenham Society.

Addo, K. (1997). Effects of honey type and level on the baking properties of frozen wheat flour doughs. *Cereal Foods World (USA)*.

Adeboye, A. S., Babajide, J. M., Shittu, T. A., Omemu, A. M., & Oluwatola, O. J. (2013). Effect of honey as partial sugar substitute on pasting properties, consumer preference and shelf stability of cassava-wheat composite bread. *Nigerian Food Journal*, 31(1), 13-22.

Admou, B., Essaadouni, L., Krati, K., Zaher, K., Sbihi, M., Chabaa, L., Belaabidia, B., & Alaoui-Yazidi, A. (2012). Atypical celiac disease: from recognizing to managing. *Gastroenterology Research And Practice*, 2012.

Akbari, M. R., Mohammadkhani, A., Fakheri, H., Zahedi, M. J., Shahbazkhani, B., Nouraie, M., Sotoudeh, M., Shakeri, R., & Malekzadeh, R. (2006). Screening of the adult population in Iran for coeliac disease: comparison of the tissue-transglutaminase antibody and anti-endomysial antibody tests. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 18(11), 1181-1186.

Akobeng, A. K., Ramanan, A. V., Buchan, I., & Heller, R. F. (2006). Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Archives of Disease In Childhood*, 91(1), 39-43.

Alarida, K., Harown, J., Ahmaida, A., Marinelli, L., Venturini, C., Kodermaz, G., Tozzoli, R., Mandolesi, A., Bearzi, I., & Catassi, C. (2011). Coeliac disease in Libyan

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari" – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

children: a screening study based on the rapid determination of anti-transglutaminase antibodies. *Digestive and Liver Disease*, 43(9), 688-691.

Ali, A., Shehzad, A., Khan, M. R., Shabbir, M. A., & Amjid, M. R. (2012). Yeast, its types and role in fermentation during bread making process-A. *Pakistan Journal of Food Sciences*, 22(3), 171-179.

Alminger, M., Aura, A. M., Bohn, T., Dufour, C., El, S. N., Gomes, A., Karakaja, S., Martínez-Cuesta, M. C., McDougall, G. J., Requena, T., & Santos, C. N. (2014). In vitro models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 413-436.

Al-Toma, A., Goerres, M. S., Meijer, J. W., Peña, A. S., Crusius, J. B. A., & Mulder, C. J. (2006). Human leukocyte antigen-DQ2 homozygosity and the development of refractory celiac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4(3), 315-319.

Alvarez-Jubete, L., Arendt, E. K., & Gallagher, E. (2009a). Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(sup4), 240-257.

Alvarez-Jubete, L., Holse, M., Hansen, Å., Arendt, E. K., & Gallagher, E. (2009b). Impact of baking on vitamin E content of pseudocereals amaranth, quinoa, and buckwheat. *Cereal chemistry*, 86(5), 511-515.

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), 770-778.

Anson, N. M., van den Berg, R., Havenaar, R., Bast, A., & Haenen, G. R. (2009). Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility. *Journal of Cereal Science*, 49(2), 296-300.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari" – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari



- Anton, A. A., & Artfield, S. D. (2008). Hydrocolloids in gluten-free breads: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(1), 11-23.
- Atkinson, F. S., Foster-Powell, K., & Brand-Miller, J. C. (2008). International tables of glycemic index and glycemic load values: 2008. *Diabetes Care*, 31(12), 2281-2283.
- Babajide, J. M., Adeboye, A. S., & Shittu, T. A. (2014). Effect of honey substitute for sugar on rheological properties of dough and some physical properties of cassava-wheat bread. *International Food Research Journal*, 21(5).
- Baillie, M. (1793). *The Morbid Anatomy of Some of the Most Important Parts of the Human Body* (Johnson, J. and Nicol, G., eds.).
- Bernardi, C., Sánchez, H., Freyre, M., & Osella, C. (2010). Gluten-free bread formulated with *Prosopis ruscifolia* (vinal) seed and corn flours. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(3), 245-255.
- Beuchat, L. R. (1981). Microbial stability as affected by water activity. *Cereal Foods World*, 26(7), 345-349.
- Biagi, F., Andrealli, A., Bianchi, P. I., Marchese, A., Klersy, C., & Corazza, G. R. (2009). A gluten-free diet score to evaluate dietary compliance in patients with coeliac disease. *British Journal of Nutrition*, 102(6), 882-887.
- Birch, A. N., Petersen, M. A., & Hansen, Å. S. (2013). The aroma profile of wheat bread crumb influenced by yeast concentration and fermentation temperature. *Food Science and Technology*, 50(2), 480-488.
- Blanco, C. A., Ronda, F., Pérez, B., & Pando, V. (2011). Improving gluten-free bread quality by enrichment with acidic food additives. *Food Chemistry*, 127(3), 1204-1209.
- Bonsi B. (2012) Nuovi ingredienti funzionali per l'applicazione in campo alimentare. Tesi di Dottorato, Università di Bologna, Italia.
- Bortolotti, L., & Marcazzan, G. L. (2017). *I prodotti dell'alveare*. Milano: Edizioni agricole (cap. 1).

- Bourne, M. (2002). *Food texture and viscosity: concept and measurement*. (2nd Edition). San Diego: Academic press.
- Briani, C., Samaroo, D., & Alaedini, A. (2008). Celiac disease: from gluten to autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 7(8), 644-650.
- Brites, C., Trigo, M. J., Santos, C., Collar, C., & Rosell, C. M. (2010). Maize-based gluten-free bread: influence of processing parameters on sensory and instrumental quality. *Food and Bioprocess Technology*, 3(5), 707-715.
- Buera, M. D. P., Lozano, R. D., & Petriella, C. (1986). Definition of colour in the non enzymatic browning process. *Die Farbe*, 32(33), 318-322.
- Camarca, M. E., Mozzillo, E., Nugnes, R., Zito, E., Falco, M., Fattorusso, V., Mobilia, S., Buono, P., Valerio, G., Troncone, R., & Franzese, A. (2012). Celiac disease in type 1 diabetes mellitus. *Italian Journal of Pediatrics*, 38(1), 10.
- Capriles, V. D., Martini, L. A., & Arêas, J. A. G. (2009). Metabolic osteopathy in celiac disease: importance of a gluten-free diet. *Nutrition Reviews*, 67(10), 599-606.
- Carciotti B (2011) Qualità della vita dei bambini celiaci. Tesi di Dottorato, Università di Bologna, Italia.
- Carlsson, A. K., Lindberg, B. A., Bredberg, A. C., Hyöty, H., & Ivarsson, S. A. (2002). Enterovirus infection during pregnancy is not a risk factor for celiac disease in the offspring. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 35(5), 649-652.
- Carpi, S. (1884) Die Entdeckung Fremder Oele im Olivenöl. *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 221, 963.
- Carrai, B., (2010). *Arte Bianca, Materie prime processi e controlli*. Milano: Edizioni agricole (Cap. 3, 6).
- Catassi, C., Rättsch, I. M., Gandolfi, L., Pratesi, R., Fabiani, E., El Asmar, R., Frijia, M., Bearzi, I., & Vizzoni, L. (1999). Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara?. *The Lancet*, 354(9179), 647-648.

Catassi, C., Macis, M. D., Räscht, I. M., De Virgiliis, S., & Cucca, F. (2001). The distribution of DQ genes in the Saharawi population provides only a partial explanation for the high celiac disease prevalence. *HLA*, 58(6), 402-406.

Catassi, C., Fabiani, E., Iacono, G., D'agate, C., Francavilla, R., Biagi, F., Volta, U., Accomando, S., Picarelli, A., De Vitis, I., Pianelli, G., Gesuita, R., Carle, F., Mandolesi, A., Bearzi, I., & Fasano, A., (2007). A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(1), 160-166.

Catassi, C., Gatti, S., & Fasano, A. (2014). The new epidemiology of celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 59, S7-S9.

Cauvain S, Young L. 1999. *Technology of breadmaking*. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers, Inc. p 295.

Cauvain., (2001). *S.P. Baking Problems Solved*, (1st ed), Woodhead.

Ciacci, C., Cirillo, M., Auriemma, G., Di Dato, G., Sabbatini, F., & Mazzacca, G. (1996). Celiac disease and pregnancy outcome. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 51(11), 643-644.

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  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA). *International Journal of Food Microbiology*, 137(2), 236-245.

Codex Alimentarius Commission. 2008. Codex standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. Codex Standard 118-1979. Available from: [www.codexalimentarius.net/input/download/standards/291/cxs\\_118e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/input/download/standards/291/cxs_118e.pdf) Accessed 2014 January 16.

Collar, C. (2003). Significance of viscosity profile of pasted and gelled formulated wheat doughs on bread staling. *European Food Research and Technology*, 216(6), 505-513.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum “Biotecnologie microbiche agroalimentari” – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

Collar, C., Conte, P., Fadda, C., & Piga, A. (2015). Gluten-free dough-making of specialty breads: Significance of blended starches, flours and additives on dough behaviour. *Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos*, 21(7), 523-536.

Collin, P., Maki, M., & Kaukinen, K. (2004). It is the compliance, not milligrams of gluten, that is essential in the treatment of celiac disease. *Nutrition Reviews*, 62(12), 490-490.

Cornejo, F., & Rosell, C. M. (2015). Influence of germination time of brown rice in relation to flour and gluten free bread quality. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6591-6598.

D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Sczzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321-1342.

Dahlbom, I., Olsson, M., Forooz, N. K., Sjöholm, A. G., Truedsson, L., & Hansson, T. (2005). Immunoglobulin G (IgG) anti-tissue transglutaminase antibodies used as markers for IgA-deficient celiac disease patients. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(2), 254-258.

Decreto Legislativo n° 179 del 21 maggio 2004.

de la Hera, E., Martinez, M., & Gómez, M. (2013). Influence of flour particle size on quality of gluten-free rice bread. *Food Science and Technology*, 54(1), 199-206.

de la Hera, E., Talegón, M., Caballero, P., & Gómez, M. (2013). Influence of maize flour particle size on gluten-free breadmaking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4), 924-932.

Del Castillo V, Lescano G, Armada M. (2009). Foods formulation for people with celiac disease based on quinoa (*Chenopodium quinoa*), cereal flours and starches mixtures. *Arch Latinoam Nutr* 59(3), 332–6.

Demirkesen, I., Mert, B., Sumnu, G., & Sahin, S. (2010). Utilization of chestnut flour in gluten-free bread formulations. *Journal of Food Engineering*, 101(3), 329-336.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari" – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

Demirkesen, I., Mert, B., Sumnu, G., & Sahin, S. (2010). Rheological properties of gluten-free bread formulations. *Journal of Food Engineering*, 96(2), 295-303.

Dewar, D. H., Donnelly, S. C., McLaughlin, S. D., Johnson, M. W., Ellis, H. J., & Ciclitira, P. J. (2012). Celiac disease: management of persistent symptoms in patients on a gluten-free diet. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 18(12), 1348.

Di Cagno, R., Rizzello, C. G., De Angelis, M., Cassone, A., Giuliani, G., Benedusi, A., Dimidone, A., Surico, R., & Gobbetti, M. (2008). Use of selected sourdough strains of *Lactobacillus* for removing gluten and enhancing the nutritional properties of gluten-free bread. *Journal of Food Protection*, 71(7), 1491-1495.

Dickey, W. (2002). Low serum vitamin B12 is common in coeliac disease and is not due to autoimmune gastritis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 14(4), 425-427.

Donnelly, S. C., Ellis, H. J., & Ciclitira, P. J. (2011). Pharmacotherapy and management strategies for coeliac disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 12(11), 1731-1744.

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*, 119(3), 957-963.

Eduardo, M., Svanberg, U., & Ahrné, L. (2014). Effect of hydrocolloids and emulsifiers on baking quality of composite cassava-maize-wheat breads. *International Journal of Food Science*, 2014.

Elfström, P., Montgomery, S. M., Kämpe, O., Ekbohm, A., & Ludvigsson, J. F. (2007). Risk of primary adrenal insufficiency in patients with celiac disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(9), 3595-3598.

Farrell, R. J., & Kelly, C. P. (2002). Celiac sprue. *New England Journal of Medicine*, 346(3), 180-188.

Fasano, A., & Catassi, C. (2001). Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology*, 120(3), 636-651.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari" – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

Fasano, A., Berti, I., Gerarduzzi, T., Not, T., Colletti, R. B., Drago, S., Elitsur, Y., Green, P. H. R., Guandalini, S., Hill, I. D., Pietzak, M., Ventura, A., Thorpe, M., Kryszak, D., Fornaroli, F., Wasserman, S. S., Murray, J. A., & Horvath, K. (2003). Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Archives of Internal Medicine*, 163(3), 286-292.

Fontana, A. J. (2000). Understanding the importance of water activity in food. *Cereal Foods World*, 45(1), 7-10.

Friedman, H. H., Whitney, J. E., & Szczesniak, A. S. (1963). The texturometer—a new instrument for objective texture measurement. *Journal of Food Science and Technology*, 28(4), 390-396.

Gallagher, E., Gormley, T. R., & Arendt, E. K. (2003). Crust and crumb characteristics of gluten free breads. *Journal of Food Engineering*, 56(2), 153-161.

Gallagher, E., Kunkel, A., Gormley, T. R., & Arendt, E. K. (2003). The effect of dairy and rice powder addition on loaf and crumb characteristics, and on shelf life (intermediate and long-term) of gluten-free breads stored in a modified atmosphere. *European Food Research and Technology*, 218(1), 44-48.

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

Gambus, H. (2005). Linseed (*Linum usitatissimum L*) as a source of nutrients in gluten-free bread. *Zywnosc-Nauka Technologia Jakosc*, 45, 61-74.

Gambus, H., Gambus, F., & Sabat, R. (2002). The research on quality improvement of gluten-free bread by amaranthus flour addition. *Zywnosc*, 9(2), 99-112.

Gandolfi, L., Pratesi, R., Cordoba, J. C. M., Tauil, P. L., Gasparin, M., & Catassi, C. (2000). Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. *The American Journal of Gastroenterology*, 95(3), 689-692.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum “Biotecnologie microbiche agroalimentari” – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

Gee, S. (1888). Herter cA, dicke WK. *On the coeliac affection*. St Barth Hosp Rep, 24, 17-20.

Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2), 259-275.

Gomez, J. C., Selvaggio, G. S., Viola, M., Pizarro, B., La Motta, G., De Barrio, S., Castelletto, R., Echeverría, R., Sugai, E., Vazquez, H., Mauriño, E., & Bai, J. C. (2001). Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. *The American Journal of Gastroenterology*, 96(9), 2700-2704.

Gray, J. A., & Bemiller, J. N. (2003). Bread staling: molecular basis and control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 1-21.

Gujral, H. S., Haros, M., & Rosell, C. M. (2003). Starch hydrolyzing enzymes for retarding the staling of rice bread. *Cereal Chemistry*, 80(6), 750-754.

Gujral, H. S., & Rosell, C. M. (2004). Functionality of rice flour modified with a microbial transglutaminase. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 225-230.

Gujral, H. S., & Rosell, C. M. (2004). Improvement of the breadmaking quality of rice flour by glucose oxidase. *Food Research International*, 37(1), 75-81.

Gutiérrez, L., Batlle, R., Andújar, S., Sánchez, C., & Nerín, C. (2011). Evaluation of Antimicrobial Active Packaging to Increase Shelf Life of Gluten-Free Sliced Bread. *Packaging Technology and Science*, 24(8), 485-494.

Hager, A. S., Ryan, L. A., Schwab, C., Gänzle, M. G., O'Doherty, J. V., & Arendt, E. K. (2011). Influence of the soluble fibres inulin and oat  $\beta$ -glucan on quality of dough and bread. *European Food Research and Technology*, 232(3), 405-413.

Hager, A. S., Wolter, A., Czerny, M., Bez, J., Zannini, E., Arendt, E. K., & Czerny, M. (2012). Investigation of product quality, sensory profile and ultrastructure of breads made from a range of commercial gluten-free flours compared to their wheat counterparts. *European Food Research and Technology*, 235(2), 333-344.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari" – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

Hager, A. S., & Arendt, E. K. (2013). Influence of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), xanthan gum and their combination on loaf specific volume, crumb hardness and crumb grain characteristics of gluten-free breads based on rice, maize, teff and buckwheat. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 195-203.

Haines, M. L., Anderson, R. P., & Gibson, P. R. (2008). Systematic review: the evidence base for long-term management of coeliac disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 28(9), 1042-1066.

Hamada, S., Suzuki, K., Aoki, N., & Suzuki, Y. (2013). Improvements in the qualities of gluten-free bread after using a protease obtained from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Cereal Science*, 57(1), 91-97.

He, H. A. N. D., & Hosney, R. C. (1991). Gas retention of different cereal flours. *Cereal Chemistry*, 68(4), 334-336.

Henry, W. F., Katz, M. H., Pilgrim, F. J., & May, A. T. (1971). Texture of semi-solid foods: sensory and physical correlates. *Journal of Food Science and Technology*, 36(1), 155-161.

Hernando, A., Mujico, J. R., Mena, M. C., Lombardía, M., & Mendez, E. (2008). Measurement of wheat gluten and barley hordeins in contaminated oats from Europe, the United States and Canada by Sandwich R5 ELISA. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 20(6), 545-554.

Hill, P. A., & Holmes, G. K. T. (2008). Coeliac disease: a biopsy is not always necessary for diagnosis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27(7), 572-577.

Houben, A., Höchstötter, A., & Becker, T. (2012). Possibilities to increase the quality in gluten-free bread production: an overview. *European Food Research and Technology*, 235(2), 195-208.

Hüttner, E. K., Dal Bello, F., & Arendt, E. K. (2010). Fundamental study on the effect of hydrostatic pressure treatment on the bread-making performance of oat flour. *European Food Research and Technology*, 230(6), 827-835.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari" – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari



ISO, E. (2007). *Sensory analysis—General guidance for the design of test rooms*. EN ISO, 8589, 2007.

Istasse, T., Jacquet, N., Berchem, T., Haubruge, E., Nguyen, B. K., & Richel, A. (2016). Extraction of Honey Polyphenols: Method Development and Evidence of Cis Isomerization. *Analytical Chemistry Insights*, 11, 49.

Ivarsson, A., Persson, L. Å., Nyström, L., Ascher, H., Cavell, B., Danielsson, L., Dannaeus, A., Lindberg, T., Lindquist, B., Stenhammar, L., & Hernell, O. (2000). Epidemic of coeliac disease in Swedish children. *Acta Paediatrica*, 89(2), 165-171.

Iwańczak, F., & Iwańczak, B. (2013). H. pylori infections in children: clinical, diagnostic and treatment implications. *Polski mercuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 35(208), 187-190.

Jackson, G. M., & Hosoney, R. C. (1986). Effect of endogenous phenolic acids on the mixing properties of wheat flour doughs. *Journal of Cereal Science*, 4(1), 79-85.

Janatuinen, E. K., Pikkarainen, P. H., Kemppainen, T. A., Kosma, V. M., Järvinen, R. M., Uusitupa, M. I., & Julkunen, R. J. (1995). A comparison of diets with and without oats in adults with celiac disease. *New England Journal of Medicine*, 333(16), 1033-1037.

Jenkins, D. J., Wolever, T. M., Taylor, R. H., Barker, H., Fielden, H., Baldwin, J. M., Bowling A. C., Newman H. C., Jenkins A. L., & Goff, D. V. (1981). Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34(3), 362-366.

Kagnoff, M. F., Austin, R. K., Hubert, J. J., Bernardin, J. E., & Kasarda, D. D. (1984). Possible role for a human adenovirus in the pathogenesis of celiac disease. *Journal of Experimental Medicine*, 160(5), 1544-1557.

Kagnoff, M. F. (2005). Overview and pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology*, 128(4), S10-S18.

Kinsey, L., Burden, S. T., & Bannerman, E. (2008). A dietary survey to determine if patients with coeliac disease are meeting current healthy eating guidelines and how their

---

Angela Scanu— Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free— Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum “*Biotechnologie microbiche agroalimentari*” – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

diet compares to that of the British general population. *European journal of clinical nutrition*, 62(11), 1333-1342.

Kiskini, A., Argiri, K., Kalogeropoulos, M., Komaitis, M., Kostaropoulos, A., Mandala, I., & Kapsokefalou, M. (2007). Sensory characteristics and iron dialyzability of gluten-free bread fortified with iron. *Food Chemistry*, 102(1), 309-316.

Kiskini, A., Kapsokefalou, M., Yanniotis, S., & Mandala, I. (2012). Effect of iron fortification on physical and sensory quality of gluten-free bread. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), 385-390.

Korus, J., Grzelak, K., Achremowicz, K., & Sabat, R. (2006). Influence of prebiotic additions on the quality of gluten-free bread and on the content of inulin and fructooligosaccharides. *Revista de Agaroquimica y Tecnologia de Alimentos*, 12(6), 489-495.

Korus, J., Juszczak, L., Ziobro, R., Witczak, M., Grzelak, K., & Sójka, M. (2012). Defatted strawberry and blackcurrant seeds as functional ingredients of gluten-free bread. *Journal of Texture Studies*, 43(1), 29-39.

Krupa-Kozak, U., Troszyńska, A., Bączek, N., & Soral-Śmietana, M. (2011). Effect of organic calcium supplements on the technological characteristic and sensory properties of gluten-free bread. *European Food Research and Technology*, 232(3), 497-508.

Krupa-Kozak, U., Altamirano-Fortoul, R., Wronkowska, M., & Rosell, C. M. (2012). Breadmaking performance and technological characteristic of gluten-free bread with inulin supplemented with calcium salts. *European Food Research and Technology*, 235(3), 545-554.

Lähdeaho, M. L., Lehtinen, M., Rissa, H. R., Hyöty, H., Reunala, T., & Mäki, M. (1993). Antipeptide antibodies to adenovirus E1b protein indicate enhanced risk of celiac disease and dermatitis herpetiformis. *International Archives of Allergy And Immunology*, 101(3), 272-276.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

- Lazaridou, A., Duta, D., Papageorgiou, M., Belc, N., & Biliaderis, C. G. (2007). Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. *Journal of Food Engineering*, 79(3), 1033-1047.
- Leffler, D. A., Dennis, M., Hyett, B., Kelly, E., Schuppan, D., & Kelly, C. P. (2007). Etiologies and predictors of diagnosis in nonresponsive celiac disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 5(4), 445-450.
- Li, S. Q., & Zhang, Q. H. (2001). Advances in the development of functional foods from buckwheat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41(6), 451-464.
- Lionetti, E., & Catassi, C. (2014). Co-localization of gluten consumption and HLA-DQ2 and-DQ8 genotypes, a clue to the history of celiac disease. *Digestive and Liver Disease*, 46(12), 1057-1063.
- Lipowitz, A. (1861). *Neue chemisch-technische Abhandlung*.
- Lohiniemi, S., Mäki, M., Kaukinen, K., Laippala, P., & Collin, P. (2000). Gastrointestinal symptoms rating scale in coeliac disease patients on wheat starch-based gluten-free diets. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 35(9), 947-949.
- Lu, Y., Luthria, D., Fuerst, E. P., Kiszonas, A. M., Yu, L., & Morris, C. F. (2014). Effect of processing on phenolic composition of dough and bread fractions made from refined and whole wheat flour of three wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(43), 10431-10436.
- Ludvigsson, J. F., Leffler, D. A., Bai, J. C., Biagi, F., Fasano, A., Green, P., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Kelly, P. C., Leonard, J. N., Lundin, K. E. A., Murray J.A., Sanders D. S., Walker M. M., Zingone F., & Ciacci, C. (2013). The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*, 62(1), 43-52.
- MacFie, H. J., Bratchell, N., Greenhoff, K., & Vallis, L. V. (1989). Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. *Journal of Sensory Studies*, 4(2), 129-148.

Macri, S. (1805). *Elementi di chimica: per uso della gioventù studiosa* (Vol. 2). Stamperia Simoniana.

Mäkinen, O. E., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2013). Germination of oat and quinoa and evaluation of the malts as gluten free baking ingredients. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(1), 90-95.

Mathlouthi, M. (2001). Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs. *Food Control*, 12(7), 409-417.

Mattila, P., & Kumpulainen, J. (2002). Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3660-3667.

Memeo, L., Jhang, J., Hibshoosh, H., Green, P. H., Rotterdam, H., & Bhagat, G. (2005). Duodenal intraepithelial lymphocytosis with normal villous architecture: common occurrence in H. pylori gastritis. *Modern Pathology*, 18(8), 1134-1144.

Miñarro, B., Albanell, E., Aguilar, N., Guamis, B., & Capellas, M. (2012). Effect of legume flours on baking characteristics of gluten-free bread. *Journal of Cereal Science*, 56(2), 476-481.

Minervini, F., Pinto, D., Di Cagno, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2011). Scouting the application of sourdough to frozen dough bread technology. *Journal of Cereal Science*, 54(3), 296-304.

Moore, M. M., Schober, T. J., Dockery, P., & Arendt, E. K. (2004). Textural comparisons of gluten-free and wheat-based doughs, batters, and breads. *Cereal Chemistry*, 81(5), 567-575.

Moore, M. M., Heinbockel, M., Dockery, P., Ulmer, H. M., & Arendt, E. K. (2006). Network formation in gluten-free bread with application of transglutaminase. *Cereal Chemistry*, 83(1), 28-36.

- Moore, M. M., Dal Bello, F., & Arendt, E. K. (2008). Sourdough fermented by *Lactobacillus p. lanthanum* FST1. 7 improves the quality and shelf life of gluten-free bread. *European Food Research and Technology*, 226(6), 1309-1316.
- Moreira, R., Chenlo, F., & Torres, M. D. (2012). Effect of shortenings on the rheology of gluten-free doughs: study of chestnut flour with chia flour, olive and sunflower oils. *Journal of Texture Studies*, 43(5), 375-383.
- Moroni, A. V., Dal Bello, F., & Arendt, E. K. (2009). Sourdough in gluten-free bread-making: an ancient technology to solve a novel issue?. *Food Microbiology*, 26(7), 676-684.
- Mujico, J. R., Mitea, C., Gilissen, L. J., de Ru, A., van Veelen, P., Smulders, M. J., & Koning, F. (2011). Natural variation in avenin epitopes among oat varieties: Implications for celiac disease. *Journal of Cereal Science*, 54(1), 8-12.
- Murray, J. A. (2005). Celiac disease in patients with an affected member, type 1 diabetes, iron-deficiency, or osteoporosis?. *Gastroenterology*, 128(4), S52-S56.
- Mustalahti, K., Catassi, C., Reunanen, A., Fabiani, E., Heier, M., McMillan, S., Murray, L., Metzger M-H., Gasparin, M., Bravi, E., & Mäki, M. (2010). The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Annals of Medicine*, 42(8), 587-595.
- Nachay, K. (2013). Putting better baked goods on the table. *Food Technology*, 67(12), 26-+.
- Nunes, M. H. B., Moore, M. M., Ryan, L. A., & Arendt, E. K. (2009). Impact of emulsifiers on the quality and rheological properties of gluten-free breads and batters. *European Food Research and Technology*, 228(4), 633-642.
- O'Shea N, Doran L, Auty M, Arendt E, Gallagher E. (2013). The rheology, microstructure and sensory characteristics of a gluten-free bread formulation enhanced with orange pomace. *Food Function* 4(12), 1856–63

Okoli, E. C. (1998). Effect of gamma irradiation on biochemical molting and keeping quality of sorghum grain. *Ndie, EC, Nnamani, CV and Oselebe, HO (2010). Some physicochemical characteristics of defatted flours derived from African walnut*, 909-911.

Oliveira, R. P., Sdepanian, V. L., Barreto, J. A., Cortez, A. J., Carvalho, F. O., Bordin, J. O., de Camargo, S., Maria, A., da Silva, P., Franczy, R., Kawakami, E., de Morais, M., Mauro, B., & Fagundes-Neto, U. (2007). High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 19(1), 43-49.

Onyango, C., Mutungi, C., Unbehend, G., & Lindhauer, M. G. (2011). Modification of gluten-free sorghum batter and bread using maize, potato, cassava or rice starch. *Food Science and Technology*, 44(3), 681-686.

Palmieri, N., Grillenzoni, F. V., Corvucci, F., Biondi, C., Bedini, G., & Floris, I. (2017). *Guida allo studio della melissopalinoologia*. Sassari: Centro di Ricerca Agricoltura e Ambiente, Università degli Studi di Sassari- Dipartimento di Agraria, Studio Naturalistico-Il Pianeta Naturale, Associazione apicoltori della Sardegna Apiarios de Arbarèe, (Origine e composizione del miele).

Pasqualone, A., Caponio, F., Summo, C., Paradiso, V. M., Bottega, G., & Pagani, M. A. (2010). Gluten-free bread making trials from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) flour and sensory evaluation of the final product. *International Journal of Food Properties*, 13(3), 562-573.

Pathak, D., Majumdar, J., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2016). Characterization of physicochemical properties in whole wheat bread after incorporation of ripe mango peel. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10(3), 554-561.

Peräaho, M., Collin, P., Kaukinen, K., Kekkonen, L., Miettinen, S., & Mäki, M. (2004). Oats can diversify a gluten-free diet in celiac disease and dermatitis herpetiformis. *Journal of the American Dietetic Association*, 104(7), 1148-1150.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum “*Biotechnologie microbiche agroalimentari*” – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

Pongjaruvat, W., Methacanon, P., Seetapan, N., Fuongfuchat, A., & Gamonpilas, C. (2014). Influence of pregelatinised tapioca starch and transglutaminase on dough rheology and quality of gluten-free jasmine rice breads. *Food Hydrocolloids*, 36, 143-150.

Prasad, K. K., Thapa, B. R., Nain, C. K., & Singh, K. (2010). The frequency of histologic lesion variability of the duodenal mucosa in children with celiac disease. *World Journal of Pediatrics*, 6(1), 60-64.

Praznik, W., Cieřlik, E., & Filipiak-Florkiewicz, A. (2002). Soluble dietary fibres in Jerusalem artichoke powders: Composition and application in bread. *Molecular Nutrition & Food Research*, 46(3), 151-157.

Pruska-Kędzior, A., Kędzior, Z., Gorący, M., Pietrowska, K., Przybylska, A., & Spsychalska, K. (2008). Comparison of rheological, fermentative and baking properties of gluten-free dough formulations. *European Food Research and Technology*, 227(5), 1523.

Pszczola, D. E. (2012). Ingredients-The Rise of Gluten-Free. *Food Technology-Chicago*, 66(12), 55.

Qunyi, T., Xiaoyu Z, Fang, W., Jingjing, T., Pinping, Z., Jing, Z., (2010). Effect of honey powder on dough rheology and bread quality. *Food Research International*, 43(9) 2284 – 2288.

Ragae, S., & Abdel-Aal, E. S. M. (2006). Pasting properties of starch and protein in selected cereals and quality of their food products. *Food Chemistry*, 95(1), 9-18.

Ranhotra, G. S., Loewe, R. J., & Puyat, L. V. (1975). Preparation and evaluation of soy-fortified gluten-free bread. *Journal of Food Science and Technology*, 40(1), 62-64.

Rashtak, S., Ettore, M. W., Homburger, H. A., & Murray, J. A. (2008). Comparative usefulness of deamidated gliadin antibodies in the diagnosis of celiac disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 6(4), 426-432.

Relazione annuale al Parlamento del 31 dicembre 2015.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari" – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

- Renzetti, S., Dal Bello, F., & Arendt, E. K. (2008). Microstructure, fundamental rheology and baking characteristics of batters and breads from different gluten-free flours treated with a microbial transglutaminase. *Journal of Cereal Science*, 48(1), 33-45.
- Renzetti, S., & Arendt, E. K. (2009). Effects of oxidase and protease treatments on the breadmaking functionality of a range of gluten-free flours. *European Food Research and Technology*, 229(2), 307-317..
- Ribotta, P. D., Ausar, S. F., Morcillo, M. H., Pérez, G. T., Beltramo, D. M., & León, A. E. (2004). Production of gluten-free bread using soybean flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(14), 1969-1974.
- Rubio-Tapia, A., Hill, I. D., Kelly, C. P., Calderwood, A. H., & Murray, J. A. (2013). ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease. *The American Journal Of Gastroenterology*, 108(5), 656-676.
- Sabanis, D., Tzia, C., & Papadakis, S. (2008). Effect of different raisin juice preparations on selected properties of gluten-free bread. *Food and Bioprocess Technology*, 1(4), 374-383.
- Sabanis, D., Lebesi, D., & Tzia, C. (2009). Effect of dietary fibre enrichment on selected properties of gluten-free bread. *Food Science and Technology*, 42(8), 1380-1389.
- Saleh, A. S., Zhang, Q., Chen, J., & Shen, Q. (2013). Millet grains: nutritional quality, processing, and potential health benefits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(3), 281-295.
- Salmeron, J., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Wing, A. L., & Willett, W. C. (1997). Dietary fiber, glycemic load, and risk of non—insulin-dependent diabetes mellitus in women. *Jama*, 277(6), 472-477.
- Sanders, D. S., Carter, M. J., Hurlstone, D. P., Pearce, A., Ward, A. M., McAlindon, M. E., & Lobo, A. J. (2001). Association of adult coeliac disease with irritable bowel syndrome: a case-control study in patients fulfilling ROME II criteria referred to secondary care. *The Lancet*, 358(9292), 1504-1508.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari



Sandulachi, E. (2012). Water activity concept and its role in food preservation. *Water Activity Concept and Its Role In Food Preservation*, 40-48.

Scazzina, F., Dall'Asta, M., Pellegrini, N., & Brighenti, F., (2014). Glycaemic index of some commercial gluten-free foods. *European Journal of Nutrition*, 54(6), 1021-1026.

Shah, S., & Leffler, D. (2010). Celiac disease: an underappreciated issue in women's health. *Women's Health*, 6(5), 753-766.

Schober, T. J., Messerschmidt, M., Bean, S. R., Park, S. H., & Arendt, E. K. (2005). Gluten-free bread from sorghum: quality differences among hybrids. *Cereal chemistry*, 82(4), 394-404.

Schober, T. J., Bean, S. R., & Boyle, D. L. (2007). Gluten-free sorghum bread improved by sourdough fermentation: biochemical, rheological, and microstructural background. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5137-5146.

Schober, T. J., Bean, S. R., Boyle, D. L., & Park, S. H. (2008). Improved viscoelastic zein–starch doughs for leavened gluten-free breads: Their rheology and microstructure. *Journal of Cereal Science*, 48(3), 755-767.

Schober, T. J., Moreau, R. A., Bean, S. R., & Boyle, D. L. (2010). Removal of surface lipids improves the functionality of commercial zein in viscoelastic zein-starch dough for gluten-free breadmaking. *Journal of Cereal Science*, 52(3), 417-425.

Schulze, M. B., Manson, J. E., Ludwig, D. S., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2004). Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. *Jama*, 292(8), 927-934.

Sciarini, L. S., Pérez, G. T., de Lamballerie, M., León, A. E., & Ribotta, P. D. (2012). Partial-baking process on gluten-free bread: impact of hydrocolloid addition. *Food and Bioprocess Technology*, 5(5), 1724-1732.

Sciarini, L. S., Ribotta, P. D., León, A. E., & Pérez, G. T. (2012). Incorporation of several additives into gluten free breads: Effect on dough properties and bread quality. *Journal of Food Engineering*, 111(4), 590-597.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

- Seguchi, M., Ozawa, M., Nakamura, C., & Tabara, A. (2012). Development of gluten-free bread baked with yam flour. *Food Science and Technology Research*, *18*(4), 543-548.
- Segura, M. E. M., & Rosell, C. M. (2011). Chemical composition and starch digestibility of different gluten-free breads. *Plant Foods for Human Nutrition*, *66*(3), 224.
- Shao, S., Duncan, A. M., Yang, R., Marcone, M. F., Rajcan, I., & Tsao, R. (2009). Tracking isoflavones: From soybean to soy flour, soy protein isolates to functional soy bread. *Journal of Functional Foods*, *1*(1), 119-127.
- Sherman, P. (1969). A Texture Profile of Foodstuffs Based upon Well-defined Rheological Properties. *Journal of Food Science and Technology*, *34*(5), 458-462.
- Shin, D. J., Kim, W., & Kim, Y. (2013). Physicochemical and sensory properties of soy bread made with germinated, steamed, and roasted soy flour. *Food Chemistry*, *141*(1), 517-523.
- Shittu, T. A., Raji, A. O., & Sanni, L. O. (2007). Bread from composite cassava-wheat flour: I. Effect of baking time and temperature on some physical properties of bread loaf. *Food Research International*, *40*(2), 280-290.
- Siqueira, M. P., Sandri L. T. B., & Capriles V. D. (2013). Optimization of sensory properties of unripe banana flour-based gluten-free bread: a mixture experimental design approach. *X Latin American Symposium of Food Science*. São Paulo, Brazil. 3–6 November 2013. Campinas. *Proceedings of X Latin American Symposium of Food Science*.
- Sivam, A. S., Sun-Waterhouse, D., Quek, S., & Perera, C. O. (2010). Properties of bread dough with added fiber polysaccharides and phenolic antioxidants: a review. *Journal of Food Science*, *75*(8).
- Sjöberg, K., Lindgren, S., & Eriksson, S. (1997). Frequent Occurrence of Non-Specific Gliadin Antibodies in Chronic Liver Disease Endomysial but Not Gliadin Antibodies Predict Coeliac Disease in Patients with Chronic Liver Disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *32*(11), 1162-1167.

- Sluimer, P., (2007). *Principles of breadmaking, Functionality of Raw Materials and Process Step*. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, inc. (Cap. 1, 2, 3).
- Smith, B. M., Bean, S. R., Herald, T. J., & Aramouni, F. M. (2012). Effect of HPMC on the Quality of Wheat-Free Bread Made from Carob Germ Flour-Starch Mixtures. *Journal of Food Science and Technology*, 77(6).
- Steadman, K. J., Burgoon, M. S., Lewis, B. A., Edwardson, S. E., & Obendorf, R. L. (2001). Buckwheat seed milling fractions: description, macronutrient composition and dietary fibre. *Journal of Cereal Science*, 33(3), 271-278.
- Stone, H., Bleibaum, R., & Thomas, H. A. (2012). *Sensory Evaluation Practices*. Academic press.
- Størdal, K., White, R. A., & Eggesbø, M. (2013). Early feeding and risk of celiac disease in a prospective birth cohort. *Pediatrics*, 132(5), e1202-e1209.
- Sun-Waterhouse, D., Chen, J., Chuah, C., Wibisono, R., Melton, L. D., Laing, W., Ferguson, L., & Skinner, M. A. (2009). Kiwifruit-based polyphenols and related antioxidants for functional foods: kiwifruit extract-enhanced gluten-free bread. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(sup7), 251-264.
- Szczesniak, A. S. (1963). Classification of textural characteristics. *Journal of Food Science and Technology*, 28(4), 385-389.
- Szczesniak, A. S., Brandt, M. A., & Friedman, H. H. (1963). Development of standard rating scales for mechanical parameters of texture and correlation between the objective and the sensory methods of texture evaluation. *Journal of Food Science and Technology*, 28(4), 397-403.
- Szczesniak, A. S. (1975). Textural characterization of temperature sensitive foods. *Journal of Texture Studies*, 6(1), 139-156.
- Thompson, T. (2000). Folate, iron, and dietary fiber contents of the gluten-free diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 100(11), 1389-1396.

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum “*Biotecnologie microbiche agroalimentari*” – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

Thompson, T., Dennis, M., Higgins, L. A., Lee, A. R., & Sharrett, M. K. (2005). Gluten-free diet survey: are Americans with coeliac disease consuming recommended amounts of fibre, iron, calcium and grain foods?. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 18(3), 163-169.

Tiwari, B. K., Brunton, N. P., & Brennan, C. (Eds.). (2013). *Handbook of plant food phytochemicals: sources, stability and extraction*. John Wiley & Sons.

Tong, Q., Zhang, X., Wu, F., Tong, J., Zhang, P., & Zhang, J. (2010). Effect of honey powder on dough rheology and bread quality. *Food Research International*, 43(9), 2284-2288.

Torbica, A., Hadnađev, M., & Dapčević, T. (2010). Rheological, textural and sensory properties of gluten-free bread formulations based on rice and buckwheat flour. *Food hydrocolloids*, 24(6), 626-632.

Vallons, K. J., Ryan, L. A., Koehler, P., & Arendt, E. K. (2010). High pressure-treated sorghum flour as a functional ingredient in the production of sorghum bread. *European Food Research and Technology*, 231(5), 711-717.

Vallons, K. J., Ryan, L. A., & Arendt, E. K. (2011). Promoting structure formation by high pressure in gluten-free flours. *Food Science and Technology*, 44(7), 1672-1680.

Van Berge-Henegouwen, G. P., & Mulder, C. J. (1993). Pioneer in the gluten free diet: Willem-Karel Dicke 1905-1962, over 50 years of gluten free diet. *Gut*, 34(11), 1473-1475.

White, L. E., Merrick, V. M., Bannerman, E., Russell, R. K., Basude, D., Henderson, P., Wilson, D. C., & Gillett, P. M. (2013). The rising incidence of celiac disease in Scotland. *Pediatrics*, 132(4), e924-e931.

Witczak, M., Korus, J., Ziobro, R., & Juszczak, L. (2010). The effects of maltodextrins on gluten-free dough and quality of bread. *Journal of Food Engineering*, 96(2), 258-265.

Wolters, V. M., Verbeek, W. H., Zhernakova, A., Onland-Moret, C., Schreurs, M. W., Monsuur, A. J., Verrdujn W., Wijmenga C., & Mulder, C. J. (2007). The MYO9B gene is

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari" – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

a strong risk factor for developing refractory celiac disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 5(12), 1399-1405.

Ylimaki, G., Hawrysh, Z. J., Hardin, R. T., & Thomson, A. B. R. (1991). Response surface methodology in the development of rice flour yeast breads: sensory evaluation. *Journal of Food Science*, 56(3), 751-755.

Zannini, E., Jones, J. M., Renzetti, S., & Arendt, E. K. (2012). Functional replacements for gluten. *Annual Review of Food Science and Technology*, 227-245.

Zduńczyk, Z., Flis, M., Zieliński, H., Wróblewska, M., Antoszkiewicz, Z., & Juśkiewicz, J. (2006). In vitro antioxidant activities of barley, husked oat, naked oat, triticale, and buckwheat wastes and their influence on the growth and biomarkers of antioxidant status in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4168-4175.

Zelnik, N., Pacht, A., Obeid, R., & Lerner, A. (2004). Range of neurologic disorders in patients with celiac disease. *Pediatrics*, 113(6), 1672-1676.

Ziobro, R., Korus, J., Witczak, M., & Juszcak, L. (2012). Influence of modified starches on properties of gluten-free dough and bread. Part II: Quality and staling of gluten-free bread. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 68-74.

Ziobro, R., Korus, J., Juszcak, L., & Witczak, T. (2013). Influence of inulin on physical characteristics and staling rate of gluten-free bread. *Journal of Food Engineering*, 116(1), 21-27.

## Sitografia

### Sito 1

[www.thepatientceliac.com/](http://www.thepatientceliac.com/) Accesso 20 Marzo 2017

### Sito 2

[forum.celiachia.it/index.php?option=com\\_kunena&func=view&catid=5&id=596&limit=6&limitstart=6&Itemid=168](http://forum.celiachia.it/index.php?option=com_kunena&func=view&catid=5&id=596&limit=6&limitstart=6&Itemid=168) Accesso 10 Agosto 2017

### Sito 3

[www.glutile.it/it/celiachia-diagnosi-follow-up/sb-636/](http://www.glutile.it/it/celiachia-diagnosi-follow-up/sb-636/) Accesso 11 Gennaio 2017

### Sito 4

[www.news-medical.net/health/What-is-Biopsy-\(Italian\).aspx](http://www.news-medical.net/health/What-is-Biopsy-(Italian).aspx) Accesso 25 Febbraio 2017

### Sito 5

[www.niddk.nih.gov/-/media/0295BB0CEE8141FA90A8E2206DC04E73.ashx/](http://www.niddk.nih.gov/-/media/0295BB0CEE8141FA90A8E2206DC04E73.ashx/) Accesso 20 febbraio 2016

### Sito 6

[www.geneticapediatrica.it/archives/2013/number1/print.php?id=5](http://www.geneticapediatrica.it/archives/2013/number1/print.php?id=5) Accesso 12 Marzo 2017

### Sito 7

[www.sanita24.ilsole24ore.com/art/dal-governo/2016-12-13/celiachia-2015-casi-aumentano-62percento--164743.php?uuid=ADEGYGDC](http://www.sanita24.ilsole24ore.com/art/dal-governo/2016-12-13/celiachia-2015-casi-aumentano-62percento--164743.php?uuid=ADEGYGDC) Accesso 20 Dicembre 2016

### Sito 8

[www.lanuovasardegna.it/regione/2017/05/23/news/la-celiachia-in-crescita-nell-isola-oltre-seimila-casi-1.15381699](http://www.lanuovasardegna.it/regione/2017/05/23/news/la-celiachia-in-crescita-nell-isola-oltre-seimila-casi-1.15381699) Accesso 24 Maggio 2017

### Sito 9

[www.ansa.it/sardegna/notizie/2017/05/17/celiachia-seimila-sardi-ne-soffrono\\_cbe8186d-c69f-41fa-a8a9-6c436d5b9a5e.html](http://www.ansa.it/sardegna/notizie/2017/05/17/celiachia-seimila-sardi-ne-soffrono_cbe8186d-c69f-41fa-a8a9-6c436d5b9a5e.html) Accesso 20 Maggio 2017

### Sito 10

[www.celiachia.it/DIETA/Dieta.aspx?SS=176](http://www.celiachia.it/DIETA/Dieta.aspx?SS=176) Accesso 15 Luglio 2016

---

Angela Scanu– Studio dell'influenza di ingredienti alternativi utilizzati nel passato per il miglioramento qualitativo dei prodotti gluten-free– Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie – *Curriculum "Biotecnologie microbiche agroalimentari"* – Ciclo XXX, Università degli Studi di Sassari

Sito 11

[www.osservatorioagr.eu/prodotti-senza-glutine-un-mercato-che-in-italia-cresce-del-30-lanno/](http://www.osservatorioagr.eu/prodotti-senza-glutine-un-mercato-che-in-italia-cresce-del-30-lanno/) Accesso 25 settembre 2017

Sito 12

[www.lastampa.it/2016/12/28/italia/cronache/italia-capitale-del-senza-glutine-un-affare-da-milioni-918M0vS0yUXZfDukfwfuqM/pagina.html](http://www.lastampa.it/2016/12/28/italia/cronache/italia-capitale-del-senza-glutine-un-affare-da-milioni-918M0vS0yUXZfDukfwfuqM/pagina.html) Accesso 15 Gennaio 2017

Sito 13

[www.diabete.net/lindice-glicemico-degli-alimenti/a-tavola-con-il-diabete/la-tabella-degli-alimenti/32285/](http://www.diabete.net/lindice-glicemico-degli-alimenti/a-tavola-con-il-diabete/la-tabella-degli-alimenti/32285/) Accesso 20 Settembre 2017

Sito 14

[www.smartsensorybox.com/](http://www.smartsensorybox.com/) Accesso 10 Febbraio 2017

Sito 15

[www.agraria.unirc.it/documentazione/materiale\\_didattico/598\\_2012\\_316\\_14812.pdf](http://www.agraria.unirc.it/documentazione/materiale_didattico/598_2012_316_14812.pdf)  
Accesso 10 Ottobre 2017