



A.D. MDLXII



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI  
CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE AGRARIE

DIPARTIMENTO DI AGRARIA  
PRODUTTIVITÀ DELLE PIANTE COLTIVATE  
XXXIII CICLO

***POTENZIALITÀ DI UTILIZZO DEI PRODOTTI DERIVATI DA  
RISORSE NON CONVENZIONALI NELLE FORMULAZIONI DI  
PANE SENZA GLUTINE***

Dr. Roberto Arca

Docente guida: Prof. Costantino Fadda

Docente Tutor: Dott.ssa Paola Conte

*Anno Accademico 2020/2021*

Roberto Arca, “*Potenzialità di utilizzo dei prodotti derivati da risorse non convenzionali nelle formulazioni di pane senza glutine*” - Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie  
- *Curriculum* “*Produttività delle Piante coltivate*” - Ciclo “XXXIII” Università degli Studi di Sassari  
Anno Accademico 2018 - 2021

<b>CAPITOLO 1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>7</b>
<b>1 LA CELIACHIA .....</b>	<b>1</b>
1.1 SINTOMATOLOGIA E DIAGNOSTICA DELLA CELIACHIA .....	3
1.2 STRATEGIE TERAPEUTICHE .....	5
1.3 PREVALENZA DELLA MALATTIA CELIACA (GLOBALE E NAZIONALE).....	7
<b>2 LEGISLAZIONE E MERCATO SENZA GLUTINE.....</b>	<b>8</b>
<b>3 IL PANE SENZA GLUTINE.....</b>	<b>9</b>
<b>4 PRINCIPALI INGREDIENTI NELLA PANIFICAZIONE SENZA GLUTINE .....</b>	<b>13</b>
4.1 PROPRIETÀ DELL'AMIDO.....	14
4.2 AMIDI MODIFICATI.....	15
<b>5 INGREDIENTI CONVENZIONALI .....</b>	<b>16</b>
5.1 RISORSE AMIDACEE CONVENZIONALI .....	16
5.1.1 <i>L'amido di mais</i> .....	16
5.1.2 <i>Altri amidi convenzionali</i> .....	17
5.2 FARINE CONVENZIONALI.....	18
5.2.1 <i>Farina di riso</i> .....	18
5.3 ADDITIVI E INGREDIENTI FUNZIONALI.....	19
5.3.1 <i>Idrocolloidi</i> .....	19
5.3.2 <i>Proteine</i> .....	20
<b>6 INGREDIENTI NON CONVENZIONALI.....</b>	<b>23</b>
6.1 PSEUDOCEREALI E LEGUMI .....	23
6.2 SORGO, AVENA, E TEFF .....	25
6.3 INGREDIENTI INNOVATIVI .....	26
6.3.1 <i>Il polline d'api</i> .....	27
6.3.1.1 Super food: le potenzialità del polline d'api come cibo funzionale.....	27
6.3.1.2 Tecniche di apicoltura per la raccolta e trattamento del polline. ....	30
6.3.1.3 Composizione del polline d'api e proprietà nutraceutiche .....	32
6.3.2 <i>Le ghiande</i> .....	38
6.3.2.1 Le potenzialità delle ghiande nell'alimentazione umana.....	38
6.3.2.2 Composizione della farina di ghiande (FG) e proprietà nutraceutiche. ....	40
<b>7 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>43</b>

<b>CAPITOLO 2. OBIETTIVI DELLA RICERCA.....</b>	<b>65</b>
---	-----------

<b>CAPITOLO 3. ....</b>	<b>71</b>
-------------------------	-----------

<b>EFFETTI DI ALCUNI DIFFERENTI POLLINI D'API FRESCHI COME INGREDIENTI FUNZIONALI SULLE PROPRIETÀ TECNOLOGICHE E NUTRIZIONALI DEL PANE SENZA GLUTINE.....</b>	<b>71</b>
---	-----------

<b>1 INTRODUZIONE .....</b>	<b>71</b>
-----------------------------	-----------

<b>2 MATERIALI E METODI.....</b>	<b>73</b>
----------------------------------	-----------

2.1 LE MATERIE PRIME.....	73
---------------------------	----

2.1.1 <i>Analisi palinologica.....</i>	<i>74</i>
--	-----------

2.2 PRODOTTI CHIMICI.....	75
---------------------------	----

2.3 COMPOSIZIONE CHIMICA DEI POLLINI D'API E DELLA FARINA DI RISO E AMIDO DI MAIS.....	76
--	----

2.4 ANALISI SULLE PROPRIETÀ FISICHE.....	76
--	----

2.4.1 <i>Indice di assorbimento dell'acqua.....</i>	<i>76</i>
---	-----------

2.4.2 <i>Indice di solubilità in acqua .....</i>	<i>77</i>
--	-----------

2.4.3 <i>Capacità di assorbimento dell'olio.....</i>	<i>77</i>
--	-----------

2.4.4 <i>Capacità e stabilità schiumogena (FC, FS).....</i>	<i>77</i>
---	-----------

2.5 DETERMINAZIONE DELLE FRAZIONI POLIFENOLICHE E DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DEI POLLINI D'API. 78	
--	--

2.6 PRODUZIONE DEL PANE.....	80
------------------------------	----

2.7 ANALISI SUGLI IMPASTI .....	81
---------------------------------	----

2.7.1 <i>Proprietà reologiche degli impasti .....</i>	<i>81</i>
---	-----------

2.7.2 <i>Proprietà viscosimetriche degli impasti .....</i>	<i>82</i>
--	-----------

2.7.3 <i>Attività <math>\alpha</math>-amilasica .....</i>	<i>83</i>
---	-----------

2.7.4 <i>Proprietà di lievitazione .....</i>	<i>83</i>
--	-----------

2.8 ANALISI SUL PANE .....	84
----------------------------	----

2.8.1 <i>Volume specifico.....</i>	<i>84</i>
------------------------------------	-----------

2.8.2 <i>Determinazione del colore.....</i>	<i>84</i>
---	-----------

2.8.3 <i>Analisi del profilo di texture .....</i>	<i>84</i>
---	-----------

2.8.4 <i>Analisi della alveolatura della mollica.....</i>	<i>85</i>
---	-----------

2.8.5 <i>Composizione chimica del pane .....</i>	<i>85</i>
--	-----------

2.8.6 <i>Determinazione delle frazioni polifenoliche e dell'attività antiossidante del pane .....</i>	<i>86</i>
---	-----------

2.9 ANALISI STATISTICA .....	86
------------------------------	----

<b>3 RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>88</b>
--	-----------

3.1	MATERIE PRIME .....	88
3.1.1	<i>Composizione chimica e caratteristiche fisiche della farina di mais e amido di riso</i> .....	88
3.1.2	<i>Composizione chimica dei pollini d'api</i> .....	88
3.1.3	<i>Frazioni polifenoliche e attività antiossidante dei pollini d'api</i> .....	90
3.1.4	<i>Analisi sulle proprietà fisiche dei pollini d'api</i> .....	91
3.2	ANALISI SUGLI IMPASTI.....	93
3.2.1	<i>Proprietà reologiche</i> .....	93
3.2.2	<i>Attività <math>\alpha</math>-amilasica</i> .....	94
3.2.3	<i>Analisi viscosimetriche</i> .....	94
3.2.4	<i>Proprietà di lievitazione degli impasti</i> .....	95
3.3	ANALISI SUL PANE .....	96
3.3.1	<i>Volume specifico e colore</i> .....	96
3.3.2	<i>Analisi delle caratteristiche della mollica</i> .....	97
3.3.3	<i>Proprietà di Texture</i> .....	98
3.3.4	<i>Composizione chimica dei pani senza glutine</i> .....	98
3.3.5	<i>Determinazione delle frazioni polifenoliche e dell'attività antiossidante del pane</i> .....	99
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONI</b> .....	<b>100</b>
<b>5</b>	<b>RIFERIMENTI</b> .....	<b>103</b>
<b>6</b>	<b>TABELLE</b> .....	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>FIGURE</b> .....	<b>116</b>

<b>CAPITOLO 4 .....</b>	<b>119</b>
<b>FARINA DI GHIANDE: STUDIO DELL'EFFETTO DELLA SUA COMPONENTE AMIDACEA SULLE PROPRIETÀ FISICO-CHIMICHE E NUTRIZIONALI DI UN PANE SENZA GLUTINE .....</b>	<b>119</b>
<b>1 INTRODUZIONE .....</b>	<b>119</b>
<b>2 MATERIALI E METODI.....</b>	<b>122</b>
2.1 MATERIE PRIME .....	122
2.2 PRODOTTI CHIMICI.....	122
2.3 <i>PROCESSO DI ESTRAZIONE DELL'AMIDO DALLA FARINA DI GHIANDE.....</i>	123
2.4 <i>COMPOSIZIONE CHIMICA E ANALISI DELLE PROPRIETÀ FISICHE.....</i>	123
2.5 <i>DETERMINAZIONE DELLE FRAZIONI POLIFENOLICHE E DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DELLE FARINE/AMIDO .....</i>	124
2.6 PROCESSO DI PRODUZIONE DEGLI IMPASTI E DI PANIFICAZIONE .....	126
2.7 MISURE REOLOGICHE DEGLI IMPASTI.....	127
2.7.1 <i>Proprietà viscosimetriche.....</i>	127
2.7.2 <i>Attività <math>\alpha</math>-amilasica e proprietà fisiche .....</i>	128
2.7.3 <i>Proprietà di lievitazione .....</i>	129
2.8 ANALISI SUL PANE .....	129
2.8.1 <i>Volume specifico.....</i>	129
2.8.2 <i>Determinazioni del colore .....</i>	129
2.8.3 <i>Analisi del profilo di Texture.....</i>	130
2.8.4 <i>Analisi della struttura alveolare della mollica .....</i>	130
2.8.5 <i>Composizione chimica del pane .....</i>	130
2.8.6 <i>Determinazione delle frazioni polifenoliche e dell'attività antiossidante del pane .....</i>	131
2.9 ANALISI STATISTICA .....	132
<b>3 RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>132</b>
3.1 MATERIE PRIME .....	132
3.1.1 <i>Composizione chimica e analisi sulle proprietà fisiche.....</i>	132
3.1.2 <i>Frazioni polifenoliche e attività antiossidante .....</i>	133
3.2 MISURE SUGLI IMPASTI.....	134
3.2.1 <i>Proprietà viscosimetriche, attività <math>\alpha</math>-amilasica e analisi fisiche degli impasti .....</i>	134
3.2.2 <i>Attività <math>\alpha</math>-amilasica .....</i>	135
3.2.3 <i>Proprietà di lievitazione .....</i>	136
3.3 ANALISI SUL PANE .....	137
3.3.1 <i>Volume specifico e colore.....</i>	137
3.3.2 <i>Analisi del profilo di Texture .....</i>	138

3.3.3	<i>Analisi sulle caratteristiche della mollica</i> .....	138
3.3.4	<i>Composizione chimica dei pani senza glutine</i> .....	139
3.3.5	<i>Componente fenolica e attività antiossidante dei pani GF</i> .....	140
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONI</b> .....	<b>140</b>
<b>5</b>	<b>RIFERIMENTI</b> .....	<b>142</b>
<b>6</b>	<b>TABELLE</b> .....	<b>147</b>
<b>7</b>	<b>FIGURE</b> .....	<b>153</b>
	<b>CAPITOLO 4 CONCLUSIONI GENERALI E PROSPETTIVE FUTURE</b> .....	<b>154</b>

## **CAPITOLO 1. INTRODUZIONE**





## 1 LA CELIACHIA

La celiachia è una enteropatia auto-infiammatoria permanente, con tratti di auto-immunità (ISS, 2017), scatenata dall'ingestione di glutine in soggetti geneticamente predisposti. Le lesioni della mucosa intestinale e l'iperplasia delle cripte che ne derivano, riducono la capacità di assorbimento dei nutrienti (tra i quali ferro, acido folico, vitamine e calcio) da parte dei villi intestinali (Trier, 1991; Kagnoff, 2005; Hall et al., 2009). La storia diagnostica della malattia celiaca (CD) ha radici che risalgono ai primi secoli dopo Cristo, quando alcuni medici dell'epoca identificarono la malattia e ne descrissero i sintomi non conoscendone la causa. “*Koliakos*” (*sofferenti nelle viscere*) fu il termine greco utilizzato nel 250 d.C. per descrivere la patologia allora sconosciuta, lasciata dal medico Areteo di Cappadocia. Tale espressione è tutt'oggi utilizzata per diagnosticare la malattia celiaca attraverso i sintomi di sofferenza intestinale e malassorbimento. I numerosi medici che si susseguirono negli anni, descrivendo i sintomi della celiaca, riuscirono a trovare un legame con la dieta effettuata dai pazienti, attribuendone le cause scatenanti ad un alimento, pur senza riuscire a identificarlo. Fu nel 1941 che il pediatra Olandese Willem Karel Dicke riuscì a identificare la farina di frumento come causa scatenante della malattia celiaca. Egli, infatti, osservò una riduzione significativa dei sintomi della patologia nei bambini che venivano sottoposti ad una dieta forzata – anche a causa della guerra – priva di farina di frumento (Stoop, 1993). Sintomi che, invece, notò ripresentarsi al momento della reintroduzione di pane e pasta. Attualmente sappiamo invece che è l'ingestione del **glutine**. Il glutine è una “struttura” proteica, con caratteristiche viscoelastiche uniche, che si forma a seguito dell'idratazione della farina di frumento durante la fase di impastamento. Le proteine del glutine sono insolubili in acqua e vengono distinte tramite la classificazione di Shewery et al. (1986) - basata sul grado di polimerizzazione e sul livello di amminoacidi solforati - in due grandi categorie: le gliadine e le glutenine. Le gliadine, classificate a loro

volta in 4 categorie ( $\alpha$ -gliadine,  $\beta$ -gliadine,  $\omega$ -gliadine,  $\gamma$ -gliadine), sono prolamine monomeriche che costituiscono il 30-40% delle proteine totali, hanno un basso peso molecolare e sono associate fra loro per mezzo di legami idrogeno e di interazioni idrofobiche. Le glutenine sono proteine polimeriche le cui catene polipeptidiche sono unite da legami intermolecolari. Sono un gruppo eterogeneo con subunità a basso peso molecolare (ricche in zolfo) e ad alto peso molecolare (povere in zolfo). Le gliadine e le glutenine che costituiscono il glutine sono capaci durante la fase di impastamento e di idratazione d'instaurare legami covalenti con ponti disolfuro, interazioni idrofobiche e legami non covalenti, che conferiscono al glutine le caratteristiche viscoelastiche capaci di influenzare la qualità reologica degli impasti di frumento (Cabras & Martelli, 2004). La celiachia è, in realtà, una patologia complessa che si manifesta essenzialmente a seguito dell'interazione tra due fattori causali: un fattore genetico e un fattore ambientale. Attualmente, l'unico fattore genetico noto nell'eziopatogenesi della celiachia è rappresentato dalla presenza di alcuni antigeni leucocitari umani HLA-DQ2 e HLA-DQ8 (Kagnoff, 2005). La reazione autoimmune è innescata dalla gliadina che contiene sequenze peptidiche (chiamate epitopi) altamente resistenti alla digestione proteolitica gastrica, pancreatico e intestinale e che sfuggono, quindi, alla degradazione nell'intestino umano. Questa difficile digestione è dovuta all'alto contenuto nella gliadina di aminoacidi quali la prolina e la glutammina, che molte proteasi non sono in grado di scindere (Hausch et al., 2002).

L'incompleta digestione permette agli epitopi (principalmente una varietà di sequenze delle gliadine  $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\omega$ ), di attraversare l'epitelio dell'intestino tenue, penetrando la lamina propria dove la transglutaminasi tissutale (l'enzima identificato come antigene) deammina la glutammina in acido glutammico, lasciando epitopi altamente reattivi per le molecole

HLA-DQ2 e HLA-DQ8. Il complesso risulta in questo modo riconoscibile dai linfociti T CD4+, i quali avviano la risposta immunologica, portando alle lesioni tipiche della mucosa dell'intestino tenue (Kagnoff, 2005; Briani et al., 2008). Le ricerche condotte hanno constatato che diverse centinaia di peptidi del glutine innescano la risposta immunologica delle cellule T e, che, per ogni varietà di frumento esiste una precisa gerarchia. La gliadina  $\alpha$  presenta gli epitopi maggiormente reattivi alle cellule T, successivamente sono state poi confermate anche le reattività degli epitopi della secalina e dell'ordeina, le prolamine contenute rispettivamente nella segale e nell'orzo (Arentz-Hansen et al., 2002). Per quanto attiene al fattore ambientale, invece, accanto alla ingestione del glutine che attiva la risposta immunologica, ritroviamo anche altre componenti ambientali, quali infezioni virali, prematura cessazione dell'allattamento al seno ed il genere (Scanu, 2016). Inoltre, vengono considerati fattori scatenanti gli interventi di chirurgia gastrica e l'interruzione del fumo di sigaretta (Farrell & Kelly, 2002).

### 1.1 Sintomatologia e diagnostica della celiachia

I sintomi associati alla malattia celiaca sono principalmente a carico dell'apparato intestinale, con il manifestarsi di diarrea cronica, steatorrea, vomito e distensione addominale e malassorbimento dei nutrienti con conseguenti carenze di vitamine e minerali, mancata crescita e perdita di peso. Il protrarsi della malattia celiaca negli individui affetti è correlato ad un maggiore rischio di anemia, edema, osteoporosi, infertilità, linfoma a cellule T, e altri tumori maligni. Inoltre, sono numerose le malattie associate, come il diabete mellito insulino-dipendente con prevalenza del 8%, malattie della tiroide (6-8%) e deficit di immunoglobulina A (IgA) (2-5%) (Wieser & Koehler, 2008). I sintomi gastrointestinali sono riconducibili alla cosiddetta forma "classica" o "tipica" della malattia che generalmente si manifesta in età pediatrica (ma anche in età adulta o geriatrica) subito dopo lo svezzamento e, dunque, in seguito all'introduzione del glutine nella dieta (Calabrò

et al., 2008; Volta & Silano, 2014). Maggiormente diffusa è però la cosiddetta forma “atipica” della malattia che presenta una sintomatologia extra-gastrointestinale caratterizzata dal manifestarsi di anemie, carenze vitaminiche, osteoporosi, ipoplasia dello smalto dentale, dermatite erpetiforme, dolori articolari, crescita ridotta, perdita di peso, stanchezza, pubertà ritardata e riduzione della fertilità (Fasano & Catassi, 2001). Si è assistito, per i pazienti celiaci in età pediatrica, a diversi disturbi neurologici e psichiatrici, come epilessia, atassia, ipotonia, ritardo mentale, disturbi dell’apprendimento, deficit di attenzione ed emicrania (Zelnik et al., 2004). La diagnosi della celiachia talvolta è difficoltosa e spesso può essere condotta erroneamente in un importante numero di casi (Biagi et al., 2009). Oltre alle due forme già esposte, sono state identificate altre tre forme di celiachia: la silente, la potenziale e la refrattaria. La forma “silente” della malattia celiaca è diagnosticata quando sono presenti i tipici sintomi sulla mucosa intestinale derivati dalla risposta immunitaria al glutine in pazienti apparentemente sani. Sono stati diagnosticati un gran numero di casi “silenti” in gruppi a rischio, (parenti di primo grado e pazienti già affetti da diabete di 1 tipo) e attraverso degli screening di massa. Molti di questi soggetti sono affetti dalla malattia in una forma lieve, ma comunque associata ad una diminuzione del benessere psicofisico (Catassi & Fasano, 2008). La forma “potenziale” viene riconosciuta quando i soggetti mostrano positività ai test sierologici (presenza elevata di anticorpi EMA e IgA-TG2), ciò significa che essi presentano la predisposizione genetica per la malattia, ma essa non è stata riscontrata tramite la biopsia. In questi casi è elevato il rischio di sviluppare i classici sintomi in età avanzata (Catassi & Fasano, 2008). La celiachia “refrattaria” (presente nel 1% dei casi di celiachia diagnosticati) è invece una condizione che insorge a causa di una infezione attiva da EBV (Epstein-Barr Virus), ed è caratterizzata dal mancato miglioramento istologico e clinico dopo 12 mesi di dieta senza glutine. Questa condizione particolare della celiachia è di difficile diagnosi, spesso non

diagnosticabile tramite i test sierologici, la sua valutazione è basata spesso sull'esclusione di altre condizioni patologiche simili (Perfetti et al., 2016).

Le linee guida per il riconoscimento della malattia celiaca sono state recentemente aggiornate dall'European Society for Pediatric Gastroenterology (ESPGHAN) (Husby et al., 2012) e, alla luce dei nuovi metodi di diagnosi degli ultimi anni, in alcuni casi, permettono l'omissione della biopsia per la conferma della malattia in età pediatrica. I metodi di diagnosi sono basati su test di screening sierologici, istologici e genetici. La diagnosi sierologica si basa sulla presenza di specifici anticorpi (anticorpi antiendomisio Ema, anticorpi antitransglutaminasi IgA-TG2 e anticorpi antigliadina deamminata DGP), mentre il test genetico si basa sulla virtù predittiva negativa per almeno una delle varianti degli antigeni leucocitari umani HLA-DQ2 e HLA-DQ8. La biopsia andrebbe eseguita con la possibilità di effettuare campionamenti multipli del tessuto duodenale, a causa della possibile distribuzione non omogenea delle alterazioni mucosali (lesioni patchy) che, pertanto, potrebbero non essere individuate in caso di campionamento singolo (Scanu, 2016; Ministero della Salute, 2015). Negli ultimi anni i test sierologici, dotati di elevata sensibilità, hanno permesso di confermare l'alta presenza della malattia, arrivando a valori vicini e anche superiori a un individuo su cento (WGO, 2018).

## 1.2 Strategie terapeutiche

L'unica terapia confermata per i celiaci è una rigorosa e stretta osservanza di una dieta priva di glutine che perduri per tutta la vita, al fine di curare la malattia e tutte le potenziali complicazioni annesse (Haines et al., 2008). Questo trattamento è indubbiamente difficile da applicare, influisce sulla qualità della vita, non è disponibile in modo avanzato in tutto il mondo, è costoso e presenta numerose problematiche legate alla qualità dei prodotti finiti che, spesso, risultano meno appetibili e poco conformi nelle caratteristiche tecnologiche, nutrizionali e sensoriali rispetto alle controparti contenenti glutine (Lerner., 2010). Inoltre,

rispettare una dieta senza glutine risulta difficile, a causa delle possibili contaminazioni durante il processo produttivo e la preparazione degli alimenti, ma anche per la presenza di molti prodotti che presentano il glutine come additivo/agente stabilizzante (Catassi & Fasano, 2008). Valutando queste osservazioni e considerando i progressi medici ottenuti nella conoscenza della patogenesi della malattia celiaca si stanno studiando numerose strategie terapeutiche alternative alla dieta senza glutine. Sono in corso numerose ricerche basate su varie metodologie: la manipolazione genetica delle varietà di grano per rendere meno tossico il glutine; la degradazione enzimatica; l'uso di inibitori di permeabilità ed inibitori della transglutaminasi tissutale; lo sviluppo di vaccini preventivi e l'induzione alla tolleranza al glutine (Catassi & Fasano, 2008; Lerner., 2010). La manipolazione genetica, se pur apparentemente funzionale (detossifica il glutine), porta alla perdita delle caratteristiche viscoelastiche essenziali per i prodotti da forno; inoltre, gli OGM spesso non vengono accolti con favore dai consumatori oppure il loro utilizzo non è autorizzato dalla legge. Nella prospettiva di un uso futuro di tali trattamenti, la sicurezza, l'efficacia, i costi e l'accessibilità saranno parametri di primaria importanza, rimane comunque dubbia la volontà dei pazienti di sottoporsi ad essi a causa di potenziali effetti collaterali, che sono invece assenti in una dieta senza glutine, che risulta quindi sicura ed efficace (Stepniak & Koning, 2006; Lerner, 2010). Inoltre, recentemente le caratteristiche qualitative dei prodotti senza glutine sono state notevolmente migliorate da un punto di vista funzionale, sensoriale e nutrizionale grazie allo sforzo della ricerca, sia sul fronte del miglioramento della formulazione, attraverso l'utilizzo di numerosi ingredienti funzionali che sul fronte del miglioramneto di processo, attraverso tecnologie innovative, quali, ad esempio, alte pressioni e ultrasuoni (Naqash et al., 2017).

### 1.3 Prevalenza della malattia celiaca (globale e nazionale)

In una recente pubblicazione, Singh et al. (2018) hanno riportato una stima complessiva globale della prevalenza della malattia celiaca basata sulla meta-analisi di 96 articoli. La sieroprevalenza della malattia celiaca relativa ad un campione di 275.818 individui è risultata del 1,4% (con intervallo di confidenza (CI) al 95% di 1,1%-1,7%), mentre la prevalenza basata sul test istologico, relativa a 138.792 individui, ha evidenziato una proporzione di 0,7% (95% CI, 0,5%-0,9%) (Singh, et al., 2018).

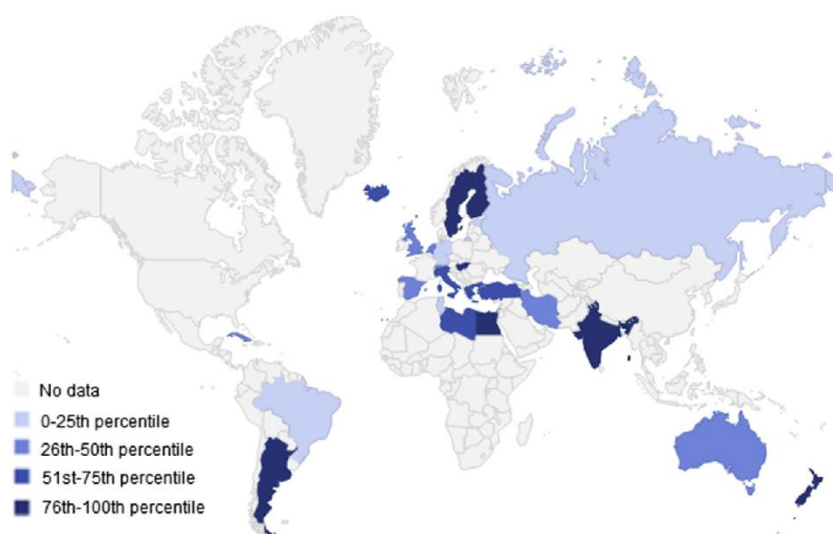


Figura 1. *Dati di prevalenza della celiachia distribuiti per paesi (Singh et al., 2018)*

I valori di prevalenza stimati per il Sud America corrispondevano allo 0,4%, allo 0,5% per Africa e Nord America, allo 0,6% per l'Asia e allo 0,8% per Europa e Oceania. Inoltre, è stata riscontrata una prevalenza maggiore negli individui di sesso femminile rispetto a quelli di sesso maschile (0,6% vs 0,4%;  $p < .001$ ) e nei bambini rispetto agli adulti (0,9% vs 0,5%;  $p < .001$ ). Pur limitato dalla mancanza di dati per molte nazioni, e con alcuni studi con dati incompleti (solamente il 50% degli studi riporta sia test sierologici che istologici), l'articolo di Singh et al. (2018), rispecchia alcune delle precedenti stime, con la probabile sottostima della prevalenza celiaca globale. Infatti, per concettualizzare efficacemente

l'epidemiologia della malattia celiaca, è ormai riconosciuto un modello Icerbeg nel quale i casi diagnosticati rappresentano solamente la punta visibile dell'Iceberg stesso, mentre, la restante parte è rappresentata dai casi non diagnosticati a causa della difficoltà nel manifestarsi delle forme atipiche e silenti (Catassi & Fasano, 2008).

In Italia, secondo quanto riportato nella Relazione annuale del Parlamento sulla celiachia, nel 2018 erano presenti su tutto il territorio nazionale 214.239 casi confermati, con una incidenza del 0,35% sulla totalità dei residenti. Le regioni maggiormente soggette sono risultate la Toscana e la Provincia Autonoma di Trento con lo 0,45%, seguite, con lo 0,44%, da Sardegna e Valle D'Aosta (ISTAT, 2018). Dai dati è emersa inoltre, in maniera sempre maggiormente manifesta, la prevalenza della malattia nel genere femminile (2/3).

## **2 LEGISLAZIONE E MERCATO SENZA GLUTINE**

Negli ultimi 30 anni il continuo incremento del numero dei celiaci, ma anche dei soggetti che pur non essendo affetti da malattia celiaca sono allergici oppure sensibili al frumento, ha determinato la necessità di avere sul mercato prodotti sicuri. Era pertanto indispensabile una revisione della legislazione e delle etichettature applicate che certificasse la presenza o meno del glutine negli alimenti. Nel 1999 la Commissione per il Codex Alimentarius (istituita dalla FAO/OMS) ha adottato le linee guida elaborate dall'Association Of European Coeliac Societies (AOECS), con la fondamentale proposta che gli alimenti o ingredienti che possano causare intolleranza o allergia (fra i quali i cereali), debbano essere sempre dichiarati. Oggigiorno i regolamenti in vigore nell'Unione Europea (609/2013 e 828/2014) specificano che tutti gli alimenti commercializzati in UE con la dicitura "senza glutine" o "gluten-free" debbano rispettare e garantire il limite massimo di glutine di 20 ppm. Lo stesso limite è stato adottato anche negli USA. Il mercato senza glutine ha raggiunto una dimensione di 4,5 miliardi di dollari nel 2018 e IMARC Group, società leader



nelle ricerche di mercato, valutando l'aspettativa del settore, prospetta che raggiunga un valore di 6,7 miliardi di dollari entro il 2024, registrando un tasso annuo di crescita composto (CAGR) del 6,7% nel periodo 2019-2024.

### 3 IL PANE SENZA GLUTINE

La Legge italiana 580/67, art.14, definisce il pane come “il prodotto ottenuto dalla cottura totale o parziale di una pasta convenientemente lievitata, preparata con sfarinati di grano, acqua e lievito, con o senza aggiunta di sale comune (cloruro di sodio)”. Nel Mediterraneo, il pane ha sempre svolto un ruolo prioritario all'interno delle relazioni sociali e nelle celebrazioni religiose, ed il suo uso implica un complesso intreccio di fattori geografici, economici, sociali e culturali (Palmeri, 2007). Tradizionalmente, la produzione del pane è un processo discontinuo dove le fasi di impastamento, lievitazione e cottura sono condotte con impianti separati. Durante la fase di impastamento di un processo di panificazione convenzionale, in seguito all'idratazione della farina e all'applicazione di energia, avvengono importanti modificazioni fisico-chimiche a carico dei vari costituenti del prodotto – quali la formazione del glutine, il rigonfiamento dei granuli di amido, la formazione di soluzioni cristalline e l'instaurarsi di interazioni tra lipidi e altri ingredienti – che concorrono tutti alla formazione di un impasto liscio, omogeneo, tenace e viscoelastico (Cabras & Martelli, 2004). Al contrario, nella panificazione senza glutine, le scarse proprietà funzionali delle proteine che caratterizzano gli sfarinati senza glutine, portano alla formazione di un impasto che si presenta, generalmente, poco coeso ed elastico, molto adesivo, non strutturato e di difficile lavorabilità (Capriles & Arêas, 2014; Houben et al., 2012). Di fatto, gli impasti senza glutine, che solitamente vengono preparati utilizzando quantità d'acqua superiori rispetto a quelle impiegate negli impasti convenzionali, assomigliano ad un sistema semiliquido che varia notevolmente in termini

di consistenza, viscoelasticità e struttura (Gallagher, Kunkel, Gormley, & Arendt, 2003; Hager et al., 2012). Nell'industria del pane, l'ottenimento di un impasto con appropriate caratteristiche e, quindi, di un prodotto finito di qualità, è fortemente influenzata dalle caratteristiche qualitative degli sfarinati utilizzati che ne determineranno il comportamento nel corso della lavorazione. Infatti, proprio in virtù del fatto che le varie farine possono avere una diversa attitudine panificatoria, sono stati sviluppati, nel corso degli anni, appositi test reologici – normalmente eseguiti mediante l'ausilio di strumenti quali il farinografo di Brabender, l'alveografo di Chopin e l'estensografo Brabender – per il controllo della qualità tecnologica degli sfarinati. Tali test consentono di ottenere una classificazione delle farine di grano tenero e delle semole di grano duro, sulla base delle loro proprietà reologiche e, quindi, di selezionarle in funzione delle caratteristiche che i differenti prodotti finiti dovranno possedere. I parametri reologici dell'impasto, quali consistenza, assorbimento di acqua, stabilità, tenacità ed estensibilità sono legati principalmente alla quantità e qualità di glutine (Cabras & Martelli, 2004). La classificazione degli sfarinati senza glutine risulta problematica, per il fatto che essi non possono essere sottoposti ai test sopracitati. La produzione di impasti con scarse proprietà reologiche andrà ad influenzare negativamente tutte le fasi del processo e, di conseguenza, la qualità globale dei prodotti finiti. Durante la fase di lievitazione di un impasto senza glutine, infatti, l'assenza di una matrice continua viscoelastica capace di trattenere l'anidride carbonica prodotta – ma anche gli acidi organici e i composti volatili originatisi in seguito alla trasformazione degli zuccheri riducenti da parte dei lieviti – porterà alla produzione di prodotti finiti con molti difetti qualitativi, quali un basso volume specifico, un colore della crosta e della mollica troppo chiaro, la mancanza di una struttura alveolare fine ed omogenea, una consistenza secca e friabile, un gusto e un aroma meno ricchi e una breve shelf-life (Gallagher et al., 2003; Houben et al., 2012; Capriles & Arêas, 2014). Negli ultimi anni, per ovviare a tali problemi e cercare di

migliorare le caratteristiche reologiche degli impasti senza glutine, sono state studiate numerose strategie tecnologiche, quali l'uso di differenti tecniche di macinazione sulle farine, la pre-germinazione dei semi, l'uso di impasti acidi, di amidi pregelatinizzati e l'applicazione di trattamenti termici e processi ad alte pressioni (Capriles & Arêas, 2014; El Khoury et al., 2018). Dopo la fase di impastamento e di lievitazione, il processo di panificazione continua con le fasi di cottura e raffreddamento che producono vari cambiamenti fisicochimici. Inizialmente avviene l'evaporazione dell'acqua: è importante in questa fase il contenimento esercitato dalla struttura del pane, con una iniziale espansione del volume della pagnotta per dilatazione dei gas contenuti negli alveoli. L'inattivazione dei lieviti e degli enzimi inizia a 60 °C, successivamente avviene la gelatinizzazione dell'amido (60-80 °C) e in seguito la coagulazione delle proteine insieme alla fusione dei lipidi che contribuiscono alla stabilità degli alveoli (entrambe fra i 70-80 °C). La formazione della crosta inizia a circa 90 °C, con colorazione più o meno marcata, dipendente dalle reazioni di Maillard e di caramellizzazione, che avvengono oltre i 110 °C. Una volta ultimata la cottura, inizia la fase di raffreddamento durante la quale avviene la cristallizzazione dell'amido (Cabras & Martelli, 2004; Scanu, 2016). Le fasi di cottura e di raffreddamento nei pani senza glutine (GFBs) sono fortemente influenzate dalle caratteristiche delle materie prime e dalla mobilità dell'acqua. La capacità di assorbimento di acqua da parte della crosta nei GFBs potrebbe determinare la perdita della croccantezza del prodotto, se conservato in una confezione non adatta (Roman, Gomez & Martinez, 2021).

Oltre ai difetti strutturali, i GFBs presentano anche una bassa qualità nutrizionale. I GFBs, rispetto alla controparte contenente glutine, sono caratterizzati da una ridotta quantità di proteine: la media del contenuto di proteine dei GFBs è di 3,91 g/100g rispetto agli 8,85 g/100g del pane di frumento; al contrario, nei GFBs è solitamente maggiore il contenuto di

lipidi (6,27 g/100g rispetto al 3,50g/ 100g dei pani di frumento) (Roman et al., 2019; Cornicelli, Saba, Machello, Silano, & Neuhold, 2018; Vici, Belli, Biondi, & Polzonetti, 2016). Il contenuto modesto di proteine nei GFBs è principalmente dovuto all'uso di amido e farine di partenza molto raffinate, che contengono anche quantità inadeguate di vitamina B, ferro e acido folico (Torbica et al., 2010; Pellegrini & Agostoni, 2015). Nei GFBs sono state osservate anche carenze di fibra alimentare, calcio, niacina, zinco e selenio (Wild, Robins, Burley, & Howdle, 2010). L'elevato contenuto di lipidi, invece, è dovuto alla loro usuale incorporazione nelle formulazioni: sono sfruttati nei GFBs per la loro capacità nel ridurre la retrogradazione dell'amido (la tendenza alla ricristallizzazione delle molecole di amilosio e di amilopectina), incrementando la shelf-life del prodotto, e per stabilizzare gli impasti in fase fermentativa (Houben et al., 2012; Smith & Johansson, 2005).

Inoltre, i GFBs essendo alimenti a base di amido, sono spesso caratterizzati da un elevato indice glicemico (GI). Questo aspetto necessita attenzione poiché la malattia celiaca è altamente correlata al diabete di tipo 1 (Atkinson et al., 2008). L'IG è una proprietà dei carboidrati che indica la capacità di innalzare la concentrazione di glucosio del sangue da parte dei carboidrati disponibili di un determinato alimento. L'IG si calcola come rapporto percentuale tra l'area incrementale sottesa alla curva di risposta glicemica indotta dall'assunzione un alimento da testare, contenente 50 g di carboidrati disponibili, e l'area incrementale sottesa alla curva di risposta glicemica indotta dall'assunzione di un alimento di riferimento, che può essere una soluzione di glucosio o pane bianco, contenente la stessa qualità di carboidrati disponibili (Jenkins et al., 1981). Usando il glucosio come riferimento, è possibile classificare gli alimenti in: a) alimenti a basso IG ( $\leq 55$ ), b) alimenti a medio IG (56-69) e c) alimenti ad alto IG ( $\geq 70$ ) (Atkinson et al., 2008). Matos & Rosell (2011) hanno analizzato 11 GFBs presenti nel mercato spagnolo e hanno riscontrato in essi un alto indice glicemico (83,3-96,1), una rapida digeribilità dell'amido e una variabilità

elevata nella composizione chimica. Lo stesso risultato è stato ottenuto in una ricerca condotta sul mercato brasiliano da Romão et al. (2020), i quali hanno constatato un alto indice glicemico per i GFBs standard, ossia formulati con amido di mais, patate, tapioca, o riso, mentre sono stati riscontrati valori medi per i pani che presentavano aggiunte di quinoa, chia, semi di girasole e *psyllium*. In questo modo, gli autori hanno dimostrato che la riduzione dell'indice glicemico è correlata all'aumento delle percentuali di proteine, grassi e fibre.

#### **4 PRINCIPALI INGREDIENTI NELLA PANIFICAZIONE SENZA GLUTINE**

Gli ingredienti maggiormente utilizzati nella produzione dei GFBs sono derivati dal mais, dalla patata, dalla tapioca e dal riso e, normalmente, sono impiegati sotto forma di amidi e/o farine, da soli o in combinazione tra loro e/o altri ingredienti (Capriles & Arêas, 2014). Sulla base di quanto riportato in letteratura, si può affermare che, attualmente, l'ingrediente più utilizzato nella produzione dei pani senza glutine presenti sul mercato – sia come ingrediente primario che come ingrediente secondario – sia l'amido di mais (62%), seguito dalla farina di riso (30%), dall'amido/farina di tapioca (27 %) e dall'amido di patate (16%) (Roman, Belorio, & Gomez, 2019). L'uso dell' amido nei GFBs è dovuto alla capacità di incrementare il volume del pane, migliorando la struttura della mollica da compatta a soffice e coesa (Gomez & Sciarini, 2015), anche se queste caratteristiche variano a seconda dell'origine botanica dell'amido, della dimensione dei granuli, del rapporto amiloso/amilopectina e delle interazioni con gli altri elementi (Witczak et al., 2016; Zhang et al., 2017). In un prodotto a base di sfarinati senza glutine (spesso farina di riso e amido di mais) si includono amidi di diversa origine, proteine del latte, altre proteine prive di glutine, idrocolloidi (spesso in combinazione), ottenendo formulazioni complesse che

possono dare risultati differenti per quanto riguarda la struttura, la sensazione in bocca, l'accettabilità e la shelf-life dei prodotti finiti (Collar et al., 2015). Gli ingredienti minori presenti nei GFBs sono spesso identificati come additivi o ingredienti funzionali, sfruttati per le loro capacità emulsionanti, acidificanti, conservative, lievitanti, aromatiche e nutrizionali.

#### 4.1 Proprietà dell'amido

L'amido è il polisaccaride di riserva maggiormente presente nelle piante sottoforma di grossi granuli ed è costituito da due tipi di molecole: l' $\alpha$ -amilosio (circa il 20%, varia con specie e varietà) e l'amilopectina. L' $\alpha$ -amilosio è composto da lunghe catene di unità di D-glucosio unite da un legame glicosidico  $\alpha$ -1,4; tali catene hanno struttura lineare priva di ramificazioni e sono in grado di formare in acqua micelle idratate con conformazione a spirale. L'amilopectina (il restante 80 %), invece, si presenta sotto forma di catene polisaccaridiche ramificate originate da legami glicosidici in posizione  $\alpha$ -1,6, con pesi molecolari nettamente superiori e capacità di creare soluzioni colloidali in acqua (Cabras & Martelli, 2004). La struttura dell'amido nativo si presenta principalmente sotto forma di granuli semi-cristallini, generalmente composti da un nucleo amorfo circondato da anelli d'accrescimento cristallini che si alternano ad anelli d'accrescimento amorfi (Wang, Li, Copeland, Niu, & Wang, 2015). La qualità e le proprietà nutrizionali degli alimenti a base di amido sono in gran parte determinate dai cambiamenti che l'amido subisce durante la lavorazione, la cottura e la successiva conservazione. Questi cambiamenti, che iniziano con l'assorbimento dell'acqua, determinano le proprietà funzionali dell'amido e includono: il rigonfiamento dei granuli, la rottura degli stessi con la capacità di creare gel (formazione della salda d'amido), e il successivo fenomeno di riorganizzazione delle molecole durante le fasi di raffreddamento (retrogradazione) (Cabras & Martelli 2004; Wang, Li, Copeland, Niu, & Wang, 2015; Witczak, Ziobro, Juszczak, & Korus, 2016). Le caratteristiche

dell'amido hanno effetti sull'umidità, la viscosità, la struttura, la consistenza, la sensazione in bocca e la durata di conservazione dei prodotti finiti (Wang & Copeland, 2013). Nei GFBs l'assenza di glutine rende fondamentale il ruolo dell'amido nel fornire struttura e consistenza, per cui le proprietà dei prodotti intermedi e finiti sono strettamente dipendenti dal tipo di amido utilizzato in termini di origine, specie, dimensione dei granuli, rapporto amiloso/amilopectina, trattamenti subiti dall'amido (utilizzo di amidi modificati) e combinazione di diverse fonti di amido con altri ingredienti (Witczak et al., 2016).

#### 4.2 Amidi modificati

L'uso di amidi nativi come ingredienti primari nelle formulazioni dei GFBs, tuttavia, non sempre produce effetti positivi nel processo di panificazione. L'amido nativo, infatti, pur presentando numerosi vantaggi, possiede una limitata resistenza alle condizioni fisiche applicate durante i processi di panificazione, una bassa stabilità termica, una bassa viscosità e un'alta tendenza alla retrogradazione con conseguente possibile formazione di impasti con caratteristiche reologiche non idonee (Conte, Fadda, Drabińska, & Krupa-Kozak, 2019). Pertanto, negli ultimi anni, l'industria alimentare, per cercare di limitare i su elencati effetti ha fatto ampiamente ricorso agli amidi cosiddetti modificati (BeMiller & Huber, 2015). Essi sono derivati dagli amidi nativi attraverso processi chimici, meccanici o termici e vengono adoperati anche nei GFBs per migliorare la struttura del pane (El Khoury et al., 2018). Gli amidi modificati più usati per i GFBs sono il fosfato di amido e l'adipato di amido, gli esteri di amido come il fosfato di monoamido e l'acetato di amido, gli amidi pregelatinizzati e gli amidi trattati meccanicamente o estrusi. Questi amidi modificati sono in grado di cambiare l'assorbimento dell'acqua, il comportamento nella fase di rigonfiamento dei granuli, la temperatura di gelatinizzazione e la viscosità dell'impasto. Essi sono usati come agenti addensanti, stabilizzano la struttura della mollica e possono diminuire la retrogradazione (Houben, Höchstötter, & Becker, 2012). È stato dimostrato

che nei GFBs, l'adipato di amido acetilato e il fosfato di amido idrossipropilico migliorano il volume del pane che avrà anche una mollica più elastica, meno dura e meno gommosa (Ziobro et al., 2012). Gli amidi modificati chimicamente, pur presentando notevoli vantaggi, sono spesso poco utilizzati, poiché, essendo identificati come additivi alimentari, devono essere rappresentati in etichetta con la sigla “E+numero”, e questo risulta un fattore poco apprezzato dai consumatori (Conte, 2015). Invece, gli amidi modificati tramite processi termici o fisici sono paragonati agli amidi nativi e non hanno bisogno di essere segnalati in etichetta. Gli amidi modificati, sono presenti nel 7 % dei prodotti GF analizzati nel mercato mondiale, ed il più adoperato risulta essere quello pre-gelatinizzato di tapioca (Roman et al., 2019).

## 5 INGREDIENTI CONVENZIONALI

### 5.1 Risorse amidacee convenzionali

#### 5.1.1 L'amido di mais

Il mais (*Zea mays*) è uno dei principali cereali coltivati in tutto il mondo ed è secondo solamente al frumento per superficie totale destinata alla sua coltivazione e secondo al riso per quantità prodotta (Farnham et al., 2003). L'amido di mais risulta essere un prodotto molto regolare che porta all'omogeneità durante la panificazione dei GFBs (Roman et al., 2019), anche se le valutazioni sensoriali hanno determinato che i GFBs a base di amido di mais hanno una consistenza secca e friabile (Mancebo, Merino, Martinez, & Gomez, 2015). Comunque, è ormai risaputo che le caratteristiche chimico-fisiche e funzionali delle varie tipologie di amido nativo, le quali influenzano le caratteristiche dei prodotti alimentari e sono state testate per numerose applicazioni, variano a seconda dell'origine botanica (Singh et al., 2003). Per esempio, l'amido di sorgo e quello di mais sono simili, ma la capacità di legare l'acqua dell'amido di sorgo è stata riportata come inferiore a quella dell'amido di



mais. Inoltre, la capacità di rigonfiamento dei granuli a 90°C dell'amido di sorgo è superiore rispetto al mais, ha una minore solubilità e una maggiore viscosità finale nella fase di raffreddamento (Allah, El-Kalyoubi, & Arab, 1987). Queste caratteristiche e la sua facile reperibilità hanno reso l'amido di mais l'ingrediente maggiormente utilizzato nei GFBs.

### 5.1.2 Altri amidi convenzionali

Gli amidi di tapioca, di patate e di riso sono ormai ritenuti ingredienti convenzionali nei GFBs grazie al loro ampio uso. La manioca o tapioca (*Manihot esculenta* Crantz), nota anche come cassava, è una pianta tipica delle regioni del sud America, cresce con un clima umido e tropicale e in condizioni di bassa disponibilità di nutrienti (Burrell, 2003).

L'amido di tapioca è considerato un ottimo ingrediente per la preparazione del pane senza glutine grazie alle sue proprietà viscosive che consentono di ottenere impasti maggiormente coesi e (rispetto alle altre riserve di amido) con una maggiore capacità di inglobare l'aria durante la fase d'impastamento e i gas durante la fase di lievitazione e, di conseguenza, un prodotto finito con una migliore consistenza ed un volume specifico superiore (Onyango et al., 2009, 2011). La combinazione dell'amido di tapioca con l'amido di sorgo ha avuto un effetto migliore sul volume specifico dei GFBs, rispetto alla combinazione di amido di patate, di riso o di mais con farina di sorgo (Onyango et al., 2011). Tuttavia, è bene sottolineare che sia l'amido di tapioca che la fecola di patate sono solitamente adoperati come ingredienti secondari, poiché, se presenti in eccesso, la loro capacità di rigonfiamento dei granuli – caratterizzata da una elevata rapidità – potrebbe determinare effetti negativi durante la fase di cottura e limitare l'espansione del pane (Roman, Gomez & Martinez, 2021). Inoltre, la fecola di patate è caratterizzata un alto contenuto di fosfati monoesteri e un basso contenuto di fosfolipidi (Singh et al., 2003), che, in alcuni casi, interagendo con altri ingredienti presenti nella matrice (soprattutto gli idrocolloidi), potrebbero avere un

effetto negativo sul volume e sulla struttura del prodotto finito che risulterebbe eccessivamente compatto (Singh, 2016).

Un'altra (controversa) tipologia di amido ormai ampiamente utilizzata nella produzione dei pani senza glutine è rappresentata dall'amido deglutinato di frumento. In principio, il suo impiego fu oggetto di un ampio dibattito, poiché ritenuto un ingrediente poco sicuro per possibili contaminazioni di glutine, ma anche per l'impossibilità di essere consumato dai soggetti intolleranti al frumento. Tuttavia, dopo l'ottenimento di un processo di produzione sicuro è ora considerato uno degli amidi nativi (seguito dall'amido di mais) più efficaci nell'ottenimento di GFBs con un idoneo volume specifico (Roman et al., 2019; Mancebo, et al., 2015; Martinez & Gomez, 2017).

## 5.2 Farine convenzionali

### 5.2.1 Farina di riso

Il riso (*Oryza sativa L*) è un importante alimento di base per circa il 50% della popolazione mondiale, soprattutto in Asia (FAO, 2013). Il pane prodotto con farina di riso potrebbe rappresentare una nuova frontiera per la lavorazione del riso, soddisfacendo il fabbisogno di pane delle persone intolleranti al glutine (Wu et al., 2019). Infatti, la farina di riso appare particolarmente adatta alla produzione dei GFBs per il suo essere insipida, per il colore bianco e le sue proprietà ipoallergeniche. Essa, inoltre, è altamente digeribile, facilmente reperibile e poco costosa (Neumann & Bruemmer, 1997; Capriles & Arêas, 2014a; Hager et al., 2012; Selmo & Salas-Mellado, 2014). Tuttavia, è bene sottolineare che la farina di riso, accanto ai succitati numerosi vantaggi, presenta anche dei limiti tecnologici legati soprattutto alle scarse proprietà funzionali delle sue proteine. Infatti, la loro natura idrofobica e il basso contenuto di prolamine, rendono le proteine del riso incapaci di creare impasti viscoelastici, con conseguente ottenimento di prodotti finiti caratterizzati da una mollica molto compatta ed uno scarso volume specifico (Hager et al., 2012; Kadan,

Robinson, Thibodeaux, & Pepperman, 2001). Inoltre, anche le tecniche di macinazione applicate e la quantità di amido danneggiato in essa contenuto sembrano giocare un ruolo chiave nel determinare la qualità tecnologica e nutrizionale dei pani da essa derivati (de la Hera, Martinez & Gomez, 2013; Wu et al., 2019). Infatti, farine di riso prodotte tramite la macinazione “ad umido”, con basso contenuto di amido danneggiato (2,8%) e con granulometria delle particelle maggiore (125-180  $\mu\text{m}$ ), consentono di ottenere prodotti finiti con caratteristiche fisiche migliori (soprattutto in termini di volume specifico) di quelli ottenuti impiegando farine con granulometria inferiore e maggior quantità di amido danneggiato (de la Hera, Martinez & Gomez, 2013). Infine, le caratteristiche finali dei GFBs prodotti con farina di riso sono strettamente dipendenti dal rapporto amilosio/amilopectina, dalla struttura dell'amido, dalla conformazione delle proteine e dalla granulometria della farina utilizzata (Cornejo & Rosell, 2015).

### 5.3 Additivi e ingredienti funzionali

#### 5.3.1 Idrocolloidi

Gli idrocolloidi, chiamati anche gomme alimentari, sono una categoria di biopolimeri idrofilici che includono polisaccaridi di diversa origine e struttura chimica, tutti capaci di assorbire e trattenere l'acqua e rendere viscoso un sistema acquoso (formazione di gel) (Anton & Artfield, 2008; BeMiller, 2008). Proprio in virtù di queste caratteristiche, vengono ampiamente utilizzati nei processi alimentari come additivi per modificare la reologia e la consistenza delle sospensioni acquose, migliorare la struttura degli alimenti, come sostituti del glutine nelle formulazioni senza glutine, per ridurre il processo di retrogradazione dell'amido, aumentare la capacità di trattenere l'acqua, prolungare la shelf-life e la qualità dei prodotti. Questi polisaccaridi sono in generale utilizzati nelle produzioni

alimentari come coadiuvanti di lavorazione, come fibre alimentari o per conferire specifiche proprietà funzionali ai prodotti (Kohajdová & Karovičová, 2009).

Pur avendo ottime capacità di gelatinizzazione con creazione di film tridimensionali, gli idrocolloidi hanno differenti proprietà viscoelastiche rispetto glutine. Infatti, la “rete” formata dagli idrocolloidi, se pur di natura fibrillare come quella formata dal glutine, è costituita da legami idrogeno e dalla reticolazione tra molecole anioniche e cationi multivalenti lungo la catena polisaccaridica, con il risultato che la maggior parte di essi forma gel idrosolubili solitamente non estensibili e alcuni con caratteristiche termo-reversibili (BeMiller, 2008). Ad ogni modo, le caratteristiche degli idrocolloidi differiscono notevolmente in funzione della loro origine e della struttura chimica. È rilevante il fatto che, attraverso la loro combinazione - utilizzando idrocolloidi con diverse proprietà, come modulo elastico, durezza, fragilità, coesione e adesività - si possono ottenere gel completamente diversi fra loro, che influenzano le proprietà dei prodotti finiti (BeMiller, 2008; Houben et al., 2012). Tra gli idrocolloidi di origine naturale maggiormente utilizzati nella produzione di pane senza glutine, si ricordano la gomma di guar, la fibra di *Psyllium* e gli estratti ed essudati vegetali come pectina,  $\beta$ -glucani e gomma arabica.

Tra i derivati di sintesi chimica – ottenuti a partire dalla cellulosa – si ricordano l'idrossipropilmetilcellulosa (HPMC), la carbossimetilcellulosa (CMC) e la metilcellulosa (MC), mentre, tra quelli derivati da biosintesi microbica, il più utilizzato è la gomma xantano (De Angelis & Di Cagno, 2010; Capriles & Arêas, 2014; Houben et al., 2012).

### 5.3.2 Proteine

Nella panificazione senza glutine, per poter compensare la perdita di funzionalità derivata dall'assenza del glutine e migliorare le caratteristiche reologiche degli impasti, così come le caratteristiche fisiche, nutrizionali e di struttura dei prodotti finiti, sono state impiegate

numerose fonti proteiche sia di origine animale che di origine vegetale, sia in assenza che in combinazione con altre molecole strutturanti (Khoury, Balfour-Ducharme, & Joye, 2018). Tra le fonti proteiche di origine vegetale più comunemente utilizzate ritroviamo, ad esempio, legumi, mentre tra quelle di origine animale, i derivati del latte e le uova (Capriles & Arêas, 2014). Per esempio, Ribotta et al. (2004) hanno dimostrato che la farina con granulometria fine (dimensioni delle particelle tra 90 e 120  $\mu\text{m}$ ) ad alto contenuto di proteine derivata dalla soia, in aggiunte del 12,5 % e del 15 % in una formulazione a base di farina di riso e di tapioca, porta ad un miglioramento della struttura della mollica e un migliore volume specifico dei risultanti GFBs. Altri autori (Sanchez et al., 2002) hanno riscontrato che l'aggiunta di farina di soia (0,5 %) nelle formulazioni contenenti amido di mais e tapioca e farina di riso può migliorare la struttura della mollica ed il volume del pane. È bene però sottolineare che l'impiego di un ingrediente come la soia, fortemente allergizzante, dovrebbe essere attentamente valutato (Fernández-Rivas & Ballmer-Weber, 2007). Di particolare rilevanza negli ultimi anni sono state le ricerche condotte su una proteina di riserva del mais, la zeina, il cui impiego nella panificazione senza glutine ha consentito di ottenere risultati promettenti. Nel 2013, il Dipartimento R&S di Dr. Schär ha brevettato un metodo economico per estrarre la zeina da utilizzare come additivo nei prodotti senza glutine in modo che le sue proprietà potessero essere apprezzate da una fascia più ampia di popolazione. Successivamente, Berta, Koelewijn, Öhgren, & Stading, (2019), hanno combinato l'uso di zeina e HPMC ottenendo sia impasti che prodotti finiti con caratteristiche molto simili ai pani prodotti utilizzando la farina di frumento.

Grazie alle loro proprietà schiumogene ed emulsionanti, anche le proteine delle uova sono state (e sono tutt'ora) ampiamente utilizzate nella produzione dei GFBs. Il loro impiego, infatti, consente di creare una rete proteica con funzioni simili a quelle del glutine, di migliorare la ritenzione dei gas durante le fasi di impastamento e lievitazione, ma anche di

stabilizzare la struttura dei GFBs e migliorarne il volume finale (Houben et al., 2012). Allo stesso modo, le proteine del latte e derivati hanno consentito di migliorare le proprietà reologiche degli impasti, così come la struttura, il colore ed il sapore dei pani senza glutine. Krupa-Kozak et al. (2013) hanno valutato gli effetti dell'aggiunta di quattro proteine del latte a basso contenuto di lattosio, riscontrando per tutti i campioni analizzati effetti positivi sul volume specifico, sul colore della crosta e sul contenuto finale in proteine del pane. Tuttavia, nonostante i numerosi vantaggi legati all'impiego dei prodotti di origine lattiero-casearia, il loro impiego viene spesso limitato a causa della frequente correlazione tra la malattia celiaca e l'intolleranza al lattosio (Capriles & Arêas, 2014; Houben et al., 2012; Conte et al., 2019; Roman et al., 2019).

Spesso, queste fonti proteiche alternative presentano anche un profilo amminoacidico migliore del glutine, ed essendo coinvolte nelle reazioni di imbrunimento di Maillard, migliorano il colore dei GFBs ed il sapore (Khoury et al., 2018). Infatti, uno dei fattori nutrizionali messi in risalto dalla letteratura scientifica è la carenza del contenuto proteico nei prodotti GFBs, se paragonati alla controparte con frumento. Roman et al. (2019) riportano un valore medio di proteine nei GFBs di 3,91 g/100 g di s.s per 211 prodotti analizzati; risultati molto bassi (4,29 g /100 g di s.s) son stati riportati anche da Cornicelli et al. (2018), dopo l'analisi di 40 GFBs presenti sul mercato italiano.

## 6 INGREDIENTI NON CONVENZIONALI

### 6.1 Pseudocereali e legumi

Le farine derivate dai pseudocereali (grano saraceno, quinoa e amaranto), cereali minori (miglio, teff) e dai legumi (carruba, ceci, fagioli, soia e vinal) sono usate come ingredienti secondari nella produzione dei GFBs grazie ai loro effetti benefici sulle proprietà nutrizionali e, in molti casi, sulle caratteristiche tecnologiche dei prodotti finiti (Conte et al., 2019; Khoury et al., 2018; Korus, Gumul, Krystyjan, Juszczak, & Korus, 2017; Capriles & Arêas, 2014).

L'eccellente valore nutrizionale dovuto ad una composizione proteica bilanciata, un alto contenuto di fibra alimentare, e micronutrienti (vitamine, minerali e fenoli) ha rinnovato l'interesse per alcune specie vegetali sottoutilizzate (naturalmente prive di glutine) come il grano saraceno, l'amaranto e la quinoa. Il grano saraceno (*Fagopyrum esculentum* e *Fagopyrum tataricum*) è una coltura originaria dell'Asia centrale ed è stato diffuso dai popoli nomadi in Europa centrale e orientale. L'achenio di forma triangolare è caratterizzato da un endosperma strutturalmente e chimicamente affine a quello delle cariossidi dei cereali (Alvarez-Jubete, Auty, Arendt, & Gallagher, 2010; Schoenlechner, 2016). Il grano saraceno è stato fino ad ora lo pseudocereale più utilizzato nelle formulazioni dei GFBs. Diversi autori hanno dimostrato come il suo elevato valore nutrizionale, legato soprattutto all'eccellente composizione in termini di amminoacidi essenziali e all'elevato contenuto in micronutrienti, consenta di migliorare il profilo nutrizionale dei GFBs, specialmente nel contenuto di Cu e Mg (Krupa-Kozak, Wronkowska, & Soral-Smietana, 2011; Conte et al., 2019). Altri autori, invece, hanno osservato che l'aggiunta della farina di grano saraceno (fino al 30%) nelle formulazioni di GFBs a base di farina di riso consentiva di ottenere impasti strutturati anche senza l'impiego di idrocolloidi, e un prodotto finito migliorato nelle caratteristiche di conservabilità grazie

alla riduzione del grado di retrogradazione dell'amido (Torbica et al., 2010). Sebbene negli ultimi anni il pseudocereale maggiormente impiegato nelle formulazioni senza glutine sia stato il grano saraceno, un sempre crescente interesse è stato dato all'inclusione delle farine di amaranto e quinoa (Conte, Fadda, Drabińska, & Krupa-Kozak, 2019). L'amaranto (*Amaranthus spp.*) e la quinoa (*Chenopodium quinoa*) erano colture importanti per le popolazioni precolombiane dell'America Latina che, tuttavia, a seguito della conquista spagnola, furono ridotte a coltivazioni su piccola scala. Entrambe le specie presentano sementi di piccola dimensione che sono solitamente macinati in farina integrale (Alvarez-Jubete, Holse, Hansen, Arendt, & Gallagher, 2009). L'uso dell'amaranto e della quinoa nella panificazione GFBs ha dimostrato numerosi effetti positivi con integrazioni effettuate su formulazioni a base di tapioca, fecola di patate, farina di riso e diversi dolcificanti (Machado Alencar et al., 2015). Gli autori hanno effettuato integrazioni del 20 % sia con farina di amaranto sia con farina di quinoa, riscontrando nei GFBs un maggiore contenuto di proteine, lipidi e ceneri rispetto al controllo, e nessun effetto negativo sulla consistenza, volume e attività dell'acqua.

Per quanto riguarda i legumi, la carruba (*Ceratonia siliqua*), contenente una proteina insolubile in acqua (carrubina), è un ingrediente molto interessante da utilizzare nella panificazione senza glutine: è stato trovato infatti che la farina di germe di carruba utilizzata in una formulazione senza glutine contenente amido di mais (93%) e HPMC (2%) in misura del 7%, determina impasti simili a quelli prodotti con farina di grano e GFBs con elevato volume specifico e mollica soffice (Smith et al., 2012). Anche l'uso di farina di castagne ha determinato dei risultati positivi sulla qualità di GFBs formulati con il 30 % di sostituzione su farina di riso (durezza, volume specifico e valori sensoriali migliori rispetto al controllo) - (Demirkesen et al., 2010).



## 6.2 Sorgo, avena, e teff

Il sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) è un cereale appartenente alla famiglia delle Graminacee. È coltivato principalmente in Asia, Africa, Stati Uniti e Sud America, mentre è poco presente in Europa: è una coltura importante poiché presenta una notevole resistenza alla siccità (Schober & Bean, 2008). Per caratteristiche botaniche è affine al mais e al riso, essendo naturalmente senza glutine, è ritenuto un ingrediente sicuro da utilizzare nella panificazione senza glutine, anche se il suo impiego è spesso associato alla comparsa di alcuni difetti nel prodotto finito (Conte et al., 2019). Infatti, è stato riscontrato che, durante la fase di macinazione della granella, le caratteristiche fisico-chimiche determinano la produzione di una farina di granulometria grossolana che induce caratteristiche sensoriali – quali una sensazione di sabbiosità in bocca – non gradite ai consumatori. Un'ulteriore raffinazione delle farine prodotte dalla prima macinatura comporterebbe un aumento della quantità di amido danneggiato e conseguenti difetti strutturali nel prodotto finito (Conte et al., 2019). Inoltre, altri autori hanno riportato che le proteine del sorgo possono formare aggregazioni che interferiscono con la gelatinizzazione dell'amido durante la fase di cottura, portando all'ottenimento di prodotti finiti con importati difetti di struttura, quali la comparsa di alveoli di grosse dimensioni nella mollica (Onyango et al., 2011b; Conte et al., 2019). D'altro canto, però, il sorgo presenta una grande quantità di composti bioattivi, è ricco di acidi fenolici e flavonoidi, e può essere utilizzato come una potenziale fonte nutraceutica (Taylor et al., 2006). Contrariamente al sorgo, l'uso della farina d'avena (*Avena sativa*) nella produzione dei prodotti senza glutine (pur essendo un ingrediente naturalmente privo di glutine) è ancora oggetto di discussione a causa delle possibili contaminazioni che si potrebbero verificare nelle varie fasi del processo produttivo. Anche i dati riportati in letteratura risultano essere contraddittori: se alcuni autori hanno riportato che un consumo moderato di avena non scatena alcun effetto negativo sulla salute nella

maggior parte dei pazienti affetti da CD (Sko et al., 1995; Khoury, Balfour-Ducharme, & Joye, 2018), altri hanno riscontrato una immuno-reattività di alcuni peptidi derivati dall'avenina per alcune varietà di avena (Kosová, Leišová-Svobodová & Dvořáček, 2020). Attualmente, a livello normativo, la Commissione Europea la considera a tutti gli effetti un ingrediente senza glutine (CE 41/2009). Tale approvazione vige anche in Canada, al contrario di Australia e Nuova Zelanda (Kosová, Leišová-Svobodová & Dvořáček, 2020). Ugualmente, alcuni cereali minori sono ritenuti validi come ingredienti nei GFBs, per esempio, il teff (*Eragrostis tef*), il cereale maggiormente coltivato in Etiopia, è stato considerato efficace nel migliorare le caratteristiche dei GFBs grazie al suo eccellente profilo nutrizionale: contiene l'11% di proteine, l'80% di carboidrati e il 3% di grassi, è un'eccellente fonte di aminoacidi essenziali, specialmente in lisina, l'amminoacido maggiormente carente nel grano (Cappelli, Bettaccini, & Cini, 2020). Tuttavia, la farina di teff, utilizzata come unico ingrediente, compromette la qualità sensoriale dei GFBs, per questo motivo è stato raccomandato il suo utilizzo in una formulazione composta da più ingredienti di base (Heger et al., 2012).

### 6.3 Ingredienti innovativi

Recentemente l'interesse verso tipologie di alimenti a basso impatto ambientale ha portato la comunità scientifica ad analizzare nuove risorse alimentari che siano più sostenibili, sicure ed equilibrate dal punto di vista nutrizionale. Alcune di queste risorse sono state adoperate anche per la formulazione dei GFBs. Per esempio, Korus et al. (2012), hanno utilizzato la farina di canapa e del concentrato proteico derivato dalla canapa come fortificatori nutrizionali e tecnologici negli impasti e nei GFBs. La sostituzione di amido di mais e amido di patate con il concentrato proteico di canapa (20%) ha portato ad un miglioramento delle caratteristiche degli impasti, un aumento del volume specifico, un decremento della durezza della mollica, migliori caratteristiche nutrizionali e una maggiore

accettabilità sensoriale dei pani fortificati rispetto al campione di controllo. Sono state testate nei GFBs anche risorse proteiche emergenti, come le farine di insetti. Per esempio, è stato osservato un riscontro positivo nella fortificazione degli impasti senza glutine a pasta acida, con farina di grillo: gli impasti prodotti presentavano una fermentazione simile al controllo, e la farina di grillo dava ai pani un profilo aromatico tipico, un miglioramento del contenuto proteico e dell'attività antiossidante accompagnata da un'accettazione sensoriale simile al controllo di riferimento (Nissen et al., 2020).

In questa tesi di ricerca, nell'ottica di individuare risorse naturali poco sfruttate e dalle eccellenti caratteristiche nutrizionali, il polline d'api e la farina prodotta dalle ghiande sono stati scelti come ingredienti innovativi da incorporare nelle formulazioni dei GFBs.

### 6.3.1 Il polline d'api

#### 6.3.1.1 *Super food: le potenzialità del polline d'api come cibo funzionale.*

Oggi i consumatori sono fortemente predisposti all'acquisto di prodotti con un eccellente profilo nutrizionale, spesso denominati "superfood", categoria in cui è stato recentemente inserito il polline d'api. Infatti, grazie all'ausilio della raccolta razionale – tecnica innovativa che consente di raccogliere anche il polline bottinato dalle api tramite l'impiego di trappole posizionate all'ingresso degli alveari – è stato possibile includere il polline tra i prodotti adatti all'integrazione alimentare, in particolare nel trattamento degli individui affetti da problemi nutrizionali, che lo rendono un "superfood" naturale pressoché perfetto. Già agli inizi degli anni Settanta, i ricercatori hanno evidenziato gli aspetti positivi dovuti ad un supplemento della dieta di alcuni atleti con il polline d'api, con effetti positivi sulla prevenzione delle infezioni respiratorie e sulla longevità (Stanley et al., 1974). I pollini non son altro che i gameti maschili delle piante da seme contenuti in strutture particolari chiamate “granuli pollinici” (Ariano, 2006) che portano al loro interno una grande varietà di nutrienti (Krell, 1996). I granuli pollinici, pur presentando differenti morfologie e

grandezze a seconda della specie, possiedono una struttura comune. Essi sono infatti costituiti da una parete, lo *sporoderma*, formata da un doppio rivestimento cellulare: l'*esina*, la parte più esterna costituita da *sporopollenine* (particolari sostanze appartenenti ai terpeni), e l'*intina*, di natura pectocellulosica, che avvolge il citoplasma. In molte specie, l'*esina* è rivestita da una sostanza oleosa detta "*pollen kit*" ricca di carotene, polifenoli, fitosteroli, flavonoidi e vitamine liposolubili (Komosinska-Vassev et al., 2015). All'interno del citoplasma è invece contenuto il tubetto pollinico che, in fase di fecondazione, fuoriesce tramite appositi pori nelle membrane.

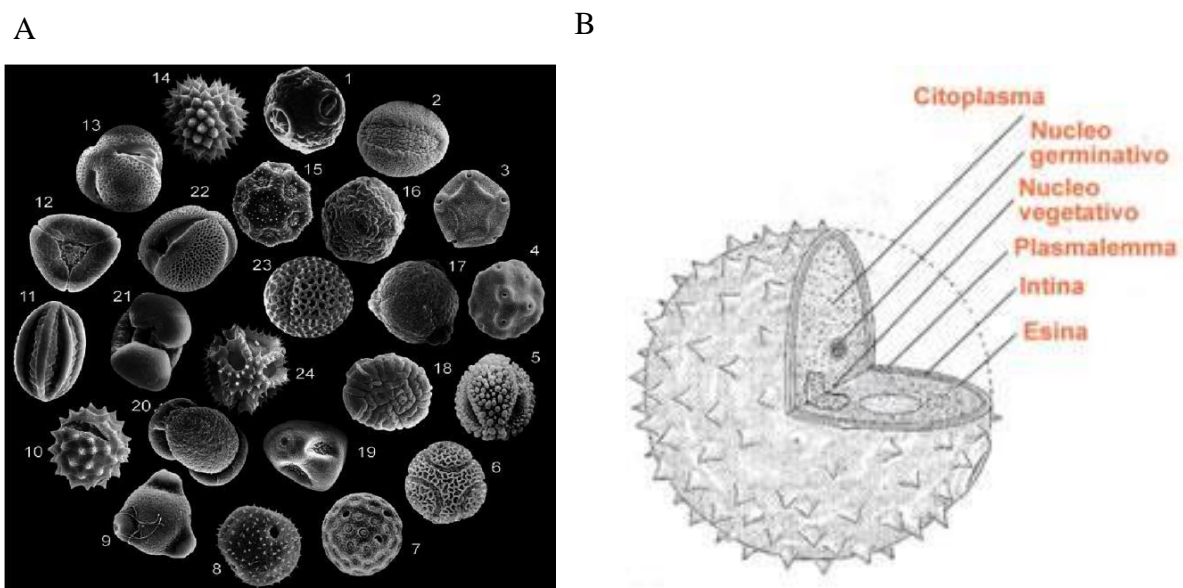


Figura 1. *Granuli pollinici di specie differenti (Suárez-Cervera et al., 2008) (A); struttura del granulo pollinico (B).*

Per poter effettuare la fecondazione dei fiori femminili, numerose piante superiori delle Angiosperme e Gimnosperme effettuano l'impollinazione servendosi degli insetti, quali le api, come vettori del polline. Il polline d'api, secondo la definizione proposta da Campos et al. (2008), è "il risultato dell'agglutinazione di pollini floreali, realizzato da api operaie con

nettare di fiori e secrezioni salivari raccolte all'ingresso dell'alveare". Questo prodotto è ricco di micronutrienti come vitamine, carotenoidi, composti fenolici, steroli e terpeni e la sua composizione è fortemente dipendente dalle specie botaniche (Leja et al., 2007).

Numerosi studi hanno dimostrato che le proprietà tecno-funzionali del polline d'api, come la capacità di assorbimento dell'acqua e dell'olio, l'attività emulsionante e schiumogena, sono correlate con la varietà botanica d'origine e possono avere effetti positivi sia nella qualità tecnologica che nelle qualità nutritive di numerosi prodotti alimentari (Schmitt et al., 1998; Kostic et al., 2015).

Recentemente, a seguito del crescente interesse dei consumatori verso i cibi funzionali, il polline è stato oggetto di numerose ricerche su prodotti fermentati, da forno, dolciari, sui succhi di frutta e nella carne (Kostic et al., 2020). In passato si pensava che i granuli pollinici, contenuti nei pollini d'api freschi ed essiccati, essendo rivestiti da una parete cellulare simile alla lignina, non potessero essere digeriti dagli esseri umani. Recentemente, tuttavia, tramite una simulazione in vitro della digeribilità di questi elementi è stato dimostrato che circa il 50% viene assorbito, aumentando sino all' 80 % se il polline d'api subisce un processo preventivo di macinatura e viene disciolto in acqua calda (Bogdanov, 2017; Kieliszek et al., 2018). Utoiu et al., (2018), utilizzando il polline d'api nella produzione di Kombucha (bevanda fermentata a base di tè zuccherato, molto diffusa in oriente), hanno osservato un aumento significativo della disponibilità dei composti bioattivi nel prodotto finito, con l'ottenimento di un moderato effetto antitumorale. Alcuni studi effettuati sullo yogurt hanno invece evidenziato una stretta correlazione tra l'aumento dell'attività antiossidante, un miglioramento della consistenza e del sapore del prodotto e l'origine botanica del polline e la quantità utilizzata (Atallah et al., 2016, 2017; Khider et al., 2013; Karabagias et al., 2018). Krystyan et al. (2015) hanno riscontrato un significativo incremento – rispetto al campione di controllo – del contenuto di zuccheri, proteine, ceneri,

fibre e polifenoli, nonché del potenziale antiossidante e delle caratteristiche sensoriali di biscotti a base di farina di frumento fortificati con il 5% di polline d'api. Conte et al. (2018, 2020) hanno dimostrato come il polline d'api possa rappresentare una risorsa aggiuntiva dai molteplici risvolti positivi sul piano sia tecnologico che nutrizionale nella produzione di GFBs. Gli autori hanno osservato che i pani fortificati, soprattutto con percentuali medio alte di polline d'api (4%), presentavano un maggiore volume specifico, una mollica coesa, soffice ed elastica e un colore della crosta più scuro ed un profilo nutrizionale superiore rispetto al campione di controllo. Inoltre, i GFBs fortificati erano caratterizzati da una maggiore quantità di proteine e minerali, una elevata quantità di polifenoli, di carotenoidi e una migliore capacità antiossidante. Miglioramenti nella consistenza, con diminuzione della durezza, dell'adesività e della gommosità sono stati osservati anche nelle polpette di carne preparate con l'aggiunta del polline d'api (1,5%-6%) (Turhan et al., 2014), mentre Almeida et al. (2017) hanno riscontrato un effetto positivo dell'utilizzo del polline d'api come antiossidante naturale per ritardare l'ossidazione lipidica durante lo stoccaggio a temperature refrigerate d'insaccati suini.

#### *6.3.1.2 Tecniche di apicoltura per la raccolta e trattamento del polline.*

Le api (*Apis mellifica* L.) sono insetti molto complessi, definiti come insetti sociali appartenenti all'ordine degli Hymenoptera, sottordine Apocrita, famiglia Apoidea. La coevoluzione che è avvenuta nelle piante superiori e negli insetti ha portato alla specializzazione di entrambi per una particolare tipologia di impollinazione svolta dagli insetti "pronubi", terminologia tramandata dal greco che significa "che presiede alle nozze". Le api sono identificate come impollinatori d'eccellenza, insetti poliletici capaci di impollinare ben 170 mila specie di Angiosperme (Ricciardelli D'Albore & Intoppa, 2000; Tautz, 2009). Inoltre, sebbene attratte maggiormente dalle piante da fiore, sono in grado di raccogliere anche il polline delle piante anemogame (prive di nettare) mordendo

le antere per provocare la fuoriuscita del polline. Una volta trasportato all'alveare il polline viene ceduto alle giovani api operaie che lo immagazzinano nelle celle per elaborarlo ulteriormente e trasformarlo, e dopo una fermentazione lattica, in "pane d'api", il principale nutrimento per le larve dei fuchi e delle operaie.

La raccolta del polline d'api viene effettuata tramite apposite trappole, le quali non sono altro che delle strutture che si posizionano agli ingressi degli alveari durante i periodi di grandi importazioni pollinifere, costituite da una griglia forata che è in grado di far perdere il raccolto alle bottinatrici nel momento in cui rientrano. Dalle stime effettuate da Keller et al., (2005) è emerso che una colonia del centro Europa di medie dimensioni (dalle 100.000 alle 200.000 api all'anno) ha una necessità variabile di polline da 17 a 34 kg. Le trappole, infatti, sono state progettate in modo da non creare danni alle api con regimi di efficienza tra il 3 % e il 25 %. Mediamente si attesta una efficienza del 10 % (Campos et al., 2010). L'evoluzione avvenuta nelle trappole è importante sia per le agevolazioni nella pratica apistica sia per preservare la qualità. Il polline d'api è altamente igroscopico e necessita di una cura particolare in fase di raccolta, in modo da evitare gli accumuli di umidità, la compressione del prodotto, la pulizia e l'areazione, e ridurre eventuali contaminazioni chimiche e biologiche (Brajan, 2014). Essendo la raccolta una fase critica da un punto di vista microbiologico, il polline necessita di essere prelevato dalle trappole frequentemente, in media ogni due giorni, e di essere sottoposto a trattamenti termici per lo stoccaggio (Gonzales et al., 2005). La tecnica della disidratazione tramite correnti di aria calda e la liofilizzazione sono le tecniche maggiormente applicate (Isik et al., 2019; De-Melo et al., 2016; Ranieri et al., 2019). La disidratazione in correnti d'aria calda continua deve essere effettuata a temperature non superiori ai 40 °C, con tempi di essiccazione relativamente lunghi per agevolare il processo di disidratazione ed aumentare la shelf-life del prodotto. Se queste condizioni non sono rispettate si riscontrano notevoli svantaggi rispetto al

prodotto fresco, come una riduzione nel contenuto di vitamine (Vitamina C,  $\beta$ - carotene, Vitamina E), un calo delle proteine e un significativo decremento degli attributi sensoriali (Bogdanov, 2017; Isik et al., 2019). Tuttavia, alcuni autori (Zuluaga-Dominguez & Quicazan, 2019) hanno dimostrato che l'impiego di temperature di disidratazione più elevate (60 °C), pur portando ad una riduzione del valore nutrizionale del prodotto, consente di aumentarne la stabilità durante la conservazione (incremento dei valori di pH e una riduzione dell'acidità libera) riducendo il rischio di alterazione da parte dei batteri gram-positivi. La liofilizzazione è invece la tecnica che permette il mantenimento dei più alti livelli di proteine, vitamina E, lipidi e composti fenolici (Ranieri et al., 2019; De-Melo et al., 2016). Numerosi altri trattamenti, tra cui l'essiccazione sottovuoto, essiccamento a microonde e la refrigerazione sono stati testati. Il congelamento (-18 °C), come trattamento termico tempestivo sul polline preventivamente sottoposto a cernita, viene utilizzato ad esempio come metodo di stoccaggio e permette di preservare inalterate le proprietà biologiche e nutrizionali, nonché le qualità organolettiche che son invece alterate dall'essiccazione. Chiaramente il mantenimento della catena del freddo determina costi notevoli che rendono difficile l'utilizzo di questa tecnologia (Contessi 2018).

#### *6.3.1.3 Composizione del polline d'api e proprietà nutraceutiche*

Le numerose specie botaniche visitate dall' *Apis mellifica* L permettono di ottenere pollini d'api completamente differenti fra loro. Generalmente le api continuano a bottinare una stessa specie (fino all'esaurimento della risorsa) se è una buona fonte di raccolto, se presente in modo abbondante e se non vi sono altre specie più appetibili (D'Albore & Intoppa, 2000). Questo comportamento delle api potrebbe essere sfruttato per produrre pollini monofloreali che, oltre ad avere il vantaggio di essere prodotti costanti nella composizione, potrebbero essere utilizzati in nutrizione e in medicina per i loro effetti benefici sulla salute (Bogdanov, 2017). Il polline d'api monoflora è stato definito come il



raccolto basato sulla predominanza di un unico *taxon* botanico, con frequenza del 90%, oppure come un insieme di pollini che non contengano *taxa* accessori in percentuale superiore al 60% (Barth et al., 2010). In Austria è stato messo a punto il prototipo di un macchinario che permette, tramite lo sviluppo di un apposito software, il riconoscimento delle “pallottole” di polline multiflora in base al colore, anche se, talvolta, il colore non indica la predominanza dello stesso *taxon* (Bogdanov, 2017). Infatti, a parità di colore, sia il genere sia la specie di appartenenza dei pollini presenti in un lotto di polline d’api potrebbero cambiare. Per le difficoltà nell’identificare i *taxa* presenti, il polline d’api viene commercializzato come multiflora, per cui la composizione chimica, il colore, la consistenza, le proprietà nutritive e le proprietà funzionali variano notevolmente a seconda delle specie botaniche presenti e dalla loro predominanza. La differenza nella composizione è determinata dalla variabilità stagionale e dalla regione di provenienza, sia per i pollini monoflora che multiflora (de Melo et al., 2009; Thakur & Nanda, 2020). Numerose ricerche hanno definito la composizione di molti tipi di pollini d’api, e alcuni Stati, come la Polonia, la Bulgaria e il Brasile hanno definito i loro standard di riferimento nazionali (PN-R-78893; Bulgarian standard 2567111-91, Brasile, 2001).

I range nella composizione chimica del polline d’api essiccato sono stati definiti da Campos et al. (2008) (tabella 1), che hanno proposto un primo approccio per uno standard dei criteri di qualità applicabili sul polline a livello mondiale.

Tabella 1. *Composizione chimica del polline d'api e standard di riferimento proposti da Campos et. al., 2008*

<b>Composizione</b>	<b>Quantità riscontrate in letteratura (g/100 g ss)</b>	<b>Proposta per i quantitativi di riferimento g/100g)</b>
Umidità	\	Non oltre di 6-8
Proteine	10-40	Non meno di 15
Lipidi	1-13	Non meno di 1,5
Carboidrati totali	13-55	Non meno di 40
Fibre	0,3-20	\
Ceneri	2-6	Non oltre 6
Sostanze non determinate	2-5	\

Il polline d'api appena raccolto, fresco, presenta una **umidità** variabile tra 7-30 % (Campos et al., 2009), mentre il range di umidità relativo al polline essiccato (non oltre l'8%) identificato da Campos et al. (2008), si riferisce ai valori legislativi di Paesi quali Svizzera, Polonia e Brasile. La qualità e le condizioni di stoccaggio dei pollini sono fortemente dipendenti dai suoi valori di attività dell'acqua ( $a_w$ ) (Nogueira et al., 2012). Il polline d'api, essendo un prodotto igroscopico, presenta una elevata  $a_w$  che comporta un rischio biologico, poiché favorisce la crescita microbiologica, l'attivazione di enzimi e lieviti, ma soprattutto muffe, che potrebbero produrre micotossine tossiche. Inoltre, considerando che l' $a_w$  influenza fortemente le condizioni igieniche durante le fasi di manipolazione, è consigliato l'essiccamento sino a valori dell'8%, al fine di prevenire il rischio microbiologico e preservare la sicurezza alimentare. Tuttavia, non esistono standard di riferimento legislativi per  $a_w$  del polline d'api (Thakur & Nanda 2020).

I **carboidrati** (18,50 – 82,80 %) sono i principali costituenti del polline d'api. Essi sono principalmente costituiti da zuccheri riducenti, soprattutto glucosio e fruttosio, che, con

rapporto che varia da 1,20 a 1,50, ne influenzano notevolmente le caratteristiche igroscopiche e la solubilità in acqua. Per esempio, Bertocelj et al. (2018), hanno individuato la composizione dei carboidrati di 44 campioni provenienti da diverse regioni della Slovenia, accertando che il 96% dei monosaccaridi presenti è costituito da glucosio e fruttosio. Dominguez et al. (2011) hanno trovato differenze significative relative alla composizione degli zuccheri semplici fra pollini monofloreali e multiflora, riscontrando un incremento di fruttosio e glucosio per quelli monoflora. Gli altri monosaccaridi e disaccaridi presenti nel polline, seppur in piccole quantità, sono il saccarosio, il turanosio, il maltosio ed il tetralosio. La composizione in carboidrati è naturalmente dipendente dalle modalità con cui le api raccolgono il polline; infatti, essendo esso impastato con il nettare o il miele per creare le pallottole da trasportare tramite le zampe, l'agente legante utilizzato modifica la composizione degli zuccheri riducenti. Gli altri polisaccaridi presenti nel polline d'api provengono principalmente dalle parti strutturali del polline, ossia dall'esina (principalmente dalla sporopollenina) e dalla intina, che costituiscono la fibra che non ha particolare valore nutrizionale, ma presenta una importante funzione regolatrice di numerosi processi biologici che avvengono nel corpo umano.

Il polline viene raccolto ed utilizzato dalle api come unica fonte di **proteine**. Inoltre, contenendo in abbondanza tutti gli amminoacidi essenziali, risulta una risorsa naturale proteica particolarmente adatta anche per l'alimentazione umana. Il contenuto proteico totale presente in letteratura è stato determinato con il metodo Kjeldahl, il quale misura il contenuto di azoto totale e si serve di fattori di conversione per risalire all'azoto proteico. Numerosi autori raccomandano come fattore di conversione 5.60, poiché molto dell'azoto determinato è di origine non proteica, appartenente agli amminoacidi liberi (Ares et al., 2018). Circa 1/10 delle proteine totali del polline è presente sotto forma di amminoacidi liberi e, generalmente, non ci sono differenze qualitative fra pollini d'api d'origine diversa:

quasi tutti contengono nella loro composizione amminoacidica tutti quelli essenziali (Bogdanov 2011; Keller et al., 2005). Il contenuto di proteine dei pollini varia per molteplici fattori già ampiamente descritti: *taxa* presenti, luogo d'origine e periodo di raccolta influenzano il contenuto che varia da valori minimi di 2,3%, come nel caso del *Cupressus arizonica* (cipresso), a valori massimi di 61,7% nel caso del *Dodecatheon clevelandii* (Primulacee) (Roulston et al., 2000). Nel polline d'api sono state identificate 9 proteine dal peso molecolare compreso fra i 12 e i 50 kDa tramite le tecniche di elettroforesi IEF/SDS e SDS/PAGE (Ares et al., 2018). Per quanto riguarda la composizione amminoacidica libera, la prolina e l'acido glutamico, sono i preponderanti e spesso il loro rapporto è usato come indicatore dello stato di conservazione e manipolazione del polline. Sono presenti come amminoacidi liberi anche gli amminoacidi essenziali come la leucina, l'isoleucina, fenilalanina, valina, treonina, triptofano e metionina (Ares et al., 2018). Campos et al. (2008) hanno riportato che il polline possiede nella sua totalità almeno 17 amminoacidi differenti. Per il mercato Europeo il contenuto minimo di amminoacidi liberi nel polline deve essere del 2% e la prolina è utilizzata come indicatore di qualità (Thakur & Nanda 2020).

Anche i **lipidi** contenuti nel polline d'api sono essenziali per il sostentamento delle api stesse con fondamentale importanza nella generazione della pappa reale. Anche per questo costituente, Campos et al. (2008), hanno identificato il limite ottimale per la commercializzazione delle varie tipologie di pollini, ma, come presentato in numerosi lavori, anche il quantitativo di lipidi è estremamente variabile e dipendente dall'origine botanica (Campos et al., 2008; Kostic et al., 2015; Ares et al., 2018). Inoltre, le differenze riportate in numerosi lavori su varie tipologie di pollini ci mostrano come, oltre alla variabilità dovuta alla specie, sia notevole anche la variabilità identificata tramite il luogo d'origine: il polline di Cisto per esempio riporta valori di lipidi di 1,9 % se Italiano, 3,8 %

se Greco e 7,2 % se di origine spagnola (Thakur & Nanda 2020). La qualità della frazione lipidica dei pollini è elevata, con rapporto acidi grassi insaturi/acidi grassi saturi (UFA/SFA) fra il 2,2 e il 6,7 con predominanza di acidi grassi (FAs)  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6, con range rispettivamente del 8,07-44,1% e 1,77-38,25 %. Inoltre, Yang et al. (2013) hanno identificato come componenti principali dei lipidi totali del polline d'api i carotenoidi, il cui consumo determina una riduzione del rischio dell'insorgenza di malattie cardiovascolari e differenti tipi di cancro, mentre gli steroli sono costituiti principalmente da  $\beta$ -sitosteroli e composti terpenici che riducono l'assorbimento del colesterolo nell'intestino tenue (Komosinska-Vassev et al., 2015).

La **fibra** contenuta nel polline d'api deriva principalmente dagli strati esterni dei granuli pollinici, frazione già discussa nella descrizione morfologica. Yang et al. (2013) hanno riportato i valori di fibra totale nei pollini d'api Cinesi compresi tra il 17,60% e il 31,26%; Domínguez-Valhondo, (2011), al contrario, non ha trovato differenze significative nei valori di fibra totale di pollini spagnoli attestando valori intorno al 14,50%. Questo autore, inoltre, ha suggerito che l'applicazione di processi alimentari può ridurre la fibra insolubile. Le **ceneri** dei pollini d'api (2-6%) presentano tutti i minerali essenziali, con alti valori di K e Ca e bassi valori di Na, se pur questi valori dipendano dall'origine geografica e dalla specie botanica (Campos, et al., 2008). Altra categoria di composti fondamentali per la salute umana, e per i quali i pollini d'api sono stati attentamente studiati, sono i **polifenoli**. In 56 campioni di polline raccolti in Brasile i polifenoli totali presentavano valori compresi tra 6,50 e 29,20 mg GAE/g (de Melo et al., 2018a), tuttavia, il range dei valori mondiali riportato in bibliografia presenta un ampio range con valori minimi di 0,5 e valori massimi di 213 mg GAE/g (Thakur & Nanda, 2020).

## 6.3.2 Le ghiande

### 6.3.2.1 Le potenzialità delle ghiande nell'alimentazione umana.

Il recente interesse da parte dei consumatori, soprattutto di individui con particolari esigenze nutrizionali, verso il consumo di alimenti funzionali nella dieta quotidiana ha portato i ricercatori ad esaminare alcuni ingredienti non convenzionali da includere nell'alimentazione umana. L'impiego di risorse naturali poco sfruttate potrebbe guidare lo sviluppo di nuovi sistemi agricoli sostenibili, e assicurare ad una popolazione più ampia l'accesso ad alimenti ad elevato valore nutrizionale (Vinha, Barreira, Costa, & Oliveira, 2016). In quest'ottica, gli alimenti provenienti dalle foreste, come le specie erbacee spontanee ed i frutti di piante arboree e arbustive, possono contribuire a diversificare le diete e garantire la eco-sostenibilità delle produzioni (Jamnadass et al., 2011; Powell et al., 2011, Tontisirin et al., 2002; Vinceti et al., 2013). In questo contesto, una crescente attenzione è stata posta nello studio delle proprietà delle ghiande che, grazie all'elevato valore nutrizionale e all'ampio profilo fitochimico, potrebbero trovare largo impiego in numerosi settori dell'industria alimentare e farmaceutica. La ghianda è un frutto indeiscente, tipo achenio, rivestito parzialmente da una cupola, ovvero un involucro originato da una proliferazione del ricettacolo. Le ghiande, che negli ultimi anni sono state definite “*new healthy foods*”, sono i frutti di numerose specie di alberi (circa 600) appartenenti alla famiglia delle *Fagaceae*, genere *Quercus* L., distribuiti nelle regioni temperate sub-tropicali e tropicali dell'emisfero settentrionale. Il genere *Quercus* è caratterizzato dalla presenza del fenomeno dell'introggressione che crea notevoli difficoltà nel riconoscimento delle specie; la forma delle ghiande, le dimensioni e l'indice di rapporto cupola/ghianda variano molto da specie a specie (Camarda & Valsecchi, 2008).

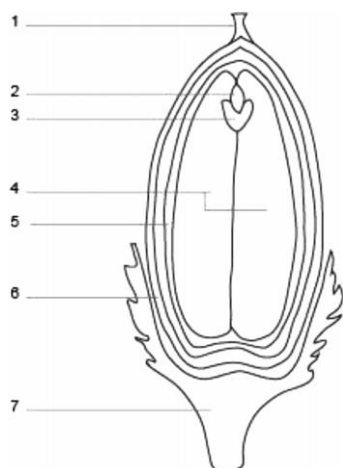


Figura 3. *Morfologia della ghianda: 1 resti di stilo; 2 radichetta; 3 plumulo; 4 cotiledoni; 5 pericarpo; 6 rivestimento del seme; 7 cupola. (Vinha et al., 2016).*

In passato le ghiande venivano destinate all'uso alimentare nei periodi di carestia, in particolare, in Sardegna, nella regione dell'Ogliastra, è stata stata tramandata fino ad oggi la produzione di un pane ottenuto con ghiande ed argilla, genericamente conosciuto come "Pan'Ispeli" (Pinna, 2013). Il tradizionale consumo di ghiande, anticamente utilizzate anche per la produzione di olio e farina, col passare del tempo è però caduto in disuso a causa di molteplici fattori, tra i quali, ad esempio, la variabilità annuale di produzione delle querce, l'elevato contenuto in fattori antinutrizionali, quali i tannini, per cui la farina di ghiande necessita di numerosi trattamenti prima di poter essere consumata, ma, anche, la coltivazione di altre risorse amidacee economicamente più vantaggiose (Cappai, Alesso, Nieddu, Sanna, & Pinna, 2013). Le ricerche effettuate negli ultimi anni hanno comunque evidenziato numerosi aspetti positivi che potrebbero rendere vantaggioso lo sfruttamento di questa risorsa. Correia, Nunes, & Beirão-da-Costa (2013) hanno rilevato che l'amido di ghiande ha una consistenza tale da renderlo un buon elemento addensante e stabilizzante, qualità promettenti nell'industria alimentare. Recentemente, Zarroug et al. (2020) hanno ottenuto effetti positivi sulla viscosità e la sineresi di prodotti lattiero caseari fermentati,

cui era stato aggiunto 1% di amido di ghiande. Inoltre, numerosi autori hanno determinato il profilo fitochimico relativo al contenuto di fenoli (flavonoidi e tannini) delle ghiande prodotte da numerose specie di querce, riscontrando, per la maggior parte di esse, una buona attività biologica (attività antiossidante, epatoprotettiva, neuroprotettiva e antimicrobica) (Aslani et al., 2009; Sung et al., 2012; Custodio et al., 2013; Toori et al., 2013). L'introduzione di farina di ghiande nel pane senza glutine ha migliorato il colore, l'accettabilità sensoriale e il contenuto finale di polifenoli rispetto al controllo, a scapito però del volume specifico del pane se aggiunta in percentuali elevate (25 %) (Skendi, Mouselemidou, Papageorgiou, & Papastergiadis, 2018). Risultati positivi sono stati ottenuti anche da Korus et al. (2015); che hanno riscontrato effetti positivi sia sul volume specifico che sulle caratteristiche fisiche della mollica, sostituendo il 20% di amido di mais con farina di ghiande nelle formulazioni di GFBs. La farina di ghiande è stata usata anche nella formulazione di biscotti di grano e farina di mais, nel lavoro di Parsaei, Goli, & Abbasi, (2018), che hanno messo in evidenza come le ghiande siano una ottima risorsa naturale per le sue elevate proprietà antiossidanti, in grado di migliorare il profilo nutrizionale dei prodotti da forno.

#### *6.3.2.2 Composizione della farina di ghiande (FG) e proprietà nutraceutiche.*

Le caratteristiche chimiche della farina di ghiande sono strettamente dipendenti dalle tecnologie con cui la farina stessa è ottenuta. Nella maggior parte casi, la fase preliminare di rimozione del pericarpo è effettuata con un taglio manuale, e la conseguente perdita del 34% del prodotto (Polimac & Komlenic, 2015). Successivamente, i cotiledoni devono subire un trattamento termico di disidratazione prima di essere macinati in farina, a causa della presenza di un elevata umidità iniziale che si attesta intorno al 18% (Correia, Leitão, & Beirão-Da-Costa, 2009). La farina ottenuta è spesso caratterizzata da un intenso sapore amaro dovuto all'elevato contenuto di tannini e, per questo motivo, viene spesso sottoposta



ad un ulteriore processo di lavorazione per ridurre il contenuto (i trattamenti maggiormente utilizzati sono rappresentati da lavaggi in acqua e/o bollitura dei frutti) (Luczaj et al., 2014; Salkova et al., 2011). Il processo di essiccamento, prima della molitura, determina l'umidità del prodotto finale. Correia et al. (2009) hanno effettuato questo processo in due fasi con una pre-disidratazione dei cotiledoni a 40 °C per 24h, e una essiccazione finale a 60 °C (identificata come temperatura ideale per preservare le caratteristiche chimiche delle ghiande) per ulteriori 24h. Altri autori (Amina et al., 2018) hanno riportato processi di essiccamento effettuati in un'unica fase. La composizione chimica media della farina di ghiande è stata recentemente riportata da Szablowska & Tańska (2020) (Tabella 2).

Tabella 2. *Composizione chimica della farina di ghiande (Szablowska & Tańska, 2020).*

Componenti (%)	Farina di Ghiande
Acqua	5,4-22,05
Carboidrati	75,22-84,09
Zuccheri	n.d.
Proteine	4,32-5
Lipidi	8,44-13,86
Fibra	10,89-17,9
Ceneri	1,81-2,04
Tannini	7,76-10,9

La farina di ghiande è principalmente costituita da **amido** (31-51%) con dimensioni dei granuli variabile da 3,3 a 126,2 µm e superficie porosa, che ne influenza le proprietà fisiche (come la capacità di legare l'acqua, il potere di rigonfiamento e la temperatura di gelatinizzazione). Le caratteristiche citate variano a seconda del luogo d'origine, della specie e dei processi utilizzati (essiccamento, trattamenti per ridurre il contenuto di tannini, estrazione dell'amido) (Cappai et al., 2013; Correia et al., 2013; Zhang et al., 2019). Per

esempio, il rapporto amiloso/amilopectina varia tra le specie, con valori di 25,8% per *Q. Ilex* L., 19,5% *Q. Pubescens* Willd e 34,5% per *Q. Suber* L (Cappai et al., 2013). L'amido delle ghiande è stato indicato come una possibile alternativa all'amido di frumento nei prodotti che necessitano di trattamenti termici, pastorizzazioni o sterilizzazioni (Molavi, Razavi, & Farhoosh, 2018). Le **proteine** delle ghiande non sono abbondanti, con valori massimi intorno al 5%, ma, essendo prive di glutine, sono adatte alla formulazioni dei prodotti senza glutine. I **lipidi** (8-13%) della farina di ghiande sono spesso caratterizzati da elevati contenuti di acido oleico e linolenico (Silva et al., 2016). La farina di ghiande è spesso caratterizzata da un alto contenuto di tannini: le sostanze maggiormente presenti sono le forme idrolizzabili dell'acido gallico e del pirogallolo, ma variano a seconda della specie (Vinha et al., 2016). I tannini presentano ottime attività antimicrobiche e antiossidanti (Sung et al., 2012), ma se presenti in elevate quantità (variabili a seconda della specie *Quercus*), conferiscono proprietà astringenti e un aroma pungente alla farina di ghiande (Vinha et al., 2016).

## 7 BIBLIOGRAFIA

- AACC Approved Methods of Analysis, 11th Edition. (2005). Retrieved May 5, 2021, from <http://methods.aaccnet.org/>
- Allah, M. A. A., Mahmoud, R. M., El-Kalyoubi, M. H., & Arab, A. A. A. (1987). Physical Properties of Starches Isolated from Yellow Corn, Sorghum, Sordan and Pearl Millet. *Starch - Stärke*, 39(1), 9–12. <https://doi.org/10.1002/star.19870390104>
- Almeida, J. de F., Reis, A. S. dos, Heldt, L. F. S., Pereira, D., Bianchin, M., Moura, C. de, Carpes, S. T. (2017). Lyophilized bee pollen extract: A natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in refrigerated sausages. *LWT - Food Science and Technology*, 76, 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.017>
- Almeida-Muradian, L. B., Pamplona, L. C., Coimbra, S., & Barth, O. M. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(1), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.10.008>
- Alvarez-Jubete, L., Holse, M., Hansen, Å., Arendt, E. K., & Gallagher, E. (2009). Impact of baking on vitamin E content of pseudocereals amaranth, quinoa, and buckwheat. *Cereal Chemistry*, 86(5), 511–515. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-86-5-0511>
- Alvarez-Jubete, Laura, Auty, M., Arendt, E. K., & Gallagher, E. (2010). Baking properties and microstructure of pseudocereal fours in gluten-free bread formulations. *European Food Research and Technology*, 230, 437–445. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1184-z>
- Amina, M., Djamel, F., & Djamel, H. (2018). Influence of fermentation and germination treatments on physicochemical and functional properties of acorn flour. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 24(4), 719–726.
- Anton, A. A., & Artfield, S. D. (2008). Hydrocolloids in gluten-free breads: A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, Vol. 59, pp. 11–23. <https://doi.org/10.1080/09637480701625630>
- Arentz Hansen, H., McAdam, S. N., Molberg, Ø., Fleckenstein, B., Lundin, K. E. A., Jørgensen, T. J. D., Sollid, L. M. (2002). Celiac lesion T cells recognize epitopes that
- Roberto Arca, “Potenzialità di utilizzo dei prodotti derivati da risorse non convenzionali nelle formulazioni di pane senza glutine” - Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie  
- Curriculum “Produttività delle Piante coltivate” - Ciclo “XXXIII” Università degli Studi di Sassari  
Anno Accademico 2018 - 2021

- cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology*, 123(3), 803–809. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.35381>
- Ares, A. M., Valverde, S., Bernal, J. L., Nozal, M. J., & Bernal, J. (2018). Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 110–124. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.009>
- Ariano R. (2006). I granuli pollinici. In: Ariano R., Bonifazi F. *Aerobiologia ed allergeni stagionali. Edizioni Culturali Internazionali Genova*, Genova, Italia, 77-98.
- Aslani, A., Emami, S. M., Ghannadi, A., Ajdari, M. (2009). Formulation and physicochemical evaluation of an herbal antihemorrhoid ointment from Quercus, Black cumin and Fenugreek for the treatment of internal anal hemorrhoids. *J Pharm Sci Tabriz Univ Med Sci* 14, 247–57
- Atallah, A. A., & Morsy, K. M. (2017). Effect of Incorporating Royal Jelly and Bee Pollen Grains on Texture and Microstructure Profile of Probiotic Yoghurt. *Journal of Food Processing & Technology* 8(9), 8–11. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000693>
- Atallah, AA. (2016). The Production of Bio-yoghurt with Probiotic Bacteria, Royal Jelly and Bee Pollen Grains. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 6, 510. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000510>
- Atkinson, F.S., Foster-Powell, K., & Brand-Miller, J.C. (2008). International tables of Glycemic Index and Glycemic Load values: 2008. *Diabetes Care*, 31, 2281–2283.
- Barbieri, D., Gabriele, M., Summa, M., Leonardi, D., Domenici, V., & Pucci, L. (2020). Fluorescence Spectral Profiles of Bee Pollen Samples from Different Botanical Origins. *Antioxidants*, 9, 1001; <https://doi:10.3390/antiox9101001>
- Barth, O. M., Freitas, A. S., Oliveira, É. S., Silva, R. A., Maester, F. M., Andrella, R. R. S., & Cardozo, G. M. B. Q. (2010). Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: a proposal for technical standardization. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 82(4), 893-902. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652010000400011>

- Beltrão Martins, R., Nunes, M. C., M. Ferreira, L. M., A. Peres, J., R. N. A. Barros, A. I., & Raymundo, A. (2020). Impact of Acorn Flour on Gluten-Free Dough Rheology Properties. *Foods*, 9(5), 560. <https://doi.org/10.3390/foods9050560>
- BeMiller, J. N. (2008). Hydrocolloids. In *Gluten-Free Cereal Products and Beverages* (pp. 203–215). <https://doi.org/10.1016/B978-012373739-7.50011-3>
- Bemiller, J. N., & Huber, K. C. (2015). Physical modification of food starch functionalities. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6, 19–69. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015552>
- Berta, M., Koelewijn, I., Öhgren, C., & Stading, M. (2019). Effect of zein protein and hydroxypropyl methylcellulose on the texture of model gluten-free bread. *Journal of Texture Studies*, 50(4), 341–349. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12394>
- Bertoncelj, J., Polak, T., Pucihar, T., Lilek, N., Kandolf Borovšak, A., & Korošec, M. (2018). Carbohydrate composition of Slovenian bee pollens. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(8), 1880–1888. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13773>
- 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. <https://doi.org/10.1017/S0007114509301579>
- Blandino M., Sovrani V., Marinaccio F., Reyneri A., Rolle L., Giacosa S., Locatelli M., Bordiga M., Travaglia F., Coïsson J.D., Arlorio M. (2013). Nutritional and technological quality of bread enriched with an intermediated pearled wheat fraction. *Food Chemistry*, 141, 2549–2557.
- Bogdanov, S. (2011). The Bee Pollen Book. The Pollen Book, 1–13. Retrieved from <https://www.bee-hexagon.net>
- Bogdanov, S. (2017). Pollen: Nutrition, Functional Properties, Health. 1–31. Retrieved from <https://www.bee-hexagon.net>
- Brajon, G., Marconi, P., Corrias, F., Ragona, G., Smaldone R. M., Guazzini, L., Spagnul, S., Paladini, I., Piazza, A., Formato, G., Pietropaoli, M., Milito, M., Pizzariello, M., Cavallina, R., Campagna, M. C., Fischetti, R. (2014) Innovazione nelle tecniche di
- Roberto Arca, “Potenzialità di utilizzo dei prodotti derivati da risorse non convenzionali nelle formulazioni di pane senza glutine” - Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie  
- Curriculum “Produttività delle Piante coltivate” - Ciclo “XXXIII” Università degli Studi di Sassari  
Anno Accademico 2018 - 2021

raccolta e lavorazione del polline. Nell'ambito del Progetto misura 124 PSR 2007-2013 della Regione Toscana.

Brasil ministério da saúde agência nacional de vigilância sanitária legislação visalegis (2001) Instrução normativa n.3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis.

Briani, C., Samaroo, D., & Alaedini, A. (2008). Celiac disease: From gluten to autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, Vol. 7, pp. 644–650. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.05.006>

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. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0108-4>

Bulgarian standard 2567111-91

Cabras, P., & Martelli A. (2004) Chimica degli alimenti. *Piccin Nuova Libreria s.p.a*, Padova.

Calabrò A., Catassi C., De Vitis I., Lionetti P., Martellosi S., Picarelli A., Troncone R., Volta, U. (2008). Linee guida per la diagnosi ed il follow-up della celiachia. *Associazione Italiana Celiachia*, Genova.

Camarda I., & Valsecchi F., (2008). Alberi e arbusti spontanei della Sardegna. C. Delfino ed.1, Sassari.

Campos, M. G.R, Frigerio, C., Lopes, J., & Bogdanov, S. (2010). What is the future of Bee-Pollen? *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 2(4), 131–144. <https://doi.org/10.3896/ibra.4.02.4.01>

Campos, M.G.R., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., & Ferreira, F. (2008). Pollen composition and standardization of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, 47(2), 154–161. <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101443>

- Cappai, M. G., Alesso, G. A., Nieddu, G., Sanna, M., & Pinna, W. (2013). Electron microscopy and composition of raw acorn starch in relation to in vivo starch digestibility. *Food and Function*, 4(6), 917–922. <https://doi.org/10.1039/c3fo60075k>
- Cappelli, A., Oliva, N., & Cini, E. (2020). A Systematic Review of Gluten-Free Dough and Bread: Dough Rheology, Bread Characteristics, and Improvement Strategies. *Applied Sciences*, 10, 6559. <https://doi.org/10.3390/app10186559>
- Capriles, V. D., & Arêas, J. A. G. (2014). Novel approaches in gluten-free breadmaking: Interface between food science, nutrition, and health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 871–890. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12091>
- Carpes, S. T., Mourão, G. B., De Alencar, S. M., & Masson, M. L. (2009). Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee-pollen from Southern Brazil. *Brazilian Journal of Food Technology*, 12, 220–229.
- Catassi, C., & Fasano, A. (2008). Celiac disease. In *Gluten-Free Cereal Products and Beverages* (pp. 1–27). <https://doi.org/10.1016/B978-012373739-7.50003-4>
- 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. *Food Science and Technology International*, 21(7), 523–536. <https://doi.org/10.1177/1082013214552862>
- Collar, C., Jiménez, T., Conte, P., & Fadda, C. (2014). Impact of ancient cereals, pseudocereals and legumes on starch hydrolysis and antiradical activity of technologically viable blended breads. *Carbohydrate Polymers*, 113, 149–158. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.07.020>
- Conte, P. (2015) Creating value-added cereal-based baked products: marketplace offer, laboratory-designed goods, and revisited local products. Tesi di dottorato in “Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari” - Indirizzo “Biotecnologie Microbiche Agroalimentari” Università degli Studi di Sassari.
- Conte, P., Del Caro, A., Balestra, F., Piga, A., & Fadda, C. (2018). Bee pollen as a functional ingredient in gluten-free bread: A physical-chemical, technological and
- Roberto Arca, “Potenzialità di utilizzo dei prodotti derivati da risorse non convenzionali nelle formulazioni di pane senza glutine” - Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie  
- Curriculum “Produttività delle Piante coltivate” - Ciclo “XXXIII” Università degli Studi di Sassari  
Anno Accademico 2018 - 2021

- sensory approach. *LWT - Food Science and Technology*, 90, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.002>
- Conte, P., Del Caro, A., Urgeghe, P. P., Petretto, G. L., Montanari, L., Piga, A., & Fadda, C. (2019). Nutritional and aroma improvement of gluten-free bread: is bee pollen effective? *LWT-Food Science and Technology*, 118, 108711. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108711>
- Conte, P., Fadda, C., Drabińska, N., & Krupa-Kozak, U. (2019). Technological and nutritional challenges, and novelty in gluten-free breadmaking: A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 69(1), 5–21. <https://doi.org/10.31883/pjfn-2019-0005>
- Contessi, A. (2018). *Le api: biologia, allevamento, prodotti*. Bologna: Edagricole.
- 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. <https://doi.org/10.1007/S13197-015-1720-8>
- Cornicelli, M., Saba, M., Machello, N., Silano, M., & Neuhold, S. (2018). Nutritional composition of gluten-free food versus regular food sold in the Italian market. *Digestive and Liver Disease*, 50(12), 1305–1308. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.04.028>
- Correia, P. R., Leitão, A. E., & Beirão-Da-Costa, M. L. (2009). Effect of drying temperatures on chemical and morphological properties of acorn flours. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(9), 1729–1736. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01988.x>
- Correia, P. R., Nunes, M. C., & Beirão-da-Costa, M. L. (2013). The effect of starch isolation method on physical and functional properties of Portuguese nut starches. II. *Q. rotundifolia* Lam. and *Q. suber* Lam. acorns starches. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 448–455. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.06.014>
- Custodio, L., Patarra, J., Alber'icio, F.N., N.R., Nogueira J.M.F., Romano, A. (2013). Extracts from *Quercus* sp. acorns exhibit in vitro neuroprotective features through inhibition of cholinesterase and protection of the human dopaminergic cell line SH-SY5Y from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Ind Crop Prod*. 45, 114–20.



- De Angelis M., Di Cagno R. (2010). I prodotti lievitati da forno senza glutine. In: Gobbetti M., Corsetti A. *Biotecnologia dei prodotti lievitati da forno*, 1th ed. (pp. 317-331) Ambrosiana, Milano, Italia
- De la Hera, E., Martinez, M., & Gómez, M. (2013). Influence of flour particle size on quality of gluten-free rice bread. *LWT - Food Science and Technology*, 54(1), 199–206. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2013.04.019>
- De Melo, I. L. P., Freitas, A. S., Barth, O. M., & Almeida-Muradian, L. B. (2009). Correlation between nutritional composition and floral origin of dried bee pollen. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 68, 346–353.
- De-Melo, A. A. M., Estevinho, L. M., Moreira, M. M., Delerue-Matos, C., Freitas, A. da S. de, Barth, O. M., & Almeida-Muradian, L. B. de. (2018). A multivariate approach based on physicochemical parameters and biological potential for the botanical and geographical discrimination of Brazilian bee pollen. *Food Bioscience*, 25, 91–110. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.08.001>
- De-Melo, A. A. M., Estevinho, M. L. M. F., Sattler, J. A. G., Souza, B. R., Freitas, A. da S., Barth, O. M., & Almeida-Muradian, L. B. (2016). Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 808–815. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.014>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2010.07.017>
- Domínguez-Valhondo, D., Bohoyo Gil, D., Hernández, M. T., & González-Gómez, D. (2011). Influence of the commercial processing and floral origin on bioactive and nutritional properties of honeybee-collected pollen. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(10), 2204–2211. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02738.x>
- El Khoury, D., Balfour-Ducharme, S., & Joye, I.J. (2018). A review on the gluten-free diet: Technological and nutritional challenges. *Nutrients*, 10(10), 1–25. <https://doi.org/10.3390/nu10101410>
- Roberto Arca, “Potenzialità di utilizzo dei prodotti derivati da risorse non convenzionali nelle formulazioni di pane senza glutine” - Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie  
- Curriculum “Produttività delle Piante coltivate” - Ciclo “XXXIII” Università degli Studi di Sassari  
Anno Accademico 2018 - 2021

- El-Khoury, D., Balfour-Ducharme, S., & Joye, I. J. (2018). A Review on the Gluten-Free Diet: Technological and Nutritional Challenges. *Nutrients*, 10, 1410  
<https://doi:10.3390/nu10101410>
- EpiCentro - Istituto Superiore di Sanità - Viale Regina Elena 299, 00161 – Roma  
<https://www.epicentro.iss.it/celiachia/>
- European Commission. (2014). Commission implementing regulation (EU) No 828/2014 of 30 July 2014. *Official Journal of the European Union*
- European Parliament Regulation (EU) No 609/2013 of the European Parliament and of the Council on food intended for infants and young children, food for special medical purposes, and total diet replacement for weight control. *Official Journal of the European Union*. 2012, 35–56
- European Parliament Regulation (EU), Testi Approvati. (2018) 0057. Prospettive e sfide per il settore dell'apicoltura dell'UE. Bruxelles
- FAO (2013). FAO (2013) FAO statistical yearbook world food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations)
- Farnham, D. E., Benson, G. O., and Pearce, R. B. (2003). Corn perspective and culture. In: White, P. J. and Johnson, L. A. eds. *Corn Chemistry and Technology*, 2nd edn. St. Paul, MN: *American Association of Cereal Chemists*, pp. 1–34
- 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.  
<https://doi.org/10.1053/gast.2001.22123>
- Fernández-Rivas, M. & Ballmer-Weber, B. (2007). Food allergy: current diagnosis and management. In: Mills, C., Wichers, H., and Hoffmann-Sommergruber, K. eds. *Managing Allergens in Food*. Woodhead Publish, *Food Science Technology*. Nutr. 1, 3–28.
- Fontana, P. (2017). Il piacere delle api. Le api come modello di sostenibilità e l'apicoltura come esperienza della natura e della storia dell'uomo. WBA project.
- Roberto Arca, “Potenzialità di utilizzo dei prodotti derivati da risorse non convenzionali nelle formulazioni di pane senza glutine” - Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie  
- Curriculum “Produttività delle Piante coltivate” - Ciclo “XXXIII” Università degli Studi di Sassari  
Anno Accademico 2018 - 2021

- Gabriele, M., Parri, E., Felicioli, A., Sagona, S., Pozzo, L., Biondi, C., Pucci, L. (2015). Phytochemical composition and antioxidant activity of Tuscan bee pollen of different botanic origins. *Italian Journal of Food Science*, 27(2), 120–131. <https://doi.org/10.14674/1120-1770/ijfs.v191>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0818-9>
- Gomez, M., L. & S. Sciarini. (2015). Gluten-free bakery products and pasta. In *Advances in the understanding of gluten related pathology and the evolution of gluten-free foods*, eds. E. Arranz, F. Fernandez- Banares, C. M. Rosell, L. Rodrigo, and A. S. Pena, 565–604. Madrid: *Omnia Science*. <https://doi.org/10.3926/oms.265>
- González, G., Hinojo, M. J., Mateo, R., Medina, A., & Jiménez, M. (2005). Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *International journal of food microbiology*, 105(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.001>
- Grüter, C., & Ratnieks, F. L. W. (2011). Flower constancy in insect pollinators: Adaptive foraging behavior or cognitive limitation? *Communicative and Integrative Biology*, Vol. 4, pp. 633–636. <https://doi.org/10.4161/cib.16972>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1763-2>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1763-2>

- Haines, M. L., Anderson, R. P., & Gibson, P. R. (2008). Systematic review: The evidence base for long-term management of coeliac disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 28, 1042–1066. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2008.03820.x>
- Hall, N. J., Rubin, G., & Charnock, A. (2009). Systematic review: adherence to a gluten-free diet in adult patients with coeliac disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 30(4), 315–330. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2009.04053.x>
- Hausch, F., Shan, L., Santiago, N. A., Gray, G. M., & Khosla, C. (2002). Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 283(4), 46-4. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00136.2002>
- 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, 195–208. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1720-0>
- Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I. R., Mearin, M. L., Phillips, A., Shamir, R., Zimmer, K. P. (2012). European society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 54(1), 136–160. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31821a23d0>
- Isik, A., Ozdemir, M., & Doymaz, I. (2019). Effect of hot air drying on quality characteristics and physicochemical properties of bee pollen. *Food Science and Technology*, 39(1), 224–231. <https://doi.org/10.1590/fst.02818>
- Jamnadass RH, Dawson IK, Franzel S, Leakey RRB, Mithofer D, Akinnifesi FK, Tchoundjeu Z. (2011). Improving livelihoods and nutrition in sub-Saharan Africa through the promotion of indigenous and exotic fruit production in smallholders' agroforestry systems: a review. *International Forestry Review*, 13, 338–54 <https://doi.org/10.1505/146554811798293836>
- Jenkins DJ, Wolever TM, Taylor R.H., Baker, 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 carbohydrates exchange. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34(3), 362–6

- Kadan, R. S., Robinson, M. G., Thibodeaux, D. P., & Pepperman, A. B. (2001). Texture and other physicochemical properties of whole rice bread. *Journal of Food Science*, 66(7), 940–944. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb08216.x>
- Kagnoff, M. F. (2005). Overview and pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology*, 128 (41), S10–S18. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.02.008>
- Karabagias, I. K., Karabagias, V. K., Gatzias, I., & Riganakos, K. A. (2018). Bio-functional properties of bee pollen: The case of “bee pollen yoghurt.” *Coatings*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/coatings8120423>
- Kaushal, P., Kumar, V., & Sharma, H. K. (2012). Comparative study of physicochemical, functional, antinutritional and pasting properties of taro (*Colocasia esculenta*), rice (*Oryza sativa*) flour, pigeonpea (*Cajanus cajan*) flour and their blends. *LWT - Food Science and Technology*, 48(1), 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.02.028>
- Keller, I., Fluri, P., & Imdorf, A. (2005). Pollen nutrition and colony development in honey bees: Part I. *Bee World*, Vol. 86, pp. 3–10. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2005.11099641>
- Khider, M., Elbanna, K., Mahmoud, A., & Owayss, A. A. (2013). Egyptian honeybee pollen as antimicrobial, antioxidant agents, and dietary food supplements. *Food Science and Biotechnology*, 22(5), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0238-y>
- Kieliszek, M., Piwowarek, K., Kot, A. M., Błażejczak, S., & Chlebowska-Śmigiel, A. (2018). Beekeeping - Apiculture - Pollen and bee bread as new health-oriented products. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 170–180 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.021>
- Kohajdová, Z., & Karovičová, J. (2009). Application of hydrocolloids as baking improvers. *Chemical Papers*, Vol. 63, pp. 26–38. <https://doi.org/10.2478/s11696-008-0085-0>
- Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., & Olczyk, K. (2015). Bee pollen: Chemical composition and therapeutic application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2015/297425>
- Korus, A., Gumul, D., Krystyjan, M., Juszczak, L., & Korus, J. (2017). Evaluation of the quality, nutritional value and antioxidant activity of gluten-free biscuits made from
- Roberto Arca, “Potenzialità di utilizzo dei prodotti derivati da risorse non convenzionali nelle formulazioni di pane senza glutine” - Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie  
- Curriculum “Produttività delle Piante coltivate” - Ciclo “XXXIII” Università degli Studi di Sassari  
Anno Accademico 2018 - 2021

- corn-acorn flour or corn-hemp flour composites. *European Food Research and Technology*, 243(8), 1429–1438. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2853-y>
- Korus, J., Witzczak, M., Ziobro, R., & Juszczak, L. (2017). Hemp (*Cannabis sativa* subsp. *sativa*) flour and protein preparation as natural nutrients and structure forming agents in starch-based gluten-free bread. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.046>
- Kosová, K., Leišová-Svobodová, L., & Dvořáček, V. (2020). Oats as a Safe Alternative to Triticeae Cereals for People Suffering from Celiac Disease? A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(2), 131–141. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00800-8>
- Kostić, A. T., Barać, M. B., Stanojević, S. P., Milojković-Opsenica, D. M., Tešić, Ž. L., Šikoparija, B., Pešić, M. B. (2015). Physicochemical composition and techno-functional properties of bee pollen collected in Serbia. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.031>
- Kostić, A., Milinčić, D. D., Barać, M. B., Shariati, M. A., Tešić, Ž. L., & Pešić, M. B. (2020). The application of pollen as a functional food and feed ingredient the present and perspectives. *Biomolecules*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/biom10010084>
- Krell, R. (1996). Value-added products from beekeeping. *Fao Agricultural Services Bulletin No. 124*. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.
- Krupa-Kozak, U., Baczek, N., & Rosell, C. M. (2013). Application of dairy proteins as technological and nutritional improvers of calcium-supplemented gluten-free bread. *Nutrients*, 5(11), 4503–4520. <https://doi.org/10.3390/nu5114503>
- Krupa-Kozak, U., Wronkowsk, M., & Soral-Śmietana, M. (2011). Effect of Buckwheat Flour on Microelements and Proteins. *Czech J. Food Sci.* Vol, 29(2), 103–108. <https://doi.org/10.17221/136/2010-CJFS>
- Krystijan, M., Gumul, D., Ziobro, R., & Korus, A. (2015). The fortification of biscuits with bee pollen and its effect on physicochemical and antioxidant properties in biscuits. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 640–646. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.075>
- Legge 24 dicembre 2004, n. 313. Disciplina dell'apicoltura. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana*. Roma
- Roberto Arca, “Potenzialità di utilizzo dei prodotti derivati da risorse non convenzionali nelle formulazioni di pane senza glutine” - Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie  
- Curriculum “Produttività delle Piante coltivate” - Ciclo “XXXIII” Università degli Studi di Sassari  
Anno Accademico 2018 - 2021



- Leja, M., Mareczek, A., Wyzgolik, G., Klepacz-Baniak, J., & Czekońska, K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*, 100(1), 237–240. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.047>
- Lerner, A. (2010). New therapeutic strategies for celiac disease. *Autoimmunity Reviews*, 9(3), 144–147. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.05.002>
- Łuczaj, Ł., Adamczak, A., & Duda, M. (2014). Tannin content in acorns (*Quercus* spp.) from Poland. *Dendrobiology*, 72, 103–111. <http://dx.doi.org/10.12657/denbio.072.009>
- Machado Alencar, N.M., Steel, C.J., Alvim, I.D., de Moraes, E.C., Andre Bolini, H.M. (2015). Addition of quinoa and amaranth flour in gluten-free breads: Temporal profile and instrumental analysis. *LWT – Food Science and Technology*, 62(2), 1011–1018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.029>
- Mancebo, C. M., Merino, C., Martinez, M. M., & Gomez, M. (2015). Mixture design of rice flour, maize starch and wheat starch for optimization of gluten free bread quality. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 6323–6333. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1769-4>
- Martinez, M. M., & Gomez, M. (2017). Rheological and microstructural evolution of the most common gluten-free flours and starches during bread fermentation and baking. *Journal of Food Engineering*, 197, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.11.008>
- Martínez, M. M., Díaz, Á., & Gómez, M. (2014). Effect of different microstructural features of soluble and insoluble fibres on gluten-free dough rheology and bread-making. *Journal of Food Engineering*, 142, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.06.020>
- Martins, R. Beltrão, Nunes, M. C., Ferreira, L. M. M., Peres, J. A., Barros, A. I. R. N. A., & Raymundo, A. (2020). Impact of acorn flour on gluten-free dough rheology properties. *Foods*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/foods9050560>
- Martins, Rita Beltrão, Gouvinhas, I., Nunes, M. C., Peres, J. A., Raymundo, A., & Barros, A. I. R. N. A. (2020). Acorn flour as a source of bioactive compounds in gluten-free bread. *Molecules*, 25(16), 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules25163568>
- Roberto Arca, “Potenzialità di utilizzo dei prodotti derivati da risorse non convenzionali nelle formulazioni di pane senza glutine” - Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie  
- Curriculum “Produttività delle Piante coltivate” - Ciclo “XXXIII” Università degli Studi di Sassari  
Anno Accademico 2018 - 2021

- Masure, H. G., Fierens, E., & Delcour, J. A. (2016). Current and forward looking experimental approaches in gluten-free bread making research. *Journal of Cereal Science*, 67, 92–111. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.09.009>
- Matos S. M. E., & Rosell, C. M. (2011). Chemical Composition and Starch Digestibility of Different Gluten-free Breads. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(3), 224–230. <https://doi.org/10.1007/s11130-011-0244-2>
- Ministero della Salute, Roma. (2015). Celiachia Relazione annuale al Parlamento anno 2014.
- Ministero della Salute, Roma. (2019). Celiachia Relazione annuale al Parlamento anno 2018.
- Mir, S. A., Shah, M. A., Naik, H. R., & Zargar, I. A. (2016). Influence of hydrocolloids on dough handling and technological properties of gluten-free breads. *Trends in Food Science and Technology*, 51, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.005>
- Molavi, H., Razavi, S. M. A., & Farhoosh, R. (2018). Impact of hydrothermal modifications on the physicochemical, morphology, crystallinity, pasting and thermal properties of acorn starch. *Food Chemistry*, 245 (2017), 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.117>
- Naqash, F., Gani, A., Gani, A., & Masoodi, F. A. (2017). Gluten-free baking: Combating the challenges - A review. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 66, pp. 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.004>
- Neumann, H.; Brümmer, J. M. (1997): Investigations with the production of gluten-free bread and roll specialities. *Getreide, Mehl und Brot* (1972), 51, 50-55. Deutscher Bäcker
- Nissen, L., Samaei, S.P., Babini, E., & Gianotti, A. (2020). Gluten free sourdough bread enriched with Cricket flour for protein fortification: Antioxidant improvement and Volatilome characterization, *Food Chemistry* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127410>
- Nogueira, C., Iglesias, A., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2012). Commercial bee pollen with different geographical origins: A comprehensive approach. *International*
- Roberto Arca, “Potenzialità di utilizzo dei prodotti derivati da risorse non convenzionali nelle formulazioni di pane senza glutine” - Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie  
- Curriculum “Produttività delle Piante coltivate” - Ciclo “XXXIII” Università degli Studi di Sassari  
Anno Accademico 2018 - 2021



*Journal of Molecular Sciences*, 13(9), 11173–11187.  
<https://doi.org/10.3390/ijms130911173>

- Onyango, C., Mutungi, C., Unbehend, G., & Lindhauer, M. (2009). Creep-recovery parameters of gluten-free batter and crumb properties of bread prepared from pregelatinised cassava starch, sorghum and selected proteins. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2493-2499. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02048.x>
- Onyango, C., Mutungi, C., Unbehend, G., & Lindhauer, M. G. (2011a). Modification of gluten-free sorghum batter and bread using maize, potato, cassava or rice starch. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 681–686. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.09.006>
- Onyango, C., Mutungi, C., Unbehend, G., Lindhauer, M.G. (2011b). Rheological and textural properties of sorghum-base formulations modified with variable amounts of native or pre- gelatinised cassava starch. *LWT – Food Science and Technology*, 44(3), 687–693 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.08.019>
- Palmeri, P. (2007). La tradizione e l’uso del pane nel Mediterraneo. Spunti per un’indagine antropologica. In (Narrare i gruppi. Prospettive cliniche e sociali). II, Vol. II
- Parsaei, M., Goli, M., & Abbasi, H. (2018). Oak flour as a replacement of wheat and corn flour to improve biscuit antioxidant activity. *Food Science and Nutrition*, 6(2), 253–258. <https://doi.org/10.1002/fsn3.524>
- Pellegrini, N., & Agostoni, C. (2015). Nutritional aspects of gluten-free products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(12), 2380–2385. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7101>
- Perfetti, V., Baldanti, F., Lenti, M. V., Vanoli, A., Biagi, F., Gatti, M., Corazza, G. R. (2016). Detection of Active Epstein–Barr Virus Infection in Duodenal Mucosa of Patients With Refractory Celiac Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 14(8), 1216–1220. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.03.022>
- Pinna, C. (2013). Acorn bread: A traditional food of the past in Sardinia (Italy). *Journal of Cultural Heritage*, 14, S71–S74. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2012.11.012>

- Polimac, M., & Komlenić, D. K. (2015). Acorn flour naturally gluten free. Proceedings of the 8th International Congress Flour-Bread'15, 10th Croatian Congress of Cereal Technologists (177–181). Croatia
- Polish legislation for bee-pollen. PN-R-78893 “Obnóza pyłkowe”
- Powell, B., Hall, J., & Johns, T. (2011). Forest cover, use and dietary intake in the East Usambara Mountains, Tanzania. *The International Forestry Review*, 13(3), 305–317. <http://www.jstor.org/stable/24310708>
- Ranieri, A., Benelli, G., Castagna, A., Sgherri, C., Signorini, F., Bientinesi, M., Canale, A. (2019). Freeze-drying duration influences the amino acid and rutin content in honeybee-collected chestnut pollen. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(2), 252–255. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.08.011>
- 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, 1969-1974. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1915>
- Ricciarelli D’Albore, G., & Intoppa, F. (2000). La flora visitata dalle api e dagli altri Apoidei in Europa. Calderoni Edagricole. 253 pp
- Roman, L., Belorio, M., & Gomez, M. (2019). Gluten-Free Breads: The Gap Between Research and Commercial Reality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(3), 690–702. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12437>
- Roman, L., Gomez, M., & Martinez, M. M. (2021). Mesoscale structuring of gluten-free bread with starch. *Current Opinion in Food Science*, 38, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.003>
- Romão, B., Botelho, R. B. A., Alencar, E. R., da Silva, V. S. N., Pacheco, M. T. B., & Zandonadi, R. P. (2020). Chemical composition and glycemic index of gluten-free bread commercialized in Brazil. *Nutrients*, 12(8), 1–12. <https://doi.org/10.3390/nu12082234>
- Roubik, D. W. (2018). The pollination of cultivated plants a compendium for practitioners’ volume 1. Food and agriculture organization of the united nations. Rome. Retrieved from <https://www.fao.org/>
- Roberto Arca, “Potenzialità di utilizzo dei prodotti derivati da risorse non convenzionali nelle formulazioni di pane senza glutine” - Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie  
- Curriculum “Produttività delle Piante coltivate” - Ciclo “XXXIII” Università degli Studi di Sassari  
Anno Accademico 2018 - 2021

- Roulston, T. H., & Cane, J. H. (2000). Plant Systematics and Evolution Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution* 222,187–209. <https://doi.org/10.1007/BF00984102>
- Šálková, T., Divišová, M., Kadochová, Š., Delawská, K., Kadlčková, E., Němečková, L., Žemličková, A. (2011). Acorns as a food resource. An experiment with acorn preparation. *Interdisciplinaria Archaeologica Natural Sciences in Archeology*, 2(2), 133–141.
- Sanchez, H. D., Osella, C. A., & De la Torre, M. A. (2002). Optimization of gluten-free bread prepared from cornstarch, rice flour, and cassava starch. *Journal of Food Science*, 67(1), 416–419. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2002.TB11420.X>
- Sarkar, A., & Dickinson, E. (2020). Sustainable food-grade Pickering emulsions stabilized by plant-based particles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 49, 69–81. <https://doi.org/10.1016/J.COCIS.2020.04.004>
- Scanu, A. (2016). 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.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., & Hardy, J. (1998). Structure and techno-functional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 38, pp. 689–753. <https://doi.org/10.1080/10408699891274354>
- Schober T.J., & Bean S.R. (2008). Sorghum and maize. In: Arendt E.K., Dal Bello F. (Eds.), *Gluten-free cereal products and beverages* first edition. Elsevier/Academic Press, London, UK, pp. 101-119
- Schoenlechner, R. (2016). Properties of pseudocereals, selected specialty cereals and legumes for food processing with special attention to gluten-free products. *Bodenkultur*, 67(4), 239–248. <https://doi.org/10.1515/boku-2016-0019>
- Selmo, M. S. & Salas-Mellado. M. M. (2014). Technological quality of bread from rice flour with Spirulina. *International Food Research Journal*, 21(4),1523-1528
- Roberto Arca, “Potenzialità di utilizzo dei prodotti derivati da risorse non convenzionali nelle formulazioni di pane senza glutine” - Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie  
- Curriculum “Produttività delle Piante coltivate” - Ciclo “XXXIII” Università degli Studi di Sassari  
Anno Accademico 2018 - 2021

- Shewry, P. R., Tatham, A. S., Forde, J., Kreis, M., & Mifflin, B. J. (1986). The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. *Journal of Cereal Science*, 4(2), 97–106. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(86\)80012-1](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(86)80012-1)
- Silva, S., Costa, E. M., Borges, A., Carvalho, A. P., Monteiro, M. J., & Pintado, M. M. E. (2016). Nutritional characterization of acorn flour (a traditional component of the Mediterranean gastronomic folklore). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10(3), 584–588. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9340-1>
- Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Sodhi, N. S., & Gill, B. S. (2003). Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*, Vol. 81, pp. 219–231. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00416-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00416-8)
- Singh, P., Arora, A., Strand, T. A., Leffler, D. A., Catassi, C., Green, P. H., Makharia, G. K. (2018). Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 16(6), 823-836. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2017.06.037>
- Skendi, A., Mouselimidou, P., Papageorgiou, M., & Papastergiadis, E. (2018). Effect of acorn meal-water combinations on technological properties and fine structure of gluten-free bread. *Food Chemistry*, 253, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.144>
- Sko, E., Anatuinen, K. J., Empainen, A. A. K., Eli -M Atti, V., Osma, K., Itva, R., Ulkunen, J. K. J. (1995). A comparison of diets with and without oats in adults with celiac disease (Vol. 333).
- 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*, 77(6), C684–C689. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02739.x>
- Smith, P. R., & Johansson, J. (2005). Influences of the proportion of solid fat in a shortening on loaf volume and staling of bread. *Journal of Food Processing and Preservation*, 28(5), 359–367. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2004.23079.x>
- Stanley, R. G., & Linskens, H. F. (1974). Pollen. In Pollen. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-65905-8>

- Stepniak, D., & Koning, F. (2006). Celiac Disease-Sandwiched between Innate and Adaptive Immunity. *Human Immunology*, 67, 460–468  
<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.03.011>
- Stoop, W. (1993). Pioneer in the gluten free diet: Willem-Karel Dicke 1905-1962, over 50years of gluten free diet. *Gut*. 34, 1473–1475.
- Suárez-Cervera, M., Vega-Maray, A., Castells, T., Rodríguez-Rajo, F. J., Asturias, J. A., Le Thomas, A., & Seoane-Camba, J. A. (2008). An approach to the knowledge of pollen and allergen diversity through lipid transfer protein localisation in taxonomically distant pollen grains. *Grana*, 47(4), 272–284.  
<https://doi.org/10.1080/00173130802513776>
- Sung, S. H., Kim, K. H., Jeon, B. T., Cheong, S. H., Park, J. H., Kim, D. H., Kweon, H. J., Moon, S. H. (2012). Antibacterial and antioxidant activities of tannins extracted from agricultural by-products. *J Med Plants Res*, 6, 3072–9
- Szabłowska, E., & Tańska, M. (2020). Acorn flour properties depending on the production method and laboratory baking test results: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 980–1008. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12683>
- Tadayoni, M., Sheikh-Zeinoddin, M., & Soleimanian-Zad, S. (2015). Isolation of bioactive polysaccharide from acorn and evaluation of its functional properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 179–184.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.015>
- Tautz, J. (2009). L'animale domestico piú piccolo al mondo: Una guida illustrata.  
[https://doi.org/10.1007/978-88-470-0861-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-88-470-0861-8_2)
- Taylor, J. R. N., Schober, T. J., & Bean, S. R. (2006). Novel food and non-food uses for sorghum and millets. *Journal of Cereal Science*, 44(3), 252–271.  
<https://doi.org/10.1016/J.JCS.2006.06.009>
- Thakur, M., & Nanda, V. (2020a). Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 98, 82–106.  
<https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.02.001>

- Thakur, M., & Nanda, V. (2020b). Exploring the physical, functional, thermal, and textural properties of bee pollen from different botanical origins of India. *Journal of Food Process Engineering*, 43(1), e12935. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12935>
- Tolić, M. T., Krbavčić, I. P., Vujević, P., Milinović, B., Jurčević, I. L., & Vahčić, N. (2017). Effects of Weather Conditions on Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Juice of Chokeberries (*Aronia melanocarpa* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 67(1), 67–74. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2016-0009>
- Tontisirin, K., Nantel, G., & Bhattacharjee, L. (2002). Food-based strategies to meet the challenges of micronutrient malnutrition in the developing world. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 61(2), 243–250. <https://doi.org/10.1079/PNS2002155>
- Toori, M. A., Mirzaei, M., Mirzaei, N., Lamrood, P., Mirzaei, A. (2013). Antioxidant and hepatoprotective effects of the internal layer of oak fruit (Jaft). *J Med Plants Res*, 7:24–8.
- Torbica, A., Hadnadev, M., & Dapčević, T. (2010). Rheological, textural and sensory properties of gluten-free bread formulations based on rice and buckwheat flour. *Food Hydrocolloids*, 24(6–7), 626–632. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.03.004>
- Trier, J. S. (1991). Celiac Sprue. *New England Journal of Medicine*, 325(24), 1709–1719. <https://doi.org/10.1056/NEJM199112123252406>
- Turhan, S., Yazici, F., Saricaoglu, T., Mortas, M., & Gencelep, H. (2014). Evaluation of the nutritional and storage quality of meatballs formulated with bee pollen. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 34(4), 423–433. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2014.34.4.423>
- Uțoiu, E., Matei, F., Toma, A., Diguță, C. F., Ștefan, L. M., Mănoiu, S., Oancea, F. (2018). Bee collected pollen with enhanced health benefits, produced by fermentation with a Kombucha Consortium. *Nutrients*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/nu10101365>
- Vici, G., Belli, L., Biondi, M., & Polzonetti, V. (2016). Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clinical Nutrition*, 35(6), 1236–1241. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.05.002>

- Vinceti, B., Termote, C., Ickowitz, A., Powel, B., Kehlenbeck, K., Hunter, D. (2013). The contribution of forests and trees to sustainable diets. *Sustainability* 5, 4797–824 <https://doi.org/10.3390/su5114797>
- Vinha, A. F., Barreira, J. C. M., Costa, A. S. G., & Oliveira, M. B. P. P. (2016). A New Age for *Quercus* spp. Fruits: Review on Nutritional and Phytochemical Composition and Related Biological Activities of Acorns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 947–981. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12220>
- Volta U., Silano, M. (2014). È arrivato il momento di aggiornare le Linee Guida. AIC, *Celiachia Notizie*, Num. 2, 2014.
- Wang, S., & Copeland, L. (2013). Molecular disassembly of starch granules during gelatinization and its effect on starch digestibility: A review. *Food and Function*, Vol. 4, pp. 1564–1580. <https://doi.org/10.1039/c3fo60258c>
- Wang, S., Li, C., Copeland, L., Niu, Q., & Wang, S. (2015). Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol.14. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12143>
- Wheeler, W. (1910). Ants: their structure, development and behavior. Retrieved from <https://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=bac.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=037866>
- Wieser, H., & Koehler, P. (2008). The biochemical basis of celiac disease. *Cereal Chemistry*, 85(1), 1–13. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-85-1-0001>
- Wild, D., Robins, G. G., Burley, V. J., & Howdle, P. D. (2010). Evidence of high sugar intake, and low fibre and mineral intake, in the gluten-free diet. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 32(4), 573–581. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2036.2010.04386.X>
- Witczak, M., Ziobro, R., Juszczak, L., & Korus, J. (2016). Starch and starch derivatives in gluten-free systems - A review. *Journal of Cereal Science*, 67, 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.07.007>
- World Gastroenterology Organisation Diagnosis of celiac disease. Available at: <http://www.worldgastroenterology.org/publications/e-wgn/e-wgn-expert-point-of-view-articles-collection/diagnosis-of-celiac-disease>



- Wu, T., Wang, L., Li, Y., Qian, H., Liu, L., Tong, L., Zhou, S. (2019). Effect of milling methods on the properties of rice flour and gluten-free rice bread. *LWT - Food Science and Technology*, (108), 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.050>
- Yang, K., Wu, D., Ye, X., Liu, D., Chen, J., & Sun, P. (2013). Characterization of chemical composition of bee pollen in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(3), 708–718. <https://doi.org/10.1021/jf304056b>
- Zarroug, Y., Boulares, M., Mejri, J., Slimi, B., Hamdaoui, G., Djebi, S., ... Kharrat, M. (2020). Extraction and Characterization of Tunisian Quercus ilex Starch and Its Effect on Fermented Dairy Product Quality. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8868673>
- Zelnik, N., Pacht, A., Obeid, R., & Lerner, A. (2004). Range of neurologic disorders in patients with celiac disease. *Pediatrics*, 113(6 I), 1672–1676. <https://doi.org/10.1542/peds.113.6.1672>
- Zhang, Z., Saleh, A. S. M., Wu, H., Gou, M., Liu, Y., Jing, L., Li, W. (2019). Effect of Starch Isolation Method on Structural and Physicochemical Properties of Acorn Kernel Starch. *Starch/Staerke*, 1900122, 1–10. <https://doi.org/10.1002/star.201900122>
- 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 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.01.009>
- Zuluaga-Dominguez, C. M., & Quicazan, M. (2019). Effect of Fermentation on Structural Characteristics and Bioactive Compounds of Bee-Pollen based Food. *Journal of Apicultural Science*, 63(2), 1–14. <https://doi.org/10.2478/jas-2019-0016>



## CAPITOLO 2. OBIETTIVI DELLA RICERCA

Il pane è tradizionalmente prodotto a partire dalla farina di frumento (Blandino et al., 2013). L'elevato consumo di pane a livello mondiale è dovuto alla facile reperibilità delle materie prime, alla facilità di lavorazione per l'ottenimento del prodotto, al basso costo delle materie prime, associato ad un equilibrato profilo nutrizionale. L'eliminazione del glutine per la produzione dei GFBs determina notevoli difficoltà durante il processo di panificazione e ha richiesto nel corso degli anni una approfondita ricerca scientifica per ovviare i difetti tecnologici, nutrizionali e sensoriali (per esempio, basso volume specifico, colore della crosta e della mollica troppo chiaro, caratteristiche della mollica che la rendono coesa e dura e carenze nutrizionali come basso contenuto di proteine, di vitamine, microelementi e acido folico). Considerando il crescente interesse dei consumatori verso la produzione di alimenti a basso impatto ambientale e la richiesta di ingredienti naturali con funzioni benefiche per la salute, questo progetto di ricerca ha valutato l'introduzione di due risorse innovative nella produzione di GFBs: il polline d'api e la farina di ghiande – ben in linea con la ricerca scientifica odierna che valuta numerose risorse con un approccio compositivo per ottenere una maggior qualità finale del prodotto. Le materie prime testate, descritte nel sesto paragrafo dell'introduzione, sono emergenti ed alternative e conosciute sul mercato e in letteratura come “*Super food*” e “*New healthy food*”. Le ricerche condotte, distinte fra loro se pur con il medesimo fine, verranno trattate singolarmente nei successivi capitoli 3 e 4.

Nel terzo capitolo verranno presentate le potenzialità del polline d'api come elemento funzionale nei GFBs. Il polline d'api presenta ottime proprietà funzionali e nutrizionali con effetti benefici per la salute umana, in quanto presenta proprietà antifungine, antimicrobiche, antivirali, antinfiammatorie, epatoprotettive, anticancerogene, immunostimolanti e proprietà analgesiche locali, che lo rendono un interessantissimo

ingrediente funzionale da inserire negli alimenti (Karabagias et al. 2018). Tuttavia, le caratteristiche dei pollini d'api sono variabili, dipendenti dalle specie botaniche in esso presenti, dal luogo di origine e dai processi di produzione applicati. Questa ricerca, considerando le proprietà del polline d'api e valutando i precedenti risultati positivi ottenuti con questo ingrediente sulla fortificazione di GFBs (Conte et al., 2018; 2020), dapprima illustra le caratteristiche fisiche, chimiche e nutrizionali di 6 differenti pollini di api, fra cui 5 pollini d'api non essiccati provenienti dalla Sardegna, più uno commerciale essiccato, per poi valutare il loro impatto con una fortificazione del 4% nella produzione dei GFBs sia dal punto di vista tecnologico sia nelle qualità nutrizionali. Per tutti i campioni testati sono state determinate le proprietà reologiche, viscosimetriche e le proprietà di lievitazione degli impasti prodotti, e sul prodotto finito sono state effettuate le analisi per determinare il volume specifico, il colore della crosta e della mollica, le analisi di struttura e alveolatura della mollica, nonché la composizione chimica e la qualità nutrizionale, tramite l'identificazione delle frazioni polifenoliche e dell'attività antiossidante.

Il quarto capitolo prende in considerazione un trattamento preventivo sulla farina di ghiande per ottenere un estratto amidaceo da testare come elemento funzionale per il miglioramento delle caratteristiche tecnologiche e nutrizionali dei GFBs, capace di sostituire almeno in parte, l'amido di mais nelle formulazioni GFBs. L'estratto prodotto (EFG) è stato caratterizzato dal punto di vista chimico, fisico e nutrizionale, e successivamente è stato usato in sostituzione all'amido di mais con percentuali crescenti (20%, 40%, 60%) per la produzione di GFBs. Sono state effettuate le analisi viscosimetriche e fermentative sugli impasti prodotti e le analisi tecnologiche e nutrizionali sui GFBs.

## CAPITOLO 3.

### EFFETTI DI ALCUNI DIFFERENTI POLLINI D'API FRESCHI COME INGREDIENTI FUNZIONALI SULLE PROPRIETÀ TECNOLOGICHE E NUTRIZIONALI DEL PANE SENZA GLUTINE.

#### 1 INTRODUZIONE

La prevalenza della malattia celiaca (CD) è stata stimata con valori prossimi al 1% (WGO, 2018), risultato in cui probabilmente si sottostima l'incidenza globale della malattia dovuto al fatto, ormai noto, della difficoltà di diagnosi delle forme atipiche e silenti. Infatti ormai è stato riconosciuto un modello Iceberg per concettualizzare efficacemente l'epidemiologia della CD, dove i casi diagnosticati rappresentano solamente la punta visibile dell' Iceberg, la restante parte rappresenta tutti i casi non diagnosticati (Catassi & Fasano, 2008). Oggigiorno solamente una rigorosa osservanza di una dieta priva di glutine che perduri per tutta la vita è l'unica terapia per i soggetti affetti da malattia celiaca (Haines, Anderson, & Gibson, 2008). Nonostante il mercato dei "senza glutine" abbia raggiunto una dimensione di 4,5 miliardi di dollari nel 2018 e proponga una moltitudine di pani (GFBs), i GFBs presentano ancora numerosi difetti strutturali, dovuti proprio alla mancanza del glutine, tra cui riduzione del volume del pane con conseguente compattezza della mollica, consistenza asciutta e friabile, crosta ricca di fratture e rapidità nel processo di raffermamento. (Capriles & Arêas, 2014). Questi difetti nel prodotto finito dipendono dagli impasti senza glutine, che spesso presentano caratteristiche viscoelastiche non adatte al processo di panificazione, tra cui scarsa lavorabilità, e mostrano carenze più o meno accentuate nella capacità di espandersi e trattenere i gas rilasciati durante il processo di lievitazione (Capriles & Arêas, 2014; Gallagher, Kunkel, Gormley, & Arendt, 2003; Houben, Höchstötter, & Becker,

2012). Nei GFBs sono presenti, inoltre, numerose carenze nutrizionali, quali bassi contenuti di proteine, elevati indici glicemici e carenza di macro- e micro-elementi, come vitamine, Ca e Fe (Matos Segura & Rosell, 2011; Conte, Fadda, Drabińska, & Krupa-Kozak, 2019). Negli ultimi anni, la combinazione di differenti ingredienti e additivi ha migliorato le caratteristiche dei GFBs, soprattutto tramite l'utilizzo di cereali minori, legumi e pseudocereali in sostituzione o in aggiunta degli amidi e delle farine convenzionali (mais e riso) - (Conte, Fadda, Drabińska, & Krupa-Kozak, 2019). Anche i bio-prodotti, utilizzati come additivi, sono stati valutati come potenziali ingredienti per migliorare la qualità dei GFBs. Il polline d'api, riconosciuto come "Super Food", potrebbe essere un "alimento funzionale" nelle formulazioni di pani senza glutine (Karabagias, Karabagias, Gatzias, & Riganakos, 2018). Il polline d'api è composto da carboidrati (13-55%), proteine (10-40%), lipidi (1-13%), fibra grezza (0,3-20%) e ceneri (2-6%). Esso contiene tutti gli amminoacidi e acidi grassi essenziali, amminoacidi liberi, vitamine (principalmente del complesso B), minerali essenziali, carotenoidi e flavonoidi (Thakur & Nanda, 2020a). Le proprietà tecno-funzionali del polline d'api, come la capacità di assorbire acqua oppure olio, l'attività emulsionante e schiumogena, possono avere effetti positivi sia nella formulazione che nelle qualità nutritive di numerosi prodotti alimentari (Kostić et al., 2015; Schmitt, Sanchez, Desobry-Banon, & Hardy, 1998). Infatti, l'applicazione del polline d'api come ingrediente funzionale nei biscotti, in percentuale del 5%, ha determinato un significativo incremento del contenuto di zuccheri, proteine, ceneri, fibre e polifenoli, nonché del potenziale antiossidante del prodotto finale, rispetto al campione di riferimento (Krystyjan, Gumul, Ziobro, & Korus, 2015). Anche per la formulazione di GFBs il polline d'api è stata una risorsa dai molteplici aspetti positivi: sul piano tecnologico i pani fortificati, rispetto al campione di riferimento, sono risultati più soffici e con un maggiore

volume specifico, hanno presentato una mollica coesa ed elastica ed un colore della crosta più scuro, mentre le analisi per valutare la qualità nutrizionale hanno mostrato come il polline d'api abbia incrementato il contenuto proteico, minerale e i composti bioattivi come i polifenoli e i carotenoidi (Conte, Del Caro, Balestra, Piga, & Fadda, 2018; Conte et al., 2020). Le proprietà tecnologiche e funzionali del polline d'api variano non solo con le varietà botaniche in esso contenute, ma anche per il luogo d'origine. Il presente lavoro di ricerca, quindi, ha voluto in primis effettuare una caratterizzazione nutrizionale, tecnologica e funzionale di 6 differenti pollini d'api, di cui cinque freschi (uno monoflora di castagno e altri 4 multiflora, con prevalenza delle specie di cisto, cavolicello e due di leccio) provenienti dalla Sardegna, ed uno essiccato commerciale (multiflora con predominanza della specie cisto). Successivamente è stato testato l'effetto dei diversi pollini sulle caratteristiche tecnologiche e nutrizionali degli impasti e dei pani senza glutine, realizzati con una percentuale di aggiunta di polline d'api del 4% sulla base degli sfarinati.

## 2 Materiali e metodi

### 2.1 Le materie prime

I pani senza glutine sono stati prodotti con farina di riso, amido di mais, gomma di guar e fibra di Psyllium, tutti forniti da Chimab (Chimab Food Ingredient Solutions, Campodarsego, PD, Italia). Nella formulazione sono stati usati anche olio di girasole, lievito fresco, sale e zucchero, acquistati in un supermercato locale (Tabella 2).

Sono stati utilizzati 6 diversi pollini d'api: un polline commerciale essiccato (Apicoltura Piana, Bologna, Italia), acquistato in un supermercato locale, e 5 campioni di polline fresco raccolti in Sardegna da arnie di *Apis mellifera* L., durante la stagione apistica del 2019 e conservati a -18 °C.

### 2.1.1 Analisi palinologica

Per il riconoscimento delle specie botaniche contenute nei diversi campioni di polline d'api è stata eseguita l'analisi palinologica (Tabella 1). I pollini analizzati presentano colori molto differenti, dato altamente correlato alla qualità nutrizionale (De-Melo et al., 2016), ma non determinante per l'identificazione dei *taxa* botanici (Almeida-Muradian, Pamplona, Coimbra, & Barth, 2005). Per ogni campione di polline sono stati adoperati, in 10 prelievi successivi, circa 2 g di campione totali, facendo attenzione anche ai granuli di colore raro. I campioni di polline sono stati sciolti, utilizzando un vortex, in 6 g di acqua distillata per 15 minuti (a velocità ridotta per evitare la formazione di schiuma). Due gocce della soluzione ottenuta sono state distribuite omogeneamente su un'area di 20x20 mm di un vetrino e, successivamente, l'acqua è stata fatta evaporare utilizzando una piastra a temperatura controllata (40°C). In seguito, su tutto il vetrino è stata distribuita omogeneamente la glicerina del Kaiser, opportunamente disciolta. Inizialmente i vetrini sono stati osservati a 1800 x ingrandimenti con un microscopio ottico dotato di obiettivo ad immersione per un riconoscimento dettagliato delle specie, fatta eccezione per alcuni campioni ove i pollini presenti sono risultati distinguibili anche a 720 x ingrandimenti. Il numero dei pollini contati è stato di almeno 500 granuli in circa 50 aree differenti, così facendo sono state ottenute frequenze reali. Ai pollini d'api sono stati assegnati dei codici che rimandano alla specie di polline predominante:

- Monoflora di Castagno: CAST
- Multiflora di Cisto: CIST
- Multiflora 1 di Leccio: L\_R
- Multiflora 2 di Leccio: L\_C

- Multiflora di Cavolicello: CAV
- Multiflora commerciale essiccato: C\_E

Come riportato nella Tabella 1, i campioni analizzati appartenevano alla categoria dei pollini multiflora. Un'unico campione ha presentato un'origine botanica monofloreale con predominanza del 96,7% di polline di castagno (*Castanea Sativa* M.). Infatti, per poter essere classificato monofloreale, il polline d'api deve avere la predominanza di un unico taxon botanico con valori del 80/90% (Barth et al., 2010; Campos et al., 2008). Di un totale di 16 tipi di polline isolati, il polline di leccio (*Quercus ilex* L.) è risultato predominante in due dei sei campioni analizzati (L\_C=59%; L\_R=68 %) e accessorio in altri due campioni. Ampiamente rappresentato anche il polline di cisto che, seppur di specie differenti (*Cistus ladanifer* L e *Cistus Incanus* L), è risultato predominante nei campioni CIST (47,3%) e E\_C (46,41 %). I pollini d'api oggetto di studio variavano notevolmente nei pollini d'accompagnamento e nelle prevalenze minori: in quest'ultima categoria E\_C presenta la maggior composizione, contenendo ben 5 specie.

## 2.2 Prodotti chimici

I prodotti chimici utilizzati sono di seguito riportati:

metanolo, acetone, etere di petrolio (40-60 °C), acido solforico (96%), acido cloridrico (37%), acido tricloroacetico (puro) e bicarbonato di sodio, acquistati dalla Carlo Erba Reagents (Cornaredo, MI, Italia); pepsina da mucosa gastrica suina, pancreatina da pancreas suino, reagente fenolo di Folin-Ciocalteu, acido gallico, radicale 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH●), acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); sali di sodio dell'acido colico (99%) e dell'acido desossicolico (99% extra puro), comprati da Acros Organics (Thermo Fisher Scientific, NJ, USA).

### 2.3 Composizione chimica dei pollini d'api e della farina di riso e amido di mais

Il livello di umidità e il contenuto di ceneri della farina di riso, dell'amido di mais e dei pollini d'api sono stati determinati secondo i metodi ufficiali standard AACC 44-15.02 (AACC, 2005) e ICC 104-1, rispettivamente. Il contenuto di proteina grezza (CP) è stato misurato secondo il metodo Kjeldahl (proc. 988.05; AOAC, 2000), utilizzando come coefficiente di conversione 6,25. Il contenuto totale di lipidi è stato determinato utilizzando il metodo AOAC 2003.06 mediante l'utilizzo di un estrattore automatico (Solvent AutoExtractor Series 158, Velp Scientifica, Usmate Velate, MB, Italia), e usando come solvente l'etere di petrolio. I carboidrati totali sono stati calcolati per sottrazione:  $100 - (\text{Umidità} + \text{proteine} + \text{lipidi} + \text{ceneri})$  (FAO, 2003). Tutte le determinazioni sono state condotte in triplo.

### 2.4 Analisi sulle proprietà fisiche

#### 2.4.1 Indice di assorbimento dell'acqua

Il calcolo dell'indice di assorbimento dell'acqua (WAI) è stato eseguito sulla farina di riso, sull'amido di mais e sui pollini d'api oggetto di studio, utilizzando il metodo AACC 56-20.01 (AACC, 2001) con alcune modifiche. Attraverso l'ausilio di una bilancia di precisione, 0,5 g di campione (quantità corrette considerando l'umidità iniziale) sono stati accuratamente pesati all'interno di tubi da centrifuga da 50 mL, portati in soluzione con 10 mL di acqua distillata a 20 °C, omogenizzati per 30 s con l'ausilio di un vortex, lasciati riposare per 10 min e successivamente centrifugati per 15 min a 3850 rpm. L'indice d'assorbimento è stato calcolato come rapporto tra il peso del precipitato e il peso del campione.



#### 2.4.2 Indice di solubilità in acqua

L'indice di solubilità in acqua (WSI) è stato determinato nei campioni di polline d'api seguendo la procedura descritta da Kaushal, Kumar, & Sharma, (2012), apportando alcune modifiche. Il surnatante ottenuto dalla analisi descritta al punto 2.4.1 relativa al WAI è stato recuperato in capsule tarate dopo passaggio in stufa per 24 h a 105 °C. I campioni di surnatante sono stati pesati e posti in stufa a 105 °C per 24 h. Per determinare il contenuto secco dei residui dei campioni dispersi nella soluzione, le capsule sono state pesate dopo l'essiccamento. L'indice WSI si calcola come rapporto fra il residuo disperso e il peso del campione

#### 2.4.3 Capacità di assorbimento dell'olio

La capacità di assorbimento dell'olio (OAC) è stata determinata sia nella farina di mais e riso sia nei campioni di polline d'api: 1 g di campione è stato accuratamente pesato in tubi da centrifuga precedentemente tarati, sono stati aggiunti 10 mL di olio di semi di girasole e l'emulsione è stata agitata in agitatori magnetici fino a completa omogeneizzazione. Le emulsioni finali sono state tenute a riposo per 30 min e centrifugate a 5450 rpm per 15 min. Terminata la centrifugazione, sono stati pesati i residui dopo l'eliminazione del surnatante. La capacità di assorbimento dell'olio dei campioni è stata valutata misurando la differenza di peso fra il contenuto iniziale di olio e quello finale (Kostić et al., 2015).

#### 2.4.4 Capacità e stabilità schiumogena (FC, FS)

Le proprietà schiumogene dei pollini d'api sono state determinate secondo il metodo utilizzato da Kaushal et al. (2012) con alcune modifiche. Un grammo di campione posto in soluzione acquosa (33,3 mL a 24 °C) è stato disperso per 2 min all'interno di un tubo da centrifuga tramite l'ausilio di un omogeneizzatore da banco (IKA T25 Digital Ultra-Turrax,

Merck KGaA, Darmstadt, Germania) impostato ad una velocità di 9500 rpm. La miscela ottenuta è stata immediatamente trasferita in un cilindro graduato per l'identificazione del volume. La capacità schiumogena (FC) è stata espressa tramite la seguente formula:

$$FC = \frac{\text{Volume dopo l'omogenizzazione} - \text{Volume Iniziale}}{\text{Volume Iniziale}} * 100$$

La stabilità schiumogena (FS) è stata invece espressa valutando il decremento del volume nei cilindri graduati, registrati dopo 20 e 40 minuti di riposo.

## 2.5 Determinazione delle frazioni polifenoliche e dell'attività antiossidante dei pollini d'api.

Il contenuto di polifenoli solubili, insolubili e bioaccessibili è stato determinato tramite le procedure descritte da Conte et al. (2019), con alcune modifiche. Per la determinazione del contenuto di polifenoli solubili nei pollini d'api sono stati utilizzati 0,5 g di campione tal quale. I campioni sono stati sottoposti a due estrazioni successive utilizzando ogni volta 4 mL di una soluzione composta da acido cloridrico (37%), metanolo e acqua (1/80/10, v/v/v), tenuti in agitazione a temperatura ambiente per 2 h. Il surnatante ottenuto è stato filtrato (filtro a siringa da 0,45 µm), combinato e utilizzato per la determinazione della frazione solubile. L'analisi sulla frazione insolubile è stata effettuata utilizzando il residuo dell'estrazione precedente, che è stato miscelato con 5 mL di una soluzione contenente metanolo e acido solforico concentrato in rapporto di 10:1 (v/v) e incubato in un bagnetto termostato a 85 C° per 20 h in agitazione costante a 120 rpm. L'analisi per determinare i polifenoli insolubili è stata condotta sul surnatante. Le frazioni polifenoliche ottenute tramite i precedenti processi di estrazione sono state analizzate applicando il metodo Folin-Ciocalteau (Singleton, Orthofer and Lamuela-Raventós, 1998). Le misure spettrofotometriche (spettrofotometro, Hewlett-Packard, Palo Alto, California) sono state

effettuate a 750 nm, dopo un'ora di incubazione al buio. Le miscele, composte da un'aliquota di estratto (2 mL per i polifenoli solubili e 0,5 mL per i polifenoli insolubili), 0,5 mL di Folin e 10 mL di bicarbonato di sodio 7,5%, sono state portate a volume in un matraccio da 25 mL.

Per la determinazione del contenuto di polifenoli bioaccessibili, il processo di estrazione ha previsto una digestione enzimatica "*in vitro*" che consta principalmente di due fasi successive: una prima fase che riproduce la digestione gastrica ed una seconda che riproduce la digestione intestinale. Per effettuare la simulazione della digestione gastrica, 0,5 g di campione di polline d'api, sono stati addizionati con 20 mL di acqua distillata e 1 mL di pepsina 0,1 M, e, tramite un bagnetto termostato, posti in agitazione a 120 rpm per 1 h alla temperatura di 37°C. Per rispettare le condizioni di una simulazione gastrica, prima dell'incubazione nel bagnetto, i campioni sono stati acidificati fino al raggiungimento di un pH pari a 2 mediante l'impiego di una soluzione 1 M di HCl. Successivamente, la digestione è stata interrotta una portando il pH al valore di 7,2 con una soluzione 1 M di NaHCO<sub>3</sub>. Per effettuare la simulazione della digestione intestinale ai campioni sono stati addizionati 5 mL di una soluzione contenente bile/pancreatina e 5 mL di una soluzione contenente NaCl/KCl. I campioni sono stati lasciati a temperatura ambiente per le 2,5 h successive e poi centrifugati a 3500 rpm x 10 min. Il surnatante così ottenuto è stato utilizzato per la determinazione dei polifenoli bioaccessibili, dopo la precipitazione delle proteine mediante l'uso dell'acido tricloroacetico (TCA) al 20 %. Anche in questo caso, i campioni sono stati analizzati utilizzando il metodo Folin-Ciocalteu (Singleton, Orthofer and Lamuela-Raventós, 1998) partendo da 2 mL di estratto. Le rette di calibrazione per tutte le frazioni polifenoliche sono state fatte usando l'acido gallico come standard ed i

risultati (media di due repliche) sono stati espressi come mg di equivalenti di acido gallico (GAE) per 100 g di polline d'api, su sostanza secca.

L'attività antiossidante è stata determinata tramite il metodo descritto da Collar, Jiménez, Conte, & Fadda (2014) (adattato per il polline d'api), che prevede due estrazioni successive: 1 g di campione è stato posto in 20 mL di soluzione idroalcolica (metanolo:acqua nel rapporto 50:50, v/v, pH 2) e tenuto in agitazione magnetica a temperatura ambiente per 1 h. Successivamente, i campioni sono stati centrifugati per 10 min a 2500 g ed il surnatante è stato recuperato. Il residuo è stato addizionato di 20 mL di una soluzione di acetone e acqua nel rapporto di 70:30 (v/v), e nuovamente posto in agitazione per 1 h a temperatura ambiente. Dopo la centrifugazione (10 min a 2500 g), il surnatante ottenuto è stato combinato con il precedente e diluito sino a 50 mL con metanolo. La determinazione dell'attività anti-radicalica (AR) è stata effettuata mediante l'impiego del DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl). Un'aliquota di 0,1 mL di estratto è stata aggiunta a 2,9 mL di una soluzione composta da DPPH e metanolo (0,025 g/L) e l'assorbanza è stata letta mediante l'ausilio di uno spettrofotometro (UV-Vis Cary 3500 Engine, Agilent Technologies, Melbourne, Australia) alla lunghezza d'onda di 515 nm per ogni minuto fino al raggiungimento del plateau (60 min). L'attività anti-radicalica (AR) è stata calcolata tramite l'equazione  $AR = [(DPPH\ iniziale - DPPH\ plateau) \times 100] / DPPH\ iniziale$ , effettuando la media di due repliche per ogni campione analizzato.

## 2.6 Produzione del pane

Il pane di controllo è stato prodotto con gli ingredienti riportati in Tabella 2: tutti gli ingredienti sono stati espressi in percentuale di aggiunta sulla totalità dell'amido di mais e farina di riso. I pani contenenti polline sono stati preparati aggiungendo i differenti pollini d'api in misura del 4 % sulla base costituita da amido di mais e farina di riso, in accordo

con i risultati ottenuti da Conte et al. (2018). Gli ingredienti sono stati miscelati in un'impastatrice planetaria (KitchenAid, Model 5KPM50, St. Joseph, MI, USA) equipaggiata con una frusta piatta (L5K7SFB). Gli sfarinati e gli idrocolloidi sono stati premiscelati a secco, mentre l'acqua è stata suddivisa in tre aliquote nelle quali sono stati disciolti il polline, il lievito, lo zucchero ed il sale. Seguendo l'ordine elencato, sono stati aggiunti l'olio e gli altri ingredienti disciolti per una durata di impastamento totale di 13 min di cui 5 min a velocità 1 e altri 8 min a vel 2. Quando necessario, l'impasto è stato lavorato manualmente tramite l'uso di una spatola, per evitare la creazione di grumi. Gli impasti ottenuti sono stati divisi in 5 panetti da 250 g, direttamente formati in cassette da forno di alluminio teflonato e posti in una camera di lievitazione (30 °C - 90% UR) fino al raggiungimento di un volume doppio rispetto a quello iniziale. La lievitazione è stata monitorata utilizzando dei cilindri graduati. Gli impasti sono stati cotti a 200°C per 30 minuti in un forno elettrico (Europa, Molina di Malo, VI, Italia). Il pane è stato lasciato raffreddare per 2 h prima di essere tagliato ed analizzato.

## 2.7 Analisi sugli impasti

### 2.7.1 Proprietà reologiche degli impasti

La determinazione delle proprietà viscoelastiche degli impasti - preparati senza l'aggiunta di lievito, per evitare interferenze legate alla presenza di bolle di gas - è stata effettuata con un reometro rotazionale (MCR 102, Anton Paar GmbH, Inc., Graz, Austria) con una geometria a piatti paralleli da 25 mm (P25/P2). Prima dell'analisi, l'impasto è stato lasciato riposare a temperatura ambiente per 10 minuti. Durante l'analisi, il piatto zigrinato superiore del reometro è stato abbassato fino al raggiungimento di uno spessore del campione di 2 mm e l'eccesso di impasto è stato rimosso. Inoltre, per evitare che il campione si seccasse, sul bordo dello stesso è stato applicato un sottile strato di olio di

paraffina. Preliminarmente, è stato eseguito un test di Strain Sweep per identificare la regione di viscoelasticità lineare dei campioni che è stata misurata mantenendo invariata la frequenza (10 Hz) e facendo variare la deformazione (da 0,001 a 100 s<sup>-1</sup>). Sulla base di questi risultati, è stato scelto per le successive misurazioni uno strain target di 0,01 % (all'interno della regione di viscoelasticità lineare). Il modulo di elastico (G') e il modulo viscoso (G'') sono stati determinati mediante successivi test di Frequency sweep condotti in un range di frequenza di 0.1 – 10 Hz e ad una tensione di taglio costante dello 0,01%. Tutte le misurazioni sono state condotte in doppio.

### 2.7.2 Proprietà viscosimetriche degli impasti

Le proprietà viscosimetriche delle formulazioni GF (farina di riso + amido di mais con e senza aggiunta dei pollini oggetto di studio) sono state misurate utilizzando un viscosimetro rotazionale, a temperatura controllata e velocità di rotazione variabile applicando il metodo standard AACC 76-21 “General Pasting” (AACC, 2000) (Rapid Visco Analyser - RVA-4, Newport Scientific, Warriewood, Australia). Il test è stato eseguito miscelando 3,5 g di campione con 25 mL di acqua, quantità corrette in base all'umidità iniziale degli sfarinati, come riportato dal metodo, in accordo con le impostazioni standard 1 del protocollo seguito. I campioni di impasto così ottenuti sono stati sottoposti ad un ciclo di riscaldamento e raffreddamento alle seguenti temperature: 2 min a 50°C, riscaldamento graduale a 95°C, mantenimento a 95°C per 2 min e 30 sec, raffreddamento a 50°C e mantenimento di questa temperatura per 2 min. Le analisi sono state condotte in doppio e sono stati misurati i seguenti parametri: il picco di viscosità (cP), la trough viscosity (cP), il breakdown (cP), il setback (cP), la viscosità finale (cP), il tempo di picco (min) e la temperatura di pasting (°C).

### 2.7.3 Attività $\alpha$ -amilasica

L'attività  $\alpha$ -amilasica è stata determinata nelle formulazioni GF (farina di riso + amido di mais con e senza aggiunta dei pollini oggetto di studio) applicando il test “Stirring Number (SN)” (AACC 22-08, AACC, 2000) – mediante l’ausilio di un viscosimetro rotazionale (Rapid Visco Analyser - RVA-4, Newport Scientific, Warriewood, Australia). Questo metodo si basa sulla capacità delle  $\alpha$ -amilasi di depolimerizzare un substrato amidaceo viscoso, riducendone repentinamente la viscosità e ottenendo una indicazione sulla capacità fermentativa dei campioni testati. Una quantità di campione pari a 3,5 g è stata miscelata con 25 mL di acqua distillata e riscaldata a 95 °C per 3 min. L'attività enzimatica è espressa, come previsto dal metodo, in Stirling Number (SN): più alto è il valore di SN minore è l'attività amilasica. Normalmente, valori inferiori a cento indicano un'attività elevata. Tutte le misurazioni sono state effettuate in doppio.

### 2.7.4 Proprietà di lievitazione

Le proprietà di lievitazione degli impasti sono state testate utilizzando un reofermentometro F3 (Chopin, Parigi, Francia). Il protocollo è stato adattato per testare impasti GF, utilizzando un campione di 315 g che è stato incubato a 30 °C per 3 ore (tempistica che permette di valutare anche il collasso degli impasti), con pistone privo di pesi. Tramite questa analisi sono state determinate la curva di sviluppo degli impasti e la curva di rilascio dei gas, e i relativi parametri: Hm (mm), T1 (h:min) della curva di sviluppo e H'm (mm), T'1 (h:min), il Volume Totale (Vt) (CO<sub>2</sub>) , il volume di ritenzione (Vr) (CO<sub>2</sub>), volume rilasciato (CR) (CO<sub>2</sub>) e il rapporto Vr/Vt per la curva di rilascio dei gas. Il test è stato eseguito in doppio per tutti i campioni.

## 2.8 Analisi sul pane

### 2.8.1 Volume specifico

Il volume dei campioni di pane è stato misurato secondo il metodo AACC 10-05.01 (AACC, 2005) e il volume specifico (mL/g) è stato calcolato come rapporto tra il volume del pane ed il peso del pane.

### 2.8.2 Determinazione del colore

Il colore è stato misurato il giorno della cottura, sia sulla crosta che sulla mollica, utilizzando un colorimetro tristimolo (Minolta DP-301, Konica Minolta Sensing, Osaka, Giappone) accoppiato ad una unità di misurazione CR\_300. Prima di ogni analisi, lo strumento è stato calibrato utilizzando una piastrella bianca. Il colore della crosta è stato misurato in tre punti (uno centrale e due distali), mentre il colore della mollica è stato misurato centralmente utilizzando 2 fette centrali di 5 pani differenti. I risultati sono stati espressi utilizzando i parametri  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , della scala colorimetrica di Hunter in cui:  $L^*$  indica la luminosità ( $L = 0$  [nero] e  $L = 100$  [bianco]),  $a^*$  dà un'indicazione del passaggio di colore dal verde al rosso ( $-a =$  verde e  $+a =$  rosso),  $b^*$  indica il passaggio del colore dal blu al giallo ( $-b =$  blu e  $+b =$  giallo).

### 2.8.3 Analisi del profilo di texture

La valutazione delle proprietà meccaniche del pane è stata effettuata mediante il test Texture Profile Analysis (TPA) utilizzando un testurimetro TA-XT2 plus (Stable Micro Systems, UK). L'analisi, che simula una doppia masticazione del campione attraverso due compressioni, è stata effettuata su sei fette di pane di 20 mm di larghezza utilizzando una sonda cilindrica da 25 mm di diametro, La percentuale di deformazione del campione era del 50%, la velocità del test era costante, di 1mm/s e l'intervallo tra le due compressioni



era di 30 s. Il software collegato allo strumento elabora una curva di forza (N) versus distanza percorsa dalla sonda (mm), dalla quale si calcolano i seguenti parametri: la durezza (N), l'elasticità all'origine (mm), la coesività, la masticabilità (N \*mm) e la resilienza.

#### 2.8.4 Analisi della alveolatura della mollica

L'analisi della alveolatura della mollica è stata effettuata mediante l'impiego di tecniche digitali di analisi di immagine. L'analisi è stata condotta su porzioni centrali di mollica (4x4 cm) selezionate dalle immagini di 3 fette di ciascun pane, preliminarmente acquisite con uno scanner fotografico Epson Perfection - V500 (Epson, Suwa, Giappone) ad una risoluzione di 360 dpi. Le immagini sono state successivamente elaborate utilizzando il software dedicato Image J (Image Pro-Plus v. 1.52a Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, USA), in modo da ottenere il numero degli alveoli e la dimensione di ciascuno di essi. Gli alveoli sono stati suddivisi in tre classi dimensionali: <math><1 \text{ mm}^2</math>, <math>1-9,99 \text{ mm}^2</math>, <math>10-40 \text{ mm}^2</math>. Sono stati calcolati anche la dimensione media (<math>\text{mm}^2</math>) e massima alveolare (<math>\text{mm}^2</math>), il rapporto alveoli/area totale (n° alveoli/cm<sup>2</sup>) e la densità alveolare (n° alveoli/cm<sup>2</sup>).

#### 2.8.5 Composizione chimica del pane

Il contenuto di acqua e di ceneri dei pani sono stati determinati tramite i metodi ufficiali standard AACC 44-15.02 e ICC 104-1. La determinazione del contenuto proteico (CP) è stata effettuata seguendo il metodo Kjeldahl (proc. 988.05; AOAC, 2000) e utilizzando come fattore di conversione 6,25. Il contenuto totale di lipidi è stato determinato utilizzando il metodo AOAC 2003.06, mediante lo strumento (SER158 Solvent AutoExtractor, VELP), usando come solvente l'etere di petrolio. I carboidrati totali sono stati stimati per determinazione indiretta con l'applicazione della seguente formula: 100 -

(Umidità+Proteina+Lipidi+ceneri) - (FAO, 2003). Tutte le misurazioni sono state effettuate in triplicato.

### 2.8.6 Determinazione delle frazioni polifenoliche e dell'attività antiossidante del pane

Il contenuto di polifenoli solubili, insolubili e bioaccessibili sono stati determinati su 2 g di campione essiccato e macinato seguendo la procedura precedentemente descritta per i pollini d'api. Le rette di calibrazione per tutte le frazioni polifenoliche sono state eseguite usando l'acido gallico come standard e i risultati (media di due repliche) sono stati espressi come mg di GAE per 100 g di pane secco. L'attività antiossidante è stata determinata tramite il metodo precedentemente descritto per i pollini d'api (Collar et al. 2014), con alcune modifiche. La procedura è stata effettuata con 2 g di campione di pane secco macinato e le quantità delle soluzioni estrattive sono state dimezzate [10 mL di soluzione metanolo:acqua per la prima estrazione (50:50 v/v pH 2) e 10 mL di acetone:acqua (70:30 v/v) per la seconda]. Il surnatante combinato delle due estrazioni successive è stato portato a volume (25 mL). L'assorbanza è stata letta mediante l'ausilio di uno spettrofotometro (UV-Vis Cary 3500 Engine, Agilent Technologies, Melbourne, Australia) alla lunghezza d'onda di 515 nm per ogni minuto fino al raggiungimento del plateau (60 min) utilizzando una aliquota di 0,3 mL di surnatante miscelata con 2,7 mL di una soluzione DPPH/metanolo (0,025g/L). L'attività antiossidante (AR) è stata calcolata tramite l'equazione  $AR = [(DPPH\text{ iniziale} - DPPH\text{ plateau}) \times 100] / DPPH\text{ iniziale}$ , effettuando la media di due repliche per ogni campione esaminato.

## 2.9 Analisi statistica

L'analisi statistica dei risultati è stata eseguita utilizzando il software Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza

(ANOVA) a una via, in quanto il fattore di variazione era uno solo, ossia il tipo di polline utilizzato. Il test delle minime differenze significative (LSD) di Fisher è stato applicato per conoscere la differenza fra i campioni con un livello di confidenza del 95%

### 3 RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1 Materie prime

##### 3.1.1 Composizione chimica e caratteristiche fisiche della farina di mais e amido di riso

La composizione chimica e le caratteristiche fisiche degli sfarinati utilizzati come ingredienti base nella formulazione dei pani senza glutine sono riportate nella Tabella 3. La farina di riso aveva un tenore in acqua e in carboidrati totali di 11,3 e 79,5 g/100 g s.s, e un discreto contenuto di proteine ( $8,3 \pm 0,1$  g/100 g s.s). L'amido di mais, invece, aveva un contenuto di umidità e di carboidrati totali leggermente superiore rispetto alla farina di riso (rispettivamente 13,7 e 85,4 g/100 g s.s) e la presenza di proteine e ceneri in tracce (Tabella 3). Entrambi gli sfarinati avevano un basso contenuto di lipidi (0,3 g/100 g s.s.). La presenza di una quantità molto bassa di lipidi potrebbe rappresentare un vantaggio dal momento che è stato riscontrato che un livello troppo alto determina un decremento della viscosità degli impasti (Rosell & Marco, 2008).

Per quanto riguarda le proprietà fisiche, la farina di riso aveva un WAI di 2,6 (g/g) – dato in linea con i risultati precedentemente riportati da Kaushal, Kumar, & Sharma (2012) e una OAC pari a 0,09 g/g, mentre, l'amido di mais aveva un WAI inferiore (1,7 g/100 g s.s) e una OAC simile (1,00).

##### 3.1.2 Composizione chimica dei pollini d'api

Per quanto riguarda i pollini d'api i dati ottenuti riportati in Tabella 4 hanno evidenziato differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ) tra i campioni analizzati, sia in termini di composizione chimica che di profilo nutrizionale. Questi risultati erano in qualche modo attesi considerando che la composizione fisico-chimica dei pollini d'api varia considerevolmente in funzione delle differenti specie botaniche in essi presenti, dell'origine

geografica e dei processi e condizioni di stoccaggio applicati, come ampiamente riscontrato nella letteratura esistente (Campos et al., 2008; Ranieri et al., 2019; Kostić et al., 2015; Nogueira et al., 2012)- I pollini d'api freschi hanno mostrato valori di umidità compresi tra un minimo di 16,3 % nel campione CAST ed un massimo di 32,6 % nel campione L\_R. Tutti gli altri pollini analizzati hanno mostrato un contenuto di umidità compreso tra il 20 ed il 30%; in linea con quanto riportato da Campos et al. (2008) in campioni di polline fresco. Il contenuto di umidità del campione commerciale di riferimento E\_C è invece risultato molto più elevato del valore riportato in letteratura per i pollini essiccati, che normalmente non dovrebbe superare l'8%, in modo da preservarne la sicurezza alimentare: le cause sono da imputare probabilmente ad errati processi di raccolta, stoccaggio ed essiccazione (Thakur & Nanda, 2020). Anche il contenuto in proteine ha mostrato estrema variabilità, oscillando tra un valore massimo registrato nei campioni CAV e CAST (28,7 e 27,9 g/100 g di s.s, rispettivamente) e un valore minimo osservato nel campione E\_C (17,6 g/100 g di s.s). In particolare, il basso contenuto proteico osservato nel campione E\_C, oltre che dalle specie presenti, dal luogo di origine e dalle modalità di raccolta del polline da parte delle api, potrebbe dipendere dai processi di essiccazione effettuati. Infatti, come riportato in letteratura, il tenore in proteine tende a diminuire all'aumentare delle temperature di essiccazione (Thakur & Nanda, 2020; Isik et al., 2019; Bogdanov, 2017). Per quanto riguarda il contenuto in carboidrati, invece, è possibile osservare una situazione inversa, con il campione E\_C che ha fatto registrare il valore più alto (63,6 g/100 g di s.s,) e i campioni CAV e L\_R quelli più bassi (36,3 e 37,2 g/100 g di s.s). Questi dati sono in linea con il range identificato da Campos et al. (2008), che hanno riportato un contenuto in carboidrati totali compreso tra 13 e 55 g/100 g di s.s. Per quanto attiene al contenuto in lipidi, il più alto valore è stato osservato nel campione CAV (5,2 g/100 g di s.s), mentre quello più basso nel campione CAST (1,3 g/100 g di s.s). Anche questi dati si collocano

all'interno del range precedentemente riportato da altri autori per pollini d'api di differente origine (Campos et al., 2008; Carpes et al., 2009; Yang et al., 2013). Inoltre, per tutti i campioni oggetto di studio, il contenuto in ceneri è risultato al di sotto del limite ottimale identificato da Campos., et al. (2008) di 6 g /100 g di s.s.

### 3.1.3 Frazioni polifenoliche e attività antiossidante dei pollini d'api

In Tabella 5 sono riportati i dati relativi alle frazioni polifenoliche e all'attività antiossidante dei pollini d'api oggetto di studio. Il contenuto in polifenoli totali dei pollini d'api analizzati oscillava tra un minimo di 1705,5 ed un massimo di 3633,8 mg GAE/100 g osservati, rispettivamente, nei campioni CIST e CAST. Questi risultati sono simili a quelli registrati da Barbieri et al.(2020) in campioni di polline d'api toscani e perfettamente in linea con il range di valori precedentemente riportato per pollini d'api di numerosi paesi, quali Portogallo, USA, Brasile, Cina, Egitto, Nuova Zelanda e Grecia (0,50-213 mg GAE/g) (Thakur & Nanda, 2020a). Il contenuto dei polifenoli totali osservato nell'unico miele classificato come monofloreale - il campione CAST – è risultato però nettamente più elevato di quello riportato da Gabriele et al. (2015) per il polline di castagno di origine toscana. Le differenze significative ( $p < 0.05$ ) osservate tra i campioni di polline testati confermano, pertanto, l'influenza derivante non solo dall'origine botanica, ma anche delle condizioni climatiche e dalla provenienza geografica degli stessi (Tolić et al., 2017). La quantità dei polifenoli solubili – con valori percentuali sul totale che oscillano tra il 72 e l'87% – è risultata nettamente più elevata di quella della frazione insolubile in tutti i campioni di polline analizzati, come precedentemente osservato da altri autori in campioni di polline essiccato commerciale (Conte et al., 2020). In particolare, la quantità più elevata è stata osservata nel campione CAST (3153 mg GAE/100g; 87% sul totale), mentre il valore più basso è stato registrato nel campione L\_C (1332 mg GAE/100g; 71% sul totale). Un dato interessante emerge, inoltre, dall'analisi dei dati relativi alla frazione di polifenoli

bioaccessibili: in questo caso, il campione L\_R (1344 mg GAE/100g corrispondenti al 70% di polifenoli bioaccessibili sul totale) ha mostrato valori di bioaccessibilità più elevati rispetto a tutti gli altri campioni analizzati, seguito dai campioni L\_C e CAV (rispettivamente 1093 mg GAE/100g e 1043 mg GAE/100g; 59% e al 47% sul totale). Il campione CAST, invece, nonostante un contenuto in polifenoli totali due volte più elevato di quello osservato in quasi tutti gli altri campioni, ha mostrato una quantità di polifenoli bioaccessibili significativamente ( $p < 0,05$ ) più bassa (879,2 mg GAE/100g; 24% sul totale) di quella degli altri pollini testati.

L'analisi dell'attività antiossidante dei campioni di polline d'api ha identificato valori molto elevati per due campioni, rispettivamente il CAST (96,2%) e L\_R (88%), mentre l'attività anti-radicalica minore è presente nel campione CAV (46,3%). Le differenze nella attività antiossidante dipendono dalla composizione che varia principalmente a causa delle specie polliniche contenute in essi. Infatti, i valori riscontrati sono in linea con i risultati ottenuti da Leja et al. (2007), che ottengono elevate differenze sulla attività antiossidante di 12 specie di pollini d'api differenti.

#### 3.1.4 Analisi sulle proprietà fisiche dei pollini d'api

Le proprietà fisiche funzionali sono utilizzate per determinare la qualità finale dei prodotti alimentari, essendo esse in grado di influenzare le caratteristiche sensoriali in termini di apparenza, gusto, struttura e conseguente accettabilità del prodotto finito (Thakur & Nanda, 2020). Il polline d'api può essere descritto come un sistema colloidale (composto da nettare o miele e pollini ed è costituito da più componenti come lipidi, ceneri, carboidrati, ecc..) in cui la natura e le forze d'interazione che si sviluppano sulla superficie delle componenti presenti nella fase disperdente determinano le proprietà del prodotto. I dati relativi alle proprietà fisiche dei pollini d'api sono rappresentati nelle Figure 1 e 2.

Come riportato in Figura 1, i pollini d'api testati hanno mostrato differenze significative ( $p < 0,05$ ) in termini di indice di assorbimento dell'acqua con valori che oscillavano tra un minimo di 1,30 g/g del campione L\_C e un massimo di 2,16 g/g del campione CAST. Questi valori risultano simili a quelli precedentemente riportati da altri autori per pollini d'api di differente origine (Kostic et al., 2015; Thakur & Nanda, 2018). L'estrema variabilità osservata nella capacità di assorbimento dell'acqua potrebbe essere legata a differenze nella composizione dei diversi pollini testati (soprattutto in termini di proteine, carboidrati e lipidi) e alle loro caratteristiche superficiali. Infatti, le parti idrofile di proteine insolubili, i carboidrati insolubili e le molecole lipidiche, possono creare legami ed interagire con le molecole d'acqua influenzandone il comportamento (Kostic et al., 2015; Thakur & Nanda, 2018).

L'indice di dispersione dei pollini nel sistema acquoso (WSI) è risultato particolarmente elevato per tutte le varietà di pollini d'api analizzati con valori compresi tra i 32,13 e i 44,99 g/g. L'elevata solubilità, tipica dei campioni di polline d'api (84,91-87,56 %), come riportato da Thakur & Nanda (2020), potrebbe spiegare questo risultato. I campioni testati hanno inoltre mostrato una buona capacità di assorbimento dell'olio con valori che si collocano – sebbene con un dato medio più basso (1,18 g/g) – all'interno del range precedentemente riportato da altri autori (1-3,53 g/g; valore medio: 2,49 g/g).

La capacità schiumogena dei pollini d'api oggetto di studio è variata da un minimo del 3% osservato nei campioni CAST e L\_C, fino ad un massimo del 12% registrato nel campione CAV, il quale ha fatto registrare anche la migliore stabilità schiumogena sia dopo 20 che dopo 40 minuti di stasi (rispettivamente 12% e 9%). I risultati ottenuti nel presente studio sono in disaccordo con quanto riportato da Kostic et al. (2015) che hanno osservato assenza di proprietà schiumogene in sospensioni di differenti pollini d'api provenienti dalla Serbia, probabilmente a causa della presenza di lipidi tensioattivi nei campioni analizzati. Al



contrario, risultati simili sono stati ottenuti da Thakur & Nanda, (2018) che hanno osservato una capacità schiumogena compresa tra 6,21 e 8,69% e una stabilità nel range 17,5-20% in pollini d'api indiani. Tali incongruenze potrebbero essere legate alle differenti condizioni in cui viene condotta l'analisi. Nel caso specifico di questo studio, infatti, l'impiego di una forte velocità di centrifuga potrebbe aver causato la rottura e la dispersione delle componenti superficiali lipidiche dei pollini nel mezzo acquoso, permettendo l'interazione superficiale delle strutture polliniche e, di conseguenza, la formazione di una schiuma.

## 3.2 Analisi sugli impasti

### 3.2.1 Proprietà reologiche

Come riportato nella Tabella 6, il modulo elastico ( $G'$ ) e il modulo viscoso ( $G''$ ) del campione di controllo e dei campioni fortificati con i differenti pollini d'api oggetto di studio hanno mostrato differenze significative quando sottoposti ad un test di scansione di frequenza a temperatura e ampiezza di deformazione costante (rispettivamente:  $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $\gamma = 0,01$ ) e frequenza variabile (intervallo: 0,1-10 Hz). Dall'analisi dei risultati è emerso che, sebbene tutti i campioni abbiano mostrato un comportamento solido/simil-elastico ( $G' > G''$ ), l'aggiunta di polline ha determinato un significativo decremento di entrambi i moduli causando un peggioramento nel livello sia delle caratteristiche elastiche che viscoso di tutti gli impasti fortificati, fatta eccezione per il campione L\_R che ha mostrato un comportamento simile all'impasto di controllo (Tabella 6). In particolare, tra i campioni fortificati, i risultati migliori sono stati osservati nei campioni preparati con i pollini L\_R e CIST, mentre, il peggioramento più marcato delle proprietà viscoelastiche, è stato registrato nel campione arricchito con il polline CAV, subito seguito dai campioni CAST e L\_C. Queste sostanziali differenze potrebbero dipendere dalla differente composizione chimica, soprattutto in termini di macronutrienti, dei pollini utilizzati. Ad esempio, la significativa

riduzione dei valori dei moduli dinamici osservata nei campioni CAV, CAST ed L\_C potrebbe essere dovuta al maggior quantitativo di proteine aggiunte con l'impiego di questi pollini (Tabella 4). Simili risultati sono stati precedentemente ottenuti da Collar et al. (2015) in impasti senza glutine arricchiti con proteine dell'uovo e del latte (5/10%).

### 3.2.2 Attività $\alpha$ -amilasica

I risultati dell'attività  $\alpha$ -amilasica misurata sugli impasti preparati con e senza aggiunta dei pollini d'api oggetto di studio ed espressa in unità arbitrarie SN sono riportati nella Tabella 6. Il campione che ha mostrato l'attività  $\alpha$ -amilasica più elevata è stato il campione preparato con il polline CAV (2685), subito seguito dal campione preparato con il polline CAST (2870). Tutti gli altri campioni fortificati hanno fatto registrare una attività amilasica leggermente, ma non significativamente, più elevata del campione di controllo.

### 3.2.3 Analisi viscosimetriche

Le proprietà viscosimetriche del campione di controllo e degli impasti fortificati sono riportati nella Tabella 6. Durante la fase di riscaldamento, tutti i campioni analizzati, incluso il campione di controllo, hanno mostrato valori di viscosità di picco simili, fatta eccezione per i due campioni preparati con l'aggiunta dei pollini L\_R e E\_C nei quali sono stati registrati valori significativamente ( $p < 0,05$ ) più elevati. Il campione L\_R, tuttavia, è stato anche quello che ha fatto registrare il più alto breakdown, subito seguito dal campione CAV. Nessuna differenza significativa è stata invece riscontrata nei valori di temperatura di pasting tra tutti i campioni analizzati. Terminata la fase di riscaldamento, e nelle prime fasi del raffreddamento, si assiste ad una transizione di fase dei campioni, il cosiddetto setback, che porta ad un aumento della viscosità finale per effetto della riassociazione delle molecole di amilosio prima e amilopectina poi (retrogradazione). Durante questa fase non è stata riscontrata nessuna differenza significativa nei valori del setback tra tutti i campioni

analizzati che, invece, hanno mostrato differenze sostanziali nei valori di viscosità finale. Infatti, ad eccezione del campione E\_C, tutti i campioni fortificati hanno mostrato valori di viscosità finale significativamente ( $p < 0,05$ ) più bassi del campione di controllo, suggerendo un effetto positivo dell'aggiunta del polline d'api, in particolare del campione CAV, nel ridurre il grado di retrogradazione dell'amido. Tale effetto potrebbe essere legato alla presenza nel polline d'api di emulsionanti in grado di creare complessi con l'amilosio e le catene lineari esterne dell'amilopectina, così come di enzimi – le amilasi – prodotti dalle api durante la formazione dei granuli di polline e in grado di agire sull'amido, modificandolo (Giannone et al. 2016; Conte et al. 2018).

#### 3.2.4 Proprietà di lievitazione degli impasti

L'effetto dell'aggiunta dei pollini d'api di differente origine sul comportamento degli impasti durante la fase di lievitazione è stato valutato attraverso un test reofermentografico. I risultati relativi allo sviluppo in altezza dell'impasto e alla produzione e ritenzione dell'anidride carbonica prodotta sono riportati, rispettivamente, nella Figure 3 e nella Tabella 7. Dalle curve riportate in Figura 3 si può osservare come i diversi tipi di polline aggiunti abbiano influenzato in maniera differente lo sviluppo degli impasti nel corso della fermentazione. In particolare, i campioni preparati con i pollini CIST e E\_C hanno mostrato uno sviluppo dell'impasto (Hm) significativamente ( $p < 0,05$ ) più elevato (rispettivamente 75 e 74 mm) del campione di controllo (62 mm); al contrario, i campioni preparati con i pollini CAST e CAV hanno fatto registrare i valori più bassi, seppur con un incremento significativo della velocità di sviluppo (rispettivamente 46 e 33 mm), probabilmente legato alla diversa composizione degli zuccheri aggiunti dal polline d'api. La maggiore e più prolungata stabilità è stata registrata nel campione di controllo, l'unico a presentare un valore di altezza finale alla fine del test diverso da zero. Questo risultato potrebbe essere dovuto alle migliori proprietà microstrutturali dell'impasto non fortificato – come

evidenziato anche dalle analisi delle proprietà viscoelastiche (Tabella 6) – che potrebbero aver favorito il mantenimento della struttura nel corso della levitazione. Analogamente, i due campioni – CAST e CAV – che hanno mostrato lo sviluppo in altezza massima minore erano anche quelli in cui l’aggiunta del polline aveva portato ad un deterioramento significativo ( $p < 0,05$ ) delle proprietà viscoelastiche (Tabella 6).

I campioni fortificati hanno mostrato un comportamento significativamente differente da quello del controllo anche per quanto concerne la quantità di anidride carbonica prodotta e trattenuta nel corso della fermentazione (Tabella 7). In particolare, tutti i campioni fortificati hanno mostrato un aumento significativo della quantità di anidride carbonica prodotta rispetto al campione di controllo (1185 mL), con i valori più alti osservati nel campione CIST (1728 mL) subito seguito dai campioni L\_C e L\_R (1703 e 1690 mL). Probabilmente, gli zuccheri aggiunti con il polline, soprattutto in termini di composizione, potrebbero essere risultati più favorevoli e, pertanto, prontamente disponibili per l’azione dei lieviti. Inoltre, nonostante gli impasti fortificati, probabilmente a causa delle proprietà viscoelastiche inferiori, abbiano fatto registrare coefficienti di ritenzione più bassi rispetto al campione di controllo (82-87% versus 97%), la quantità di anidride carbonica ritenuta è risultata comunque superiore in ciascuno di essi. E, ancora una volta, il miglior risultato è stato ottenuto nel campione CIST (Tabella 7).

### 3.3 Analisi sul pane

#### 3.3.1 Volume specifico e colore

Le caratteristiche finali del pane GF sono riportate in Tabella 8. Per quanto riguarda il volume specifico, nel pane fortificato con CIST (2,51 mL/g) è stato misurato uno sviluppo simile al controllo (2,53 mL/g), mentre è presente un significativo decremento per le restanti varietà testate.

La fortificazione di pane GF con polline d'api ha mostrato, in accordo con Conte et al. (2018), un effetto marcato sul colore della crosta e della mollica. I pani fortificati CAST, CIST e E\_C presentano una diminuzione della luminosità  $L^*$  della crosta, mentre E\_C, CAV e L\_R non sono significativamente diversi rispetto al pane senza polline d'api ( $p < 0,05$ ), invece tutti i GFBs fortificati mostrano un incremento dell'indice di rosso ( $a^*$  positivo) e dell'indice di giallo ( $b^*$  positivo) della crosta rispetto al pane di controllo. Il campione che mostra i valori più elevati per le coordinate cromatiche  $a^*$  e  $b^*$  nella crosta è il pane fortificato con CAST. L'indice di giallo della crosta è fortemente correlato, per tutti i pani fortificati, con il contenuto di polifenoli solubili apportati dall'aggiunta di polline d'api ( $r = 0,83$ ,  $p < 0,05$ ). Anche il colore della mollica varia significativamente rispetto al controllo, infatti la coordinata  $a^*$  tende ad assumere valori che vanno verso tonalità decisamente più verdi ( $a^*$  negativo) e la coordinata  $b^*$  ( $b^*$  positivo) verso tonalità significativamente più elevate di giallo. Il campione che raggiunge i valori più elevati della coordinata  $b^*$  è il pane fortificato tramite CIST (46,29 contro 4,52). De-Melo et al. (2016) riscontrando una forte correlazione dei colori dei pollini d'api con la quantità di polifenoli totali e l'attività antiossidante, li consigliano come indice per valutare la qualità nutrizionale, parametro che potrebbe essere preso in considerazione anche per la fortificazione dei GFBs con i pollini d'api.

### 3.3.2 Analisi delle caratteristiche della mollica

Il numero totale degli alveoli nei GFBs fortificati non varia rispetto al controllo (1209 n° A tot). Gli altri campioni presentano una diminuzione del numero totale di alveoli presenti e della densità alveolare, con il valore più basso, per entrambi i parametri, per il campione CAV (640 A tot e 40 A/cm<sup>2</sup>). La densità alveolare non subisce variazioni rispetto al riferimento (controllo = 75,54 A/cm<sup>2</sup>) per i campioni di pane fortificati con polline di cisto

e di leccio\_rosemarino (CIST=76,79 A/cm<sup>2</sup> e L\_R= 72,8 A/cm<sup>2</sup>), indice positivo di una struttura della mollica omogenea. L'incorporazione di pollini di differente origine in un impasto GF ha ottenuto effetti significativi anche nella distribuzione del numero degli alveoli (%) e nella distribuzione dell'area alveolare (%) - (Figure 5 e 6). Un effetto negativo sulla struttura è evidente per i campioni CAV e E\_C: essi sono i campioni che mostrano un maggior numero di alveoli appartenenti alla categoria maggiore (10-40 mm<sup>2</sup>).

### 3.3.3 Proprietà di Texture

L'analisi al testurimetro (Tabella 10) mostra un incremento significativo dei valori di durezza per i pani fortificati, eccetto che per i pani ottenuti con CAST e L\_R. L'incremento della durezza della mollica è correlato positivamente con la capacità d'assorbimento dell'olio (OAC  $r=0,44$   $p<0,05$ ) e la capacità e stabilità schiumogena ( $r=0,48$   $p<0,05$  e  $r=0,44$   $p<0,05$ ) dei pollini d'api. La coesività della mollica non è significativamente diversa dal controllo solo per il campione L\_C, mentre per i restanti campioni diminuisce significativamente. Le caratteristiche fisiche e la composizione chimica dei pollini (lipidi e carboidrati principalmente) hanno fortemente influenzato la struttura della mollica, rendendola per tutti i pani eccetto L\_C, più dura e meno coesa del campione di riferimento.

### 3.3.4 Composizione chimica dei pani senza glutine

In accordo con il risultato ottenuto da Conte et al. (2019) per la fortificazione di un pane senza glutine con il 4% di polline, i risultati mostrati nella Tabella 11 evidenziano un decremento del tenore di umidità per tutte le varietà testate rispetto al campione di riferimento (controllo = 42,6 g /100 g) eccetto che per il pane fortificato con CAV che mostra un valore superiore, ma non significativo, rispetto al controllo (43,3 g/100 g). Questo aspetto è dovuto alla capacità di assorbimento dell'acqua dei differenti pollini. Infatti, essendo il polline d'api un composto altamente igroscopico, è in grado di

influenzare la distribuzione dell'acqua nel pane. Le proprietà del polline d'api CAV sono significativamente differenti rispetto agli altri pollini (Tabella 4). Infatti, esso è caratterizzato da un elevato contenuto di lipidi (5,2 g/100g s.s) e un basso contenuto di carboidrati (36,3 g/100g s.s) rispetto alla media degli altri pollini testati (2,4 e 47,9 g/100g s.s rispettivamente), che hanno influenzato anche lo sviluppo dell'impasto e le caratteristiche strutturali dei pani prodotti con questo polline, come già descritto in precedenza. Per quanto riguarda le componenti proteiche dei pani fortificati, abbiamo ottenuto, come riscontrato da Conte et al. (2019) un netto miglioramento rispetto al controllo (4,8 g/100g s.s) con un valore medio di 5,29 g/100g s.s, e un maggior contenuto per il campione CAV (5,5 g/100g s.s). I risultati ottenuti sono sicuramente promettenti per ottenere una fortificazione proteica, considerando che la media del contenuto in proteine dei pani GF presenti sul mercato mondiale risulta del 3,91 % (Roman et al., 2019). La componente lipidica decresce per tutti i pani fortificati rispetto al controllo, attestando il suo minimo nel pane con l'aggiunta di polline di castagno (CAST  $1,5 \pm 0,02$  g/100g s.s).

### 3.3.5 Determinazione delle frazioni polifenoliche e dell'attività antiossidante del pane

La fortificazione del pane senza glutine tramite il polline d'api ha portato, per tutte le varietà testate, ad un incremento dei polifenoli (Tabella 12). Il contenuto in polifenoli solubili del pane è risultato positivamente correlato con i polifenoli totali di tutte le varietà di polline d'api utilizzate ( $r = 90$   $p < 0,05$ ). Il valore di polifenoli totali più elevato è presente nel pane fortificato con polline di castagno (CAST=211 mg GAE/100 g s.s). Inoltre, rispetto al controllo (125,0 mg GAE/100 g s.s), tutti i pollini d'api apportano un considerevole effetto, attestando la media dei polifenoli totali dei pani fortificati ad un livello nettamente più elevato (177,8 mg GAE/100 g s.s). Come osservato in Conte et al. (2019) è stato ottenuto un significativo decremento del rapporto PI/PS dato da un incremento considerevole della frazione solubile per tutti i pani fortificati. Comunque, la percentuale maggiore di polifenoli

contenuti nei pani fortificati risulta appartenente alla frazione insolubile, che aumenta rispetto al controllo al pari delle altre frazioni polifenoliche. Abbiamo inoltre rilevato un significativo ( $p < 0,05$ ) aumento del contenuto dei polifenoli bioaccessibili dei campioni di pane L\_C e CAV rispetto al controllo, ma la bioaccessibilità espressa in percentuale sui polifenoli totali ha un considerevole decremento per tutti i campioni, probabilmente dovuto al fatto che molti dei polifenoli aggiunti si presentano in forma insolubile ed interagendo con la matrice alimentare (grassi, fibra, e proteine) possano non rendersi disponibili durante i processi digestivi. Malgrado ciò, l'attività antiossidante dei pani fortificati è significativamente superiore, attestandosi su un range di valori che vanno dal 53% all'82% (E\_C e CAST, rispettivamente), rispetto al controllo che si attesta al 33%. Il valore di attività antiossidante riportato da E\_C rispetto ai valori ottenuti sui pani senza glutine fortificati con le varietà di pollini d'api conservati freschi, potrebbe dipendere dalla conservazione del polline d'api essiccato a temperatura ambiente, che diminuisce anche del 50% in un anno (Bogdanov, 2017).

#### 4 CONCLUSIONI

L'analisi preliminare volta a determinare la composizione chimica, fisica e nutrizionale dei differenti campioni di polline d'api, utilizzati in questo studio, ha confermato l'elevata variabilità di questo prodotto, riscontrata anche nella letteratura esistente, confermando come la loro composizione possa cambiare considerevolmente in funzione delle differenti specie botaniche presenti, della provenienza geografica e dei processi e condizioni di stoccaggio applicate. I pollini d'api analizzati, se pur in maniera variabile, presentano un elevato contenuto in carboidrati e proteine, un basso contenuto in lipidi e contenuti in ceneri simili tra loro. Il profilo nutrizionale dei pollini analizzati mostra un range di valori per i polifenoli totali che va da 1705 a 3634 mg GAE/100 g e percentuali di bio-accessibilità che



raggiungono il 70% (L\_R). L'analisi sulle proprietà fisiche-funzionali ha dimostrato che tutti i pollini d'api oggetto dello studio hanno presentato un elevato indice di dispersione in soluzione acquosa, e quattro di loro hanno mostrato ottime capacità e stabilità schiumogene. Abbiamo riscontrato che il loro impatto nelle formulazioni GFBs con una introduzione del 4% ha determinato per tutti i campioni di impasti fortificati un peggioramento delle proprietà reologiche rispetto al riferimento, mentre l'analisi viscosimetrica ha mostrato che i pollini d'api freschi (5 campioni provenienti dalla Sardegna) hanno influenzato la matrice senza glutine riducendo la viscosità dopo il raffreddamento, indice di un effetto positivo sulla retrogradazione dell'amido. Successivamente è stato determinato un incremento significativo dell'attività  $\alpha$ -amilasica per tutti i campioni fortificati, fattore che ha influenzato la capacità fermentativa degli impasti. Infatti, rispetto al riferimento senza polline, la capacità di sviluppo degli impasti in fase fermentativa è incrementata per alcuni degli impasti fortificati (CIST e di E\_C), mentre per i restanti campioni è diminuita, risultato che evidenzia l'interazione determinata dalle differenti composizioni dei pollini durante il processo di lievitazione. In ogni modo, tutti gli impasti fortificati hanno migliorato la capacità di produzione e di ritenzione gassosa. Solamente il pane fortificato con CIST ha sviluppato un volume specifico simile al controllo, mentre è presente un lieve decremento per le restanti varietà testate. Tuttavia, tutti i GFBs fortificati presentano un miglioramento del colore della crosta e della mollica, e i campioni CIST e L\_R, presentano una struttura alveolare omogenea e coesa, simile al controllo; infatti, questi sono stati gli unici che non hanno presentato un incremento di durezza nell'analisi di consistenza. Per quanto riguarda la composizione chimica dei GFBs fortificati, tutti hanno presentato un decremento dei valori di umidità rispetto al controllo, probabilmente dovuto alle caratteristiche igroscopiche dei pollini d'api. Inoltre, è stato riscontrato un aumento del contenuto in proteine, e un decremento della componente

lipidica per tutti i pani fortificati rispetto al controllo. Infine, per tutti i GFBs fortificati, è stato riscontrato un netto miglioramento del profilo nutrizionale rispetto al controllo: i pani fortificati presentano un incremento del contenuto in polifenoli totali, specialmente della frazione dei solubili, e in due campioni testati è migliorata anche la bioaccessibilità dei polifenoli. Inoltre, si è riscontrato un notevole incremento dell'attività antiossidante nei pani prodotti. In conclusione, il polline d'api si presenta un valido alimento funzionale per i pani senza glutine, poiché è in grado di migliorare alcune delle caratteristiche fisiche e nutrizionali dei pani. Tuttavia, constatata l'elevata variabilità dei pollini d'api nelle sue componenti chimiche e fisiche, sarà necessario approfondire la ricerca sulle possibili interazioni delle diverse tipologie di pollini d'api con le formulazioni per GFBs.

## 5 RIFERIMENTI

- AACC International (2000). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, (11th Ed). Methods 22-08, 56-20.01. The Association: St. Paul, MN, USA
- AACC International (2001). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, (11th Ed). Methods 76-21. The Association: St. Paul, MN, USA
- AACC International. (2005). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists (10<sup>th</sup> Ed.). Methods 10-05.01, 44–15.02 St. Paul, MN, USA.
- Almeida-Muradian, L. B., Pamplona, L. C., Coimbra, S., & Barth, O. M. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(1), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.10.008>
- AOAC (2000) Official Methods of Analysis. 17th Edition, *The Association of Official Analytical Chemists*, Gaithersburg, MD, USA.
- AOAC. (2003) Official Methods of Analysis. Vol.I.17th ed. *Association of Analytical Washington*, DC, USA
- Barbieri, D., Gabriele, M., Summa, M., Leonardi, D., Domenici, V., & Pucci, L. (2020). Fluorescence Spectral Profiles of Bee Pollen Samples from Different Botanical Origins. *Antioxidants* 9, 1001; <https://doi:10.3390/antiox9101001> 1–15
- Barth, O. M., Freitas, A. S., Oliveira, É. S., Silva, R. A., Maester, F. M., Andrella, R. R. S., & Cardozo, G. M. B. Q. (2010). Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: a proposal for technical standardization. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 82(4), 893–902.
- Campos, M. G. R., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., & Ferreira, F. (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, 47(2), 154–161. <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101443>
- Capriles, V. D., & Arêas, J. A. G. (2014). Novel approaches in gluten-free breadmaking: Interface between food science, nutrition, and health. *Comprehensive Reviews in*
- Roberto Arca, “Potenzialità di utilizzo dei prodotti derivati da risorse non convenzionali nelle formulazioni di pane senza glutine” - Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie  
- Curriculum “Produttività delle Piante coltivate” - Ciclo “XXXIII” Università degli Studi di Sassari  
Anno Accademico 2018 - 2021

- Food Science and Food Safety*, 13(5), 871–890. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12091>
- Catassi, C., & Fasano, A. (2008). Celiac disease. In *Gluten-Free Cereal Products and 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. Food Science and Technology International*, 21(7): 523-536 Beverages (pp. 1–27). <https://doi.org/10.1016/B978-012373739-7.50003-4>
- 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. *Food Science and Technology International*, 21(7): 523-536
- Collar, C., Jiménez, T., Conte, P., & Fadda, C. (2014). Impact of ancient cereals, pseudocereals and legumes on starch hydrolysis and antiradical activity of technologically viable blended breads. *Carbohydrate Polymers*, 113, 149–158. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.07.020>
- Conte, P., Del Caro, A., Balestra, F., Piga, A., & Fadda, C. (2018). Bee pollen as a functional ingredient in gluten-free bread: A physical-chemical, technological and sensory approach. *LWT - Food Science and Technology*, 90, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.002>
- Conte, P., Del Caro, A., Urgeghe, P. P., Petretto, G. L., Montanari, L., Piga, A., & Fadda, C. (2019). Nutritional and aroma improvement of gluten-free bread: is bee pollen effective? *LWT- Food Science and Technology*, 118, 108711. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108711>
- Conte, P., Fadda, C., Drabińska, N., & Krupa-Kozak, U. (2019). Technological and nutritional challenges, and novelty in gluten-free breadmaking: A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 69(1), 5–21. <https://doi.org/10.31883/pjfn-2019-0005>
- De-Melo, A. A. M., Estevinho, M. L. M. F., Sattler, J. A. G., Souza, B. R., Freitas, A. da S., Barth, O. M., & Almeida-Muradian, L. B. (2016). Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality

- parameters. *LWT Food Science and Technology*, 65, 808–815.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.014>
- FAO/WHO (2003). Food energy – methods of analysis and conversion factors. *Food and nutrition paper 77*, Rome. ISSN 0254-4752
- Gabriele, M., Parri, E., Felicioli, A., Sagona, S., Pozzo, L., Biondi, C., Pucci, L. (2015). Phytochemical composition and antioxidant activity of Tuscan bee pollen of different botanic origins. *Italian Journal of Food Science*, 27(2), 120–131.  
<https://doi.org/10.14674/1120-1770/ijfs.v191>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0818-9>
- Giannone, V., Lauro, M.R., Spina, A., Pasqualone, A., Auditore, L., Puglisi, I., & Puglisi, G. (2016). A novel  $\alpha$ -amylase-lipase formulation as anti-staling agent in durum wheat bread. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 381-389
- Haines, M. L., Anderson, R. P., & Gibson, P. R. (2008, November). Systematic review: The evidence base for long-term management of coeliac disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 28, pp. 1042–1066.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2008.03820.x>
- Houben, A., Höchstötter, A., & Becker, T. (2012). Possibilities to increase the quality in gluten-free bread production: An overview. *European Food Research and Technology*, Vol. 235, pp. 195–208. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1720-0>
- ICC No. 104/1: Determination of ash in Cereals and Cereal Products. Available online: <https://www.icc.or.at/publications/icc-standards/standards-overview/104-1-standard-method>
- Karabagias, I. K., Karabagias, V. K., Gatzias, I., & Riganakos, K. A. (2018). Bio-functional properties of bee pollen: The case of “bee pollen yoghurt.” *Coatings*, 8(12).  
<https://doi.org/10.3390/coatings8120423>
- Roberto Arca, “Potenzialità di utilizzo dei prodotti derivati da risorse non convenzionali nelle formulazioni di pane senza glutine” - Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie  
 - Curriculum “Produttività delle Piante coltivate” - Ciclo “XXXIII” Università degli Studi di Sassari  
 Anno Accademico 2018 - 2021

- Kaushal, P., Kumar, V., & Sharma, H. K. (2012). Comparative study of physicochemical, functional, antinutritional and pasting properties of taro (*Colocasia esculenta*), rice (*Oryza sativa*) flour, pigeonpea (*Cajanus cajan*) flour and their blends. *LWT - Food Science and Technology*, 48(1), 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.02.028>
- Kostić, A. T., Barać, M. B., Stanojević, S. P., Milojković-Opsenica, D. M., Tešić, Ž. L., Šikoparija, B., Pešić, M. B. (2015). Physicochemical composition and techno-functional properties of bee pollen collected in Serbia. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.031>
- Kostić, A., Milinčić, D. D., Barać, M. B., Shariati, M. A., Tešić, Ž. L., & Pešić, M. B. (2020). The application of pollen as a functional food and feed ingredient—the present and perspectives. *Biomolecules*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/biom10010084>
- Krystijan, M., Gumul, D., Ziobro, R., & Korus, A. (2015). The fortification of biscuits with bee pollen and its effect on physicochemical and antioxidant properties in biscuits. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 640–646. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.075>
- Matos Segura, M. E., & Rosell, C. M. (2011). Chemical Composition and Starch Digestibility of Different Gluten-free Breads. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(3), 224–230. <https://doi.org/10.1007/s11130-011-0244-2>
- Naqash, F., Gani, A., Gani, A., & Masoodi, F. A. (2017, August 1). Gluten-free baking: Combating the challenges - A review. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 66, pp. 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.004>
- Nogueira, C., Iglesias, A., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2012). Commercial bee pollen with different geographical origins: A comprehensive approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(9), 11173–11187. <https://doi.org/10.3390/ijms130911173>
- Ranieri, A., Benelli, G., Castagna, A., Sgherri, C., Signorini, F., Bientinesi, M., Canale, A. (2019). Freeze-drying duration influences the amino acid and rutin content in honeybee-collected chestnut pollen. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(2), 252–255. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.08.011>

- Roman, L., Belorio, M., & Gomez, M. (2019). Gluten-Free Breads: The Gap Between Research and Commercial Reality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(3), 690–702. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12437>
- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., & Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 38, pp. 689–753. <https://doi.org/10.1080/10408699891274354>
- Singh, P., Arora, A., Strand, T. A., Leffler, D. A., Catassi, C., Green, P. H., Makharia, G. K. (2018). Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 16(6), 823-836.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2017.06.037>
- Thakur, M., & Nanda, V. (2020a). Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 98, 82–106. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.001>
- Thakur, M., & Nanda, V. (2018). Exploring the physical, functional, thermal, and textural properties of bee pollen from different botanical origins of India. *Journal of Food Process Engineering*, 43(1), e12935. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12935>
- Tolić, M. T., Krbavčić, I. P., Vujević, P., Milinović, B., Jurčević, I. L., & Vahčić, N. (2017). Effects of Weather Conditions on Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Juice of Chokeberries (*Aronia melanocarpa* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 67(1), 67–74. <https://doi.org/10.1515/pjfns-2016-0009>
- World Gastroenterology Organisation Diagnosis of celiac disease. Available at: <https://www.worldgastroenterology.org/publications/e-wgn/e-wgn-expert-point-of-view-articles-collection/diagnosis-of-celiac-disease>

## 6 TABELLE

Tabella 1 Analisi Palinologiche.

Campione	Codici	Polline predominante > 45 %	Polline d'accompagnamento (15- 45 %)	Pollini meno presenti (3- 15%)	Origine Geografica			
Multif. Cavolicello	CAV	Brassica fruticulosa	63	Cerithe 30	/	Sardegna		
Monof. Castagno	CAST	Castanea sativa	96,7	/	Rubus fruticosus	2,6	Sardegna	
Multif. Leccio1	L_C	Quercus ilex	59	Campanula f.	24,5	Cistus incanus	3,5	Sardegna
Multif. Leccio2	L_R	Quercus ilex	68	Rosmarinus officinalis	28	/	Sardegna	
Multif. Cisto	CIST	Cistus incanus	47,3	Cistus monspeliensis	25,1	Olea	3	Sardegna
		/		Quercus ilex	16,3			
Multif.Essiccato Commerciale	E_C	Cistus ladanifer	46,41	Quercus ilex	30,7	Stachys annua	6,2	Emilia-Romagna
						Erica umbellata gr.	3,3	
						Heracleum (Forma H)	3,1	
						Cercis siliquastrum	2,5	
						Eucalyptus camaldulensis	2,5	



Tabella 2. *Formulazione di base del pane senza glutine prodotto*

<b>Materiali</b>	<b>%</b>
Amido di mais	50
Farina di riso	50
Lievito	3
Sale	1,8
Olio	5
Gomma di Guar	1,5
Fibra di Psyllium	1,5
Zucchero	2,5
H <sub>2</sub> O	90

Tabella 3. *Composizione chimica e caratteristiche fisiche degli sfarinati senza glutine (g/100 g s.s.)*

	Farina di Riso	Amido di Mais
Umidità	11,3±0,08	13,7±0,08
Carboidrati Totali	79,5±0,22	85,4±0,1
Proteina Grezza	8,3±0,08	0,4±0,02
Lipidi Totali	0,3±0,05	0,3±0,07
Ceneri	0,7±0,02	0,1±0,03
WAI (g/g)	2,6±0,15	1,7±0,03
OAC (g/g)	0,9±0,03	1±0,03

Tabella 4. *Composizione chimica dei pollini d'api*

Caratteristiche	Campioni						
	u. m	CAST	CIST	E_C	L_C	CAV	L_R
Umidità	g/100 g	16,3±0,08 f	21,7±0,11 e	14,4±0,15 d	22,9±0,09 c	26,6±0,17 b	32,6±0,39 a
Carboidrati Totali	g/100 g s.s	51,8±0,1 c	54,3±0,74 b	63,6±0,15 a	50,9±0,29 c	36,3±0,69 d	37,2±0,12 d
Proteina Grezza	g/100 g s.s	27,9±0,01 a	19,3±0,76 d	17,6±0,04 e	22,1±0,38 c	28,7±0,73 a	25,7±0,18 b
Grassi Totali	g/100 g s.s	1,3±0,05 d	2,5±0,04 b	2,5±0,04 b	1,5±0,03 c	5,2±0,16 a	1,6±0,05 c
Ceneri	g/100 g s.s	2,7±0,09 b	2,2±0,03 c	2±0,02 d	2,7±0,03 b	3,1±0,05 a	2,7±0,03 b

<sup>1</sup>Media dei valori ±deviazione Standard. Fra le righe, i valori con la stessa lettera non si discostano significativamente l'uno dall'altro secondo il test LSD ( $p < 0,05$ ).

Tabella 5. *Polifenoli solubili, insolubili e bioaccessibili (mg GAE/100 g s.s) e attività antiossidante (%) dei pollini d'api*

Caratteristiche	Campioni					
	CAST	CIST	E_C	L_C	CAV	L_R
P. Solubili	3153,5±4,01 a	1356±32,75 de	1467,9±3,15 cd	1331,9±37,19 e	1866,7±7,16 b	1498,4±120,89 c
P. Insolubili	480,3±2,2 ab	349,5±18,05 d	395,8±10,52 cd	507,9±23,32 a	348,7±9,06 d	428,4±45,35 bc
P. Totali	3633,8±1,81 a	1705,5±14,69 d	1863,6±13,66 cd	1839,9±13,87 cd	2215,4±16,22 b	1926,8±166,24 c
P. Bioaccessibili	879,2±22,69 d	963,1±16,29 c	990,7±30,49 c	1093,1±27,15 b	1043,6±10,03 b	1344,3±13,79 a
Attività antiossidante	96,2±0,08 a	60,1±1,13 d	50,6±0,95 e	67,8±3,19 c	46,3±0,74 f	88,03±0,3 bc

<sup>1</sup>Media dei valori ±deviazione Standard. Fra le righe, i valori con la stessa lettera non si discostano significativamente l'uno dall'altro secondo il test LSD ( $p < 0,05$ ).

Tabella 6. *Caratteristiche reologiche, viscosimetriche e attività  $\alpha$ -amilasica (SN) degli impasti senza glutine.*

Caratteristiche <sup>1</sup>	G' (Pa)		G'' (Pa)		Picco di viscosità (cP)		Breakdown (cP)		Viscosità finale (cP)		Setback (cP)		Tempo di Picco (min)		Temperatura di Pasting (°C)		SN (cP)	
Campioni																		
Controllo	6901±121	a	2030±13	a	4115±11	c	890±196	c	5620±26	a	2394±233	ns	5,8±0,1	ab	79±2	ns	3033±92	a
CIST	5360±34	b	1742±35	b	4138±7	c	844±25	c	5382±23	b	2088±41	ns	5,77±0,05	abc	78±1	ns	2964±74	ab
E_C	4689±327	c	1742±35	c	4341±184	ab	885±83	c	5676±173	a	2220±72	ns	5,87±0	a	78±1	ns	2997±98	ab
L_C	4177±107	d	1431±37	cd	4182±33	bc	1031±40	bc	5455±74	ab	2304±81	ns	5,7±0,04	bcd	77±1	ns	2895±11	ab
CAV	3536±104	e	1196±67	e	4112±98	c	1119±39	ab	5050±88	c	2090±18	ns	5,6±0	e	78±1	ns	2685±37	c
L_R	5732±256	b	1803±137	b	4511±32	a	1243±7	a	5382±132	b	2115±107	ns	5,67±0	de	79±1	ns	2900±22	ab
CAST	3893±36	de	1265±0	de	4174±33	bc	843±1	c	5388±10	b	2057±24	ns	5,8±0	ab	78±1	ns	2870±51	b

<sup>1</sup>Media dei valori  $\pm$ deviazione Standard. Fra le colonne, i valori con la stessa lettera non si discostano significativamente l'uno dall'altro secondo il test LSD ( $p < 0,05$ ).

Tabella 7. Parametri delle curve di rilascio dei gas ottenute al reofermentometro dell'impasto di controllo e degli impasti fortificati senza glutine

Caratteristiche	Controllo	CIST	E_C	L_C	CAV	L_R	CAST
<i>Caratteristiche di sviluppo dei gas</i>							
H'm (mm)	76,9 ± 1,0 d	93,4 ± 0,6 b	85,9 ± 1,4 c	93,4 ± 0,9 b	92,5 ± 4,7 b	98,6 ± 1,5 a	86,7 ± 1,7 c
T'1 (h:min)	00:56 ± 00:07 d	01:14 ± 00:05 b	01:10 ± 00:02 bc	01:27 ± 00:00 a	01:04 ± 00:02 cd	01:07 ± 00:02 bc	01:10 ± 00:02 bc
Volume Totale (Vt)	1184,5 ± 2,1 e	1728,0 ± 1,4 a	1596,0 ± 4,2 d	1702,5 ± 2,1 ab	1634,0 ± 25,5 c	1689,5 ± 13,4 b	1623,0 ± 1,4 c
Volume di Ritenzione (Vr)	1146,0 ± 4,2 e	1456,5 ± 9,2 a	1385,5 ± 10,6 c	1416,0 ± 5,7 b	1341,5 ± 14,8 d	1407,5 ± 10,6 b	1351,0 ± 4,2 d
Volume Rilasciato (CR)	38,0 ± 1,4 c	272,0 ± 7,1 a	210,5 ± 14,8 b	286,5 ± 3,5 a	292,5 ± 40,3 a	281,5 ± 3,5 a	272,0 ± 5,7 a
Vr/Vt:(%)	96,8 ± 0,1 a	84,3 ± 0,5 c	86,8 ± 0,8 b	83,2 ± 0,3 c	82,2 ± 2,2 c	83,4 ± 0,1 c	83,3 ± 0,4 c

<sup>1</sup>Media dei valori ±deviazione Standard. Fra le righe, i valori con la stessa lettera non si discostano significativamente l'uno dall'altro secondo il test LSD ( $p < 0,05$ ).

Tabella 8. *Colore della crosta, della mollica e volume specifico dei GFBs*

Caratteristiche	u.m	Campioni							
		Controllo	CAST	CIST	E_C	L_C	CAV	L_R	
Volume Specifico	mL/g	2,53 ± 0,08 a	2,29 ± 0,04 d	2,51 ± 0,02 a	2,35 ± 0,03 c	2,28 ± 0,02 d	2,26 ± 0,06 d	2,44 ± 0,05 b	
<i>Colore della crosta</i>									
L		76,53 ± 2,47 a	70,33 ± 2,06 c	72,92 ± 4,14 bc	74,1 ± 1,35 ab	72,70 ± 2,14 bc	75,5 ± 0,96 ab	74,9 ± 2,10 ab	
a*		0,86 ± 0,21 c	5,07 ± 1,18 a	2,88 ± 0,91 b	3,4 ± 0,78 b	3,74 ± 0,31 b	1,70 ± 0,79 c	3,2 ± 1,18 b	
b*		14,57 ± 1,46 d	29,08 ± 1,27 a	25,74 ± 2,59 bc	23,5 ± 2,06 c	25,19 ± 0,89 bc	27,4 ± 0,94 ab	23,7 ± 2,89 c	
<i>Colore della mollica</i>									
L		59,73 ± 0,70 a	59,54 ± 0,63 a	57,65 ± 0,89 bc	57,1 ± 0,50 c	57,98 ± 0,86 b	53,9 ± 0,75 d	60,1 ± 0,41 a	
a*		1,02 ± 0,12 a	-1,86 ± 0,09 d	-0,84 ± 0,20 bc	-1,0 ± 0,02 c	-2,19 ± 0,14 e	-3,3 ± 0,18 f	0,77 ± 0,02 b	
b*		4,52 ± 0,23 f	13,24 ± 0,28 d	46,29 ± 0,62 a	13,2 ± 0,35 d	25,95 ± 0,50 b	20,2 ± 0,71 c	9,35 ± 0,13 e	

<sup>1</sup>Media dei valori ±deviazione Standard. Fra le righe, i valori con la stessa lettera non si discostano significativamente l'uno dall'altro secondo il test LSD (p < 0,05)

Tabella 9. *Caratteristiche della mollica*

Caratteristiche	u.m	Controllo	CAST	CIST	E_C	L_C	CAV	L_R
Numero tot								
alveoli	n°	1209 ± 21 a	1052 ± 17 b	1229 ± 20 a	970 ± 12 c	1004 ± 92 bc	640 ± 19,1 d	1165 ± 35 a
Dimensione								
media alveolare	mm2	0,59 ± 0,0 d	0,69 ± 0,05 bc	0,55 ± 0,02 d	1 ± 0,0 b	0,7 ± 0,1 bc	1,1 ± 0,1 a	0,6 ± 0,0 cd
Rapporto								
Alveoli/Parete	%	44 : 56	45 : 55	42 : 58	45 : 55	42 : 58	43 : 57	44 : 56
Area massima								
Alveolare	mm2	27,4 ± 4,94 bc	33,5 ± 7,93 ab	24,3 ± 4,1 c	27,8 ± 2,7 bc	31,45 ± 1,4 ab	36,6 ± 3,9 a	27,9 ± 1,92 bc
Densità								
Alveolare	n° A/cm2	75,54 ± 1,3 a	65,75 ± 1,06 b	76,79 ± 1,3 a	61 ± 0,8 c	62,8 ± 5,7 bc	40,0 ± 1,2 e	72,8 ± 2,2 a

<sup>1</sup>Media dei valori ±deviazione Standard. Fra le righe, i valori con la stessa lettera non si discostano significativamente l'uno dall'altro secondo il test LSD (p < 0,05)

Tabella 10. *Proprietà di struttura dei pani senza glutine*

Caratteristiche	u.m	Campioni <sup>1</sup>								
		Control	CAST	CIST	E_C	L_C	CAV	L_R		
Durezza	N	4,22 ± 0,17 d	4,03 ± 0,12 e	5,06 ± 0,15 a	4,30 ± 0,12 cd	4,47 ± 0,19 c	4,70 ± 0,15 b	4,16 ± 0,08 de		
Elasticità	mm	0,99 ± 0,01 a	0,99 ± 0,00 a	0,99 ± 0,00 ab	0,99 ± 0,01 a	0,99 ± 0,01 a	0,99 ± 0,00 a	0,98 ± 0,01 b		
Coesività		0,56 ± 0,01 a	0,54 ± 0,01 b	0,49 ± 0,00 d	0,54 ± 0,01 b	0,57 ± 0,01 a	0,52 ± 0,01 c	0,53 ± 0,01 c		
Masticabilità	N*mm	2,36 ± 0,11 c	2,17 ± 0,07 d	2,46 ± 0,09 ab	2,31 ± 0,03 c	2,53 ± 0,10 a	2,41 ± 0,06 bc	2,15 ± 0,07 d		
Resilienza		0,32 ± 0,01 a	0,29 ± 0,02 b	0,22 ± 0,01 e	0,28 ± 0,01 bc	0,31 ± 0,01 a	0,27 ± 0,01 cd	0,26 ± 0,02 d		

<sup>1</sup>Media dei valori ±deviazione Standard. Fra le righe, i valori con la stessa lettera non si discostano significativamente l'uno dall'altro secondo il test LSD (p < 0,05)

Tabella 11. *Composizione chimica dei pani senza glutine (g/100 g s.s.)*

Caratteristiche	Controllo	CAST	CIST	E_C	L_C	CAV	L_R
Umidità	42,6 ± 0,32 ab	41,6 ± 0,04 c	41,5 ± 0,06 c	42,0 ± 0,67 bc	39,0 ± 3,2 d	43,3 ± 0,01 a	42,07 ± 0,02 bc
Carboidrati							
Totali	48,5 ± 0,22 d	49,48 ± 0,05 bc	49,79 ± 0,07 b	48,7 ± 0,77 d	53,6 ± 0,0 a	47,6 ± 0,09 e	48,85 ± 0,07 cd
Proteina							
Grezza	4,8 ± 0,21 c	5,36 ± 0,02 ab	5,16 ± 0,01 b	5,2 ± 0,02 b	5,31 ± 0,1 ab	5,5 ± 0,09 a	5,22 ± 0,06 b
Grassi Totali	2,3 ± 0,04 a	1,5 ± 0,02 e	1,6 ± 0,09 d	2,0 ± 0,04 b	1,98 ± 0,02 b	1,6 ± 0,02 de	1,86 ± 0,04 c
Ceneri	2,0 ± 0,05 ns	2,0 ± 0,05 ns	2,0 ± 0,07 ns	1,9 ± 0,03 ns	1,97 ± 0,1 ns	2,0 ± 0,07 ns	2,03 ± 0,03 ns

Media dei valori ±deviazione Standard. Fra le righe, i valori con la stessa lettera non si discostano significativamente l'uno dall'altro secondo il test LSD (p < 0,05).

Tabella 12. Polifenoli e attività antiossidante dei pani senza glutine (mg GAE/100 g s.s).

Caratteristiche	Campioni							
	Control	CAST	CIST	E_C	L_C	CAV	L_R	
<i>Polifenoli</i>								
Solubili	14,2 ± 1,1 e	87,6 ± 0,10 a	39,3 ± 2,5 d	38,5 ± 1,1 d	60,7 ± 4,6 b	56,2 ± 1,1 bc	51,7 ± 0,4 c	
Insolubili	110,8 ± 1,2 e	123 ± 3,33 bc	120 ± 1,2 cd	116 ± 0,1 d	130,1 ± 1,2 a	126 ± 1,2 b	119 ± 1,1 d	
PI/PS	7,8 ± 0,7 a	1,4 ± 0,04 e	3,05 ± 0,2 b	3,0 ± 0,1 b	2,1 ± 0,14 c	2 ± 0,02 c	2 ± 0,04 c	
Totali	125,0 ± 0,1 f	211 ± 3,42 a	159 ± 3,7 e	155 ± 1,0 e	190,8 ± 5,8 b	182 ± 2,3 c	170 ± 0,7 d	
Bioaccessibili	109,0 ± 3,3 cd	110 ± 3,14 cd	106 ± 1,3 e	114 ± 5,7 bc	125,2 ± 3,1 a	120 ± 4,7 ab	113 ± 0,3 bcd	
Bioaccessibilità (%)	87	52	67	74	66	66	66	
AR (%)	33 ± 0,48 f	82 ± 0,53 a	54 ± 0,55 e	53 ± 0,5 e	65 ± 1,04 c	73 ± 0,12 b	60 ± 4,5 d	

<sup>1</sup>Media dei valori ±deviazione Standard. Fra le righe, i valori con la stessa lettera non si discostano significativamente l'uno dall'altro secondo il test LSD ( $p < 0,05$ )

## 7 FIGURE

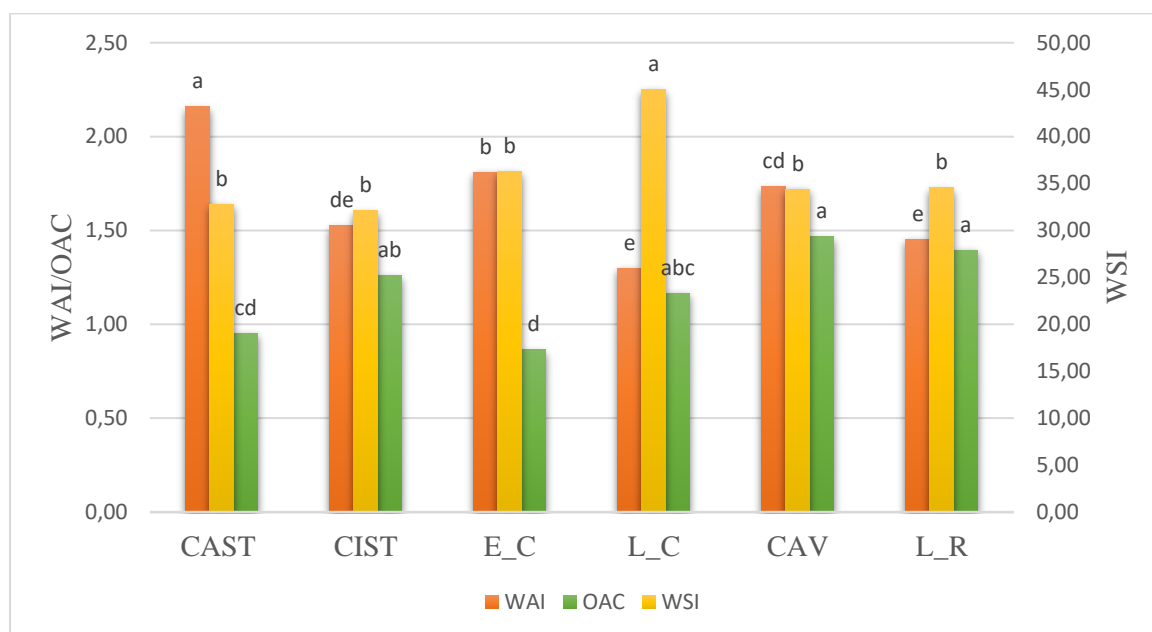


Figura 1. Proprietà fisiche dei pollini d'api. WAI: indice di assorbimento dell'acqua; WSI: indice di solubilità in acqua; OAC: Capacità di assorbimento dell'olio.

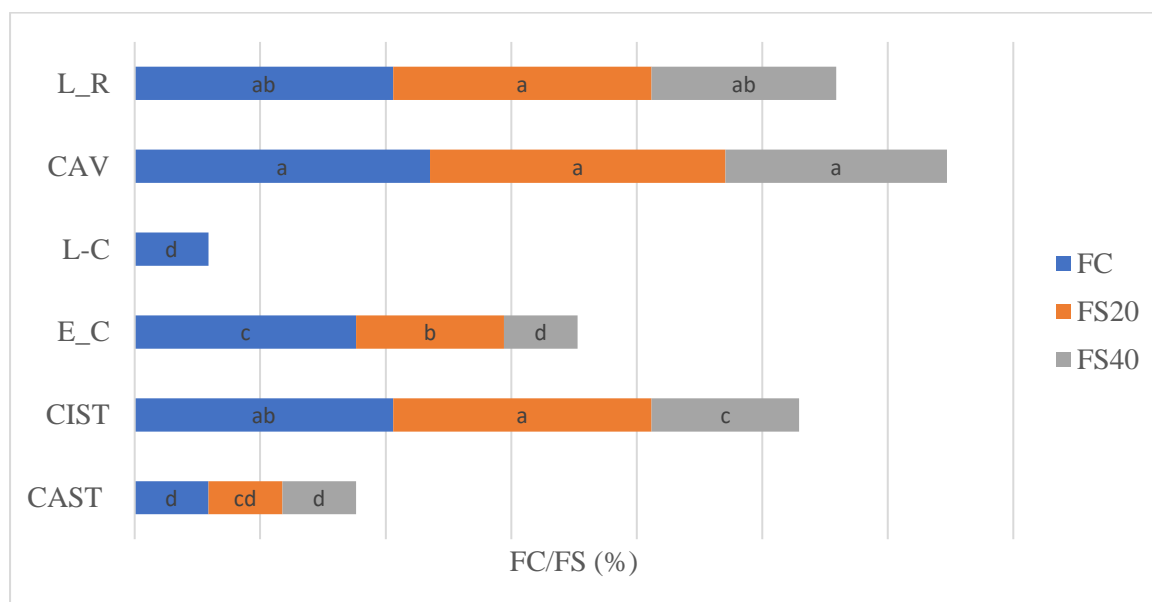


Figura 2. Proprietà schiumogene dei pollini d'api. FC: Capacità Schiumogena; FS20 e FS40: Satabilità Schiumogena dopo 20 e 40 minuti di stasi.



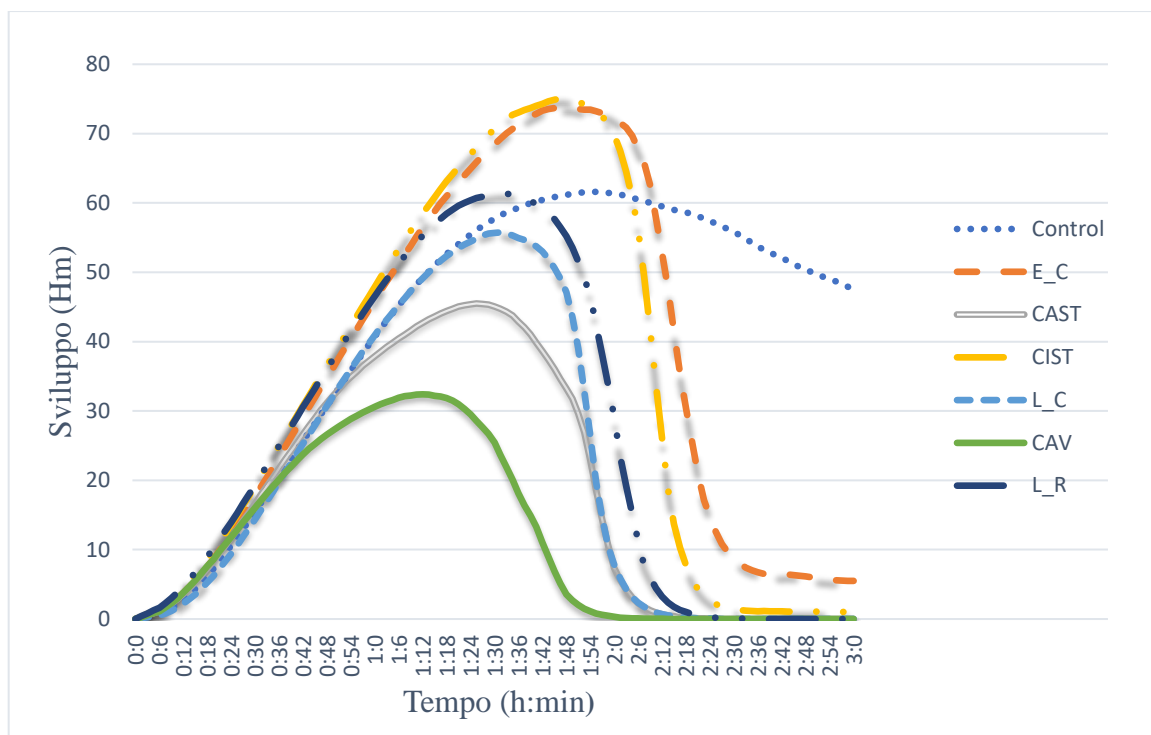


Figura 3. Curve di sviluppo ottenute al reofermentometro dell'impasto di controllo e degli impasti fortificati senza glutine

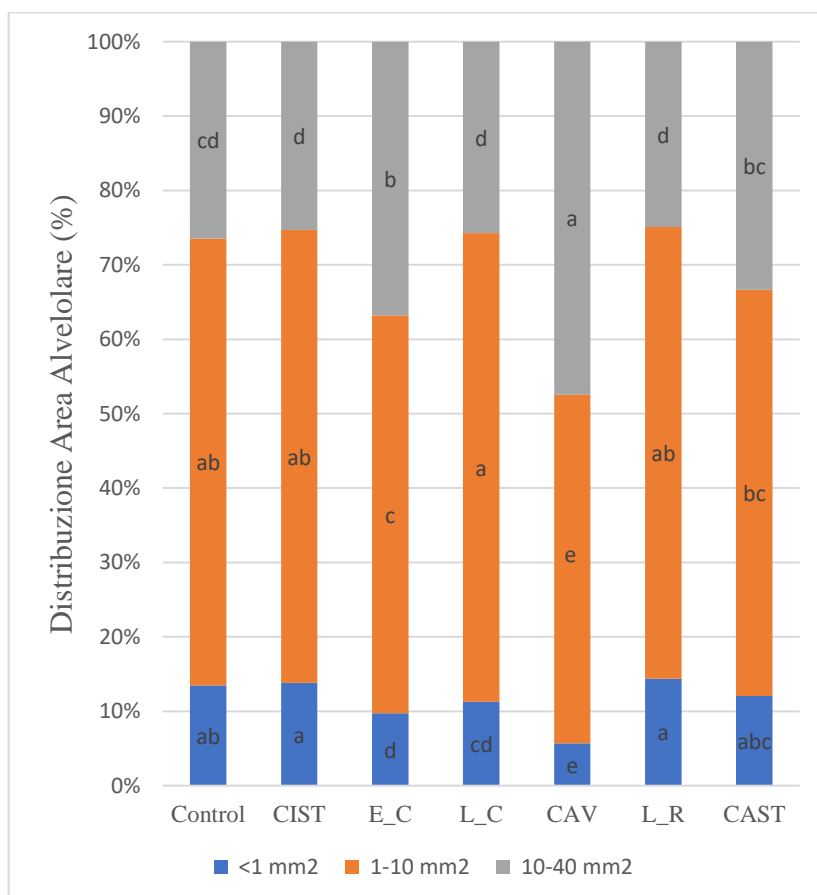


Figura 4. Distribuzione area Alveolare.

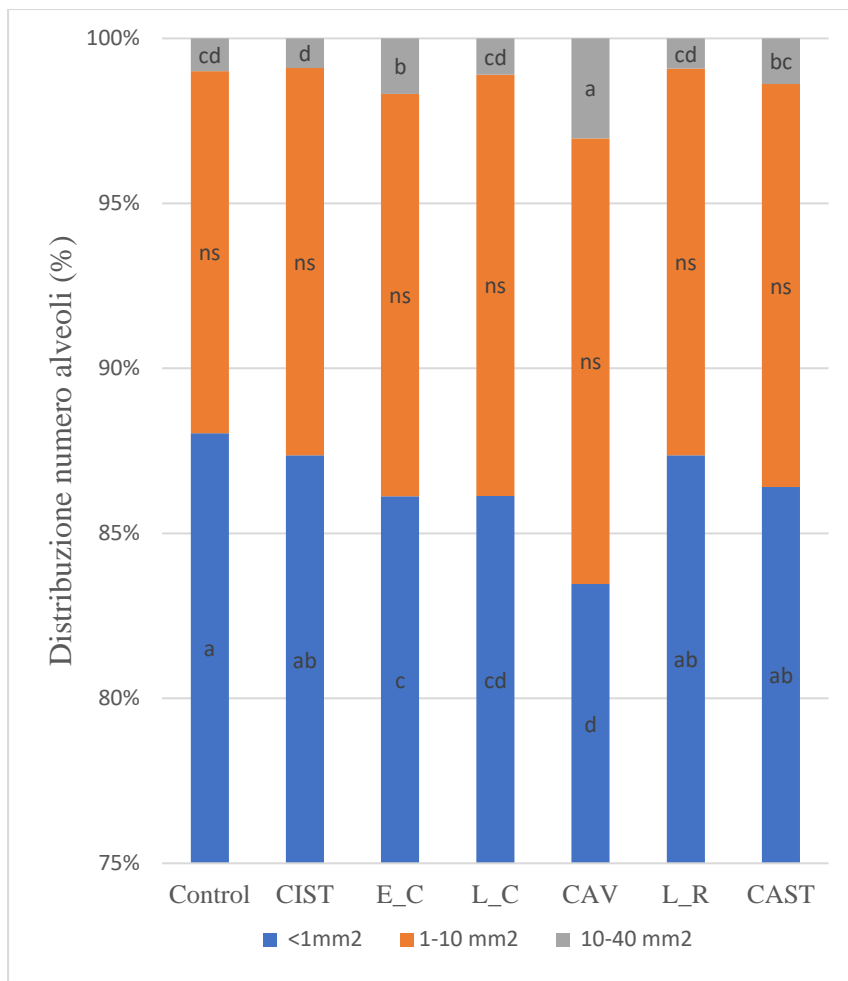


Figura 5. *Distribuzione numero Alveoli.*

## CAPITOLO 4

### FARINA DI GHIANDE: STUDIO DELL'EFFETTO DELLA SUA COMPONENTE AMIDACEA SULLE PROPRIETÀ FISICO-CHIMICHE E NUTRIZIONALI DI UN PANE SENZA GLUTINE

#### 1 INTRODUZIONE

Per gli individui che soffrono di malattia celiaca (CD) il glutine causa una risposta immunologica che provoca un'inflammatione cronica intestinale con lesioni dell'intestino tenue, accompagnate dalla perdita della capacità di assorbimento da parte dei villi intestinali, iperplasia delle cripte, e conseguente cattiva digestione e malassorbimento dei nutrienti (Trier, 1991; Kagnoff, 2005; Hall et al., 2009). Una dieta continua e intransigente priva di glutine (GFD) è l'unica terapia disponibile per i pazienti affetti da CD, per la remissione dei sintomi e delle implicazioni annesse. La crescente domanda di pane senza glutine (GFB) ha portato allo sviluppo di un'ampia gamma di prodotti che cercano di simulare la struttura del pane ottenuto con farina di frumento visto e considerato che la legislazione vigente in Europa consente di riportare in etichetta la dicitura "senza glutine" a patto che il contenuto di glutine sia inferiore a 20 ppm (EU 609/2013 e 828/2014). Il glutine è il principale complesso proteico presente nei pani tradizionali con frumento, ha un'elevata capacità di conferire all'impasto delle caratteristiche viscoelastiche in grado di intrappolare i gas sia durante la lievitazione sia nella fase iniziale del processo di cottura (Gallagher, Gormley, & Arendt, 2004). La ricerca sui prodotti senza glutine si è quindi focalizzata sulla valutazione di numerosi sfarinati e/o additivi alternativi al fine di individuare quelli più promettenti nella capacità di emulare la coesione e l'elasticità di un impasto convenzionale con glutine. Gli ingredienti principali dei prodotti senza glutine includono amidi, farine di cereali/pseudocereali (senza glutine), idrocolloidi e proteine. Gli

ingredienti minori che vengono aggiunti per aiutare a costruire e rafforzare l'impasto e la struttura del GFB sono enzimi ed emulsionanti, spesso usati in combinazione per migliorare in maniera sinergica le caratteristiche reologiche e nutrizionali dei prodotti senza glutine. (El Khoury et al., 2018).

Negli ultimi anni, diverse ricerche hanno mostrato risultati positivi sull'utilizzo della farina di ghiande nella produzione di alimenti che potrebbero giustificare un interesse industriale per lo sfruttamento di tale risorsa (Korus et al., 2015; Parsaei, Goli, & Abbasi, 2018; Szablowska & Tańska, 2020). Questo interesse è giustificato dal possibile sfruttamento di risorse naturali marginali per assicurare l'accesso di tutti i popoli a cibi sicuri, nella prospettiva di sviluppo di nuovi sistemi agricoli maggiormente integrati nel sistema socioculturale moderno (Vinha et al., 2016). Le ghiande sono i frutti di numerose specie di alberi (circa 600) appartenenti alla famiglia delle *Fagaceae*, Genere *Quercus L.*, la maggior parte di esse è distribuita nelle regioni temperate subtropicali e tropicali dell'emisfero settentrionale. La farina ottenuta è spesso caratterizzata da un alto contenuto di tannini: le sostanze più presenti sono le forme idrolizzabili dell'acido gallico e pirogallolo, ma variano a seconda della specie (Vinha et al., 2016). I tannini, pur presentando ottime caratteristiche antimicrobiche e antiossidanti, contenuti in elevate quantità (fattore che caratterizza la maggior parte delle specie) conferiscono proprietà astringenti e un aroma acre alla farina di ghiande, per questo motivo è spesso necessario un particolare pre trattamento delle ghiande per ridurre il contenuto (i trattamenti maggiormente utilizzati sono processi di lavaggio in acqua e/o bollitura dei frutti) (Łuczaj, Adamczak, Duda, & Adamczak, 2014; Salkova et al., 2011). Le caratteristiche principali della farina di ghiande, determinate dalla recente bibliografia d'interesse, sono state riportate da Szablowska & Tańska, (2020): umidità (5,4-22,05 %), carboidrati (75,22-84,09 %), proteine (4,32-5 %), lipidi (8,44-13,86 %), fibre (10,89-17,9 %), ceneri (1,81-2,04 %). La farina di ghiande è stata recentemente

utilizzata come ingrediente per migliorare le caratteristiche dei pani senza glutine (GFBs), determinando risultati positivi dal punto di vista nutrizionale e tecnologico (Korus et al., 2015; Skendi et al., 2018; Martins et al., 2020a;2020b). La caratterizzazione degli impasti senza glutine ha mostrato impatti positivi sulla reologia con incrementi delle caratteristiche viscoelastiche per incorporazioni del 23 % di farina di ghiande, e si è dimostrata una possibile risorsa di sostanze bioattive che migliorano la attività antiossidante complessiva dei GFBs (Martins et al., 2020; Martins et al., 2020a). Risultati positivi sono stati ottenuti anche da Korus, Witczak, Ziobro, & Juszczak, (2015), che sostituendo la farina convenzionale con quella di ghiande nelle formulazioni senza glutine con un tasso pari al 20 % hanno dimostrato un miglioramento sul volume specifico e sulle caratteristiche fisiche della mollica. Successivamente Skendi, Mouselimidou, Papageorgiou, & Papastergiadis, (2018) introducendo farina di ghiande per l'ottenimento di GFBs, hanno constatato un miglioramento del colore, dell'accettabilità sensoriale e del contenuto finale di polifenoli rispetto al controllo, ma a scapito del volume specifico per livelli di aggiunta troppo elevati. Correia, Nunes, & Beirão-da-Costa, (2013) hanno rilevato che l'amido di ghiande ha una consistenza tale da renderlo un buon addensante e stabilizzante, caratteristiche estremamente promettenti per un utilizzo nell'industria alimentare.

Nei GFBs l'assenza di glutine rende fondamentale il ruolo dell'amido nel fornire struttura e consistenza, condizionando le proprietà dei prodotti finali e intermedi che sono strettamente dipendenti dal tipo di amido utilizzato in termini di origine botanica, dimensione delle particelle, contenuto di amilosio/amilopectina, trattamenti dell'amido (utilizzo di amidi modificati) e interazioni dell'amido stesso con gli altri ingredienti (Witczak et al., 2016). La farina di ghiande presenta un contenuto totale di amido variabile (31-51%) così come le sue proprietà strutturali, che cambiano a seconda del luogo d'origine, della specie e dai processi tecnologici utilizzati (essicamento, trattamenti per

ridurre il contenuto di tannini, estrazione dell'amido) (Cappai, Nieddu, Sanna, & Pinna, 2013; Correia et al., 2013; Zhang et al., 2019). L'obiettivo di questa ricerca è stato di valutare la farina di ghiande come risorsa di amido attraverso l'applicazione di un processo preliminare per ottenere un estratto amidaceo da testare come ingrediente funzionale nel miglioramento delle caratteristiche tecnologiche e nutrizionali dei GFBs.

## 2 MATERIALI E METODI

### 2.1 Materie prime

I pani senza glutine sono stati prodotti utilizzando farina di riso (RF), amido di mais (CS), gomma di Guar (GG) e fibra di *Psyllium*; Tutti gli ingredienti su elencati sono stati acquistati da Chimab (Chimab Food Ingredient Solutions, Campodarsego, PD, Italia). La farina di ghiande (FG) (derivata dalle specie *Quercus ilex* e *Quercus rotundifolia*) è stata acquistata tramite l'azienda TerriuS (Marvão, Alentejo, Portugal). Nella formulazione sono stati utilizzati anche olio di girasole, lievito fresco, sale e zucchero, i quali sono stati acquistati in un supermercato locale.

### 2.2 Prodotti chimici

I prodotti chimici analitici utilizzati sono di seguito riportati:

metanolo, acetone, etere di petrolio (40-60 °C), acido solforico (96%), acido cloridrico (37%), acido tricloroacetico (puro), bicarbonato di sodio sono stati acquistati dalla Carlo Erba Reagents (Cornaredo, MI, Italia). Pepsina da mucosa gastrica suina, pancreatina da pancreas suino, reagente fenolo di Folin-Ciocalteu, acido gallico, radicale 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH●) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), mentre i sali di sodio dell'acido colico (99%) e dell'acido desossicolico (99% extra puro) sono stati comprati da Acros Organics (Thermo Fisher Scientific, NJ, USA). Prodotti chimici e reagenti per effettuare il kit della Megazyme K-AMYL 06/18.

### 2.3 *Processo di estrazione dell'amido dalla farina di ghiande*

La procedura di estrazione e purificazione dell'amido dalla farina di ghiande (EFG) è stata eseguita utilizzando il metodo proposto da Correia & Beirão-Da-Costa, (2012) con alcune modifiche. La seguente procedura di estrazione è stata ripetuta diverse volte: un campione di 500 g di farina di ghiande è stato disciolto tramite agitazione magnetica in 1000 mL di NaOH allo 0,25% fino alla completa dissoluzione. La soluzione è stata poi conservata per 24 h in ambiente refrigerato a 5 °C. Per poter separare l'amido presente nella farina è stato utilizzato un setacciatore automatico con movimento vibrante, sul quale sono stati sovrapposti dei setacci. La setacciatura è stata eseguita con un setaccio di 200 µm ed uno di 125 µm, per 20 min. Il residuo ottenuto sul fondo è stato centrifugato a 800 g per 15 min, e la parte liquida è stata eliminata. Il precipitato è stato riportato in soluzione con acqua ed è stato nuovamente centrifugato. La componente estratta è stata essiccata a 40 °C per 48 h, e il risultato delle estrazioni è stato omogenizzato e macinato.

### 2.4 *Composizione chimica e analisi delle proprietà fisiche*

Il livello di umidità e contenuti di ceneri dell'amido di mais (AM), farina di riso (RF), farina di ghiande (FG) e relativo all'estratto di farina di ghiande (EFG) sono stati determinati secondo i metodi ufficiali standard AACC 44-15.02 e ICC 104-1, rispettivamente. Il contenuto d'azoto totale tramite l'analizzatore elementare (CHN 628, LECO, St. Joseph, MI, USA), con coefficiente di conversione proteica di 6,25. Il contenuto totale di lipidi è stato determinato utilizzando il metodo AOAC 2003.06, mediante lo strumento SER158 Solvent AutoExtractor (VELP), usando come solvente l'etere di petrolio con tre ripetizioni per ogni campione. I carboidrati totali sono stati calcolati per sottrazione: 100 - (Umidità + Proteine + Lipidi + ceneri) (FAO, 2003). Il rapporto Amiloso/Amilopectina è stato determinato tramite il kit della Megazyme K-AMYL 06/18. Le proprietà fisiche sono state determinate seguendo il metodo riportato da Kostić et al. (2015), per valutare la capacità di

assorbimento dell'olio (OAC), il metodo di Kaushal et al. (2012) per determinare l'indice di solubilità dei campioni in una soluzione acquosa (WSI) e il metodo AACC 56-20.01 (AACC, 2001) per l'indice di assorbimento dell'acqua (WAI). Tutte le analisi di caratterizzazione delle proprietà fisiche sono state eseguite utilizzando solamente AM e FR per quanto riguarda il campione di controllo, mentre per i formulati sperimentali (A20, A40, A60), è stata sostituito l'amido di mais con EFG con le rispettive percentuali di aggiunta descritte nel paragrafo 2.6.

### *2.5 Determinazione delle frazioni polifenoliche e dell'attività antiossidante delle farine/amido*

Il contenuto di polifenoli solubili, insolubili e bio-accessibili è stato determinato tramite le procedure descritte da Conte et al. (2019): la determinazione del contenuto di polifenoli solubili è stata effettuata con 2 g di campione per FR e AM e 1 g per FG e EFG.

I campioni sono stati sottoposti a due estrazioni successive utilizzando ogni volta 4 mL di una soluzione composta da acido cloridrico (37%), metanolo, acqua (1/80/10, v/v/v), tenuti in agitazione a temperatura ambiente per 2 h. Il surnatante ottenuto dopo due successive estrazioni è stato filtrato, combinato e utilizzato per la determinazione della frazione solubile. La frazione insolubile è stata determinata utilizzando il residuo della estrazione precedente, posto in soluzione con 5 mL metanolo e acido solforico concentrato (10:1, v/v), ed incubato in un bagnetto termostato a 85 C° per 20 h in agitazione costante a 120 rpm. L'analisi per determinare i polifenoli insolubili è stata condotta sul surnatante.

Gli estratti ottenuti sono stati trattati tramite il metodo Folin-Ciocalteu (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1998): è stata composta una miscela aggiungendo una quota di estratto (0,5 mL per i campioni EFG e FG, mentre 2 mL per AM e FR) 0,5 mL di Folin, 10 mL di bicarbonato di Sodio 7,5% e portati a volume in un matraccio da 25 mL. Dopo un'ora di incubazione al buio le miscele sono state analizzate tramite lo



spettrofotometro (UV-Vis Cary 3500 Engine, Agilent Technologies, Melbourne, Australia) a 750 nm. Le rette di calibrazione sono state fatte usando l'acido gallico e i risultati (media di due repliche) sono stati espressi come mg GAE/100 g di s.s di farina/amido.

Per la determinazione del contenuto di polifenoli bioaccessibili sono stati utilizzati 0,5 mL per i campioni EFG e FG, mentre 2 mL per AM e FR. Il processo estrattivo prevede una digestione enzimatica “*in vitro*” che consta principalmente in due fasi successive: una fase che riproduce la digestione gastrica ed una che riproduce la digestione intestinale. Per effettuare la simulazione gastrica, i campioni sono stati addizionati con 20 mL di acqua distillata e 1 mL di pepsina in soluzione 0,1 M, e tramite un bagnetto termostato, posti in agitazione a 120 rpm per 1 h alla temperatura di 37°C. Per rispettare le condizioni di una simulazione gastrica, prima dell'incubazione nel bagnetto, i campioni sono stati acidificati fin a pH 2 tramite una soluzione 1 M di HCl. Successivamente, la digestione è stata interrotta con una soluzione 1 M di NaHCO<sub>3</sub> sino al valore di pH 7,2. Per effettuare la simulazione della digestione intestinale ai campioni sono stati addizionati 5 mL di una soluzione contenente bile/pancreatina e 5 mL di soluzione contenente NaCl/KCl e lasciati a temperatura ambiente per 2,5 h. Successivamente i campioni sono stati centrifugati a 3500 rpm x 10 min e il surnatante utilizzato per la determinazione dei polifenoli bioaccessibili, dopo la precipitazione delle proteine mediante uso dell'acido tricolor-acetico (TCA) al 20 %. L'analisi procede alla determinazione tramite il metodo precedentemente descritto per le frazioni solubili e insolubili con Folin-Ciocalteau (Singleton, Orthofer and Lamuela-Raventós, 1998), utilizzando 2 mL di estratto.

L'attività antiossidante dei radicali liberi è stata determinata tramite il metodo descritto da (Collar, Jiménez, Conte, & Fadda, 2014) tramite il DPPH. Il metodo costituito da due estrazioni successive consiste nel porre 1 g di campione in 20 mL di soluzione MeOH:H<sub>2</sub>O (50:50 v/v pH 2), tenuto in agitazione magnetica a temperatura ambiente per 1 h, è stato

successivamente centrifugato per 10 min a 2500 g, con recupero del surnatante. Il residuo è stato addizionato di 20 mL di acetone/H<sub>2</sub>O (70:30 v/v), e nuovamente posto in agitazione per 1 h a temperatura ambiente. Dopo la centrifugazione (10 min a 2500 g), il surnatante ottenuto è stato combinato con il precedente e diluito sino a 50 mL con metanolo. Il metodo prevede la determinazione dell'attività anti-radicalica (AR) tramite il DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl): sono state utilizzate delle cuvette da 4 mL, in cui sono stati posti 2,9 mL di una soluzione composta da DPPH/ metanolo (0,025 g/L) e successivamente sono stati aggiunti 0,1 mL della soluzione finale. Tramite l'impiego di uno spettrofotometro (UV-Vis Cary 3500 Engine, Agilent Technologies, Melbourne, Australia) l'assorbanza è stata letta a 515 nm per ogni minuto fino al raggiungimento del plateau (60 min). Per il bianco di riferimento è stato usato metanolo. AR è stata calcolata tramite l'equazione  $AR = [(DPPH \text{ iniziale} - DPPH \text{ plateau}) \times 100] / DPPH \text{ iniziale}$ , effettuando la media di due repliche per ogni campione esaminato.

## 2.6 Processo di produzione degli impasti e di panificazione

Il campione di controllo senza glutine è stato preparato utilizzando la seguente formulazione convenzionale, con la quantità degli ingredienti basate sulla totalità di AM e RF: AM (50%), RF (50%), lievito di birra (3%), sale (1,8%), olio di girasole (5%), gomma di guar (1,5%), fibra di *Psyllium* (1,5%), zucchero (2,5 %), acqua (90%). Per valutare l'estratto di farina di ghiande (EFG) come potenziale ingrediente per i GFBs, sono stati preparati 3 campioni con sostituzioni crescenti del 20 %, 40 % e 60 % sull'amido di mais, che sulla base totale senza glutine risultano pari al 10 %, 20%, 30%. Come riporta Korus et al. (2015) relativamente alla farina di ghiande, anche l'EFG è in grado di incrementare notevolmente la capacità d'assorbimento dell'acqua, e per tale ragione si è deciso di uniformare la consistenza degli impasti, tramite l'uso di un testurimetro TA-XT2 plus (Stable Micro Systems, UK) con il test Back Extrusion Rig (A/BE-d 35), in modo da

riportare tutti gli impasti prodotti allo stesso valore di durezza registrato dal controllo (7N), applicando la metodica di Korus et al. (2015). I volumi d'assorbimento dei 4 campioni ottenuti, sono stati aggiustati tramite correlazione lineare fra le prove attuate, e sono stati utilizzati come riferimento per le successive analisi (GF control=90%; AS20=95,8%; AS40=102,8%; AS60= 110,8%). La preparazione dei campioni degli impasti e di pane per le analisi reologiche è stata eseguita tramite l'uso di una impastatrice planetaria (KitchenAid, Model 5KPM50, St. Joseph, MI, USA) equipaggiata con una frusta piatta (L5K7SFB). La procedura di impastamento è stata standardizzata per tutti i campioni ed eseguita nella seguente modalità: gli sfarinati (base + idrocolloidi) sono stati premiscelati a secco, mentre l'acqua è stata suddivisa in aliquote nelle quali sono stati disciolti lievito, zucchero e sale. Il processo d'impastamento è durato 13 min (5 min a vel 1 e 8 min a vel 2). Gli impasti ottenuti sono stati divisi e formati in cassette in 3 repliche da 250 g, posti in una camera di lievitazione (30 °C-90% RH): la lievitazione è stata monitorata utilizzando dei cilindri graduati, per un tempo massimo di 1,5 h. In seguito, i campioni sono stati cotti a 200 °C per 30 minuti in un forno elettrico (Europa, Molina di Malo, VI, Italia). Prima di procedere al taglio e alle successive analisi, sono state fatte trascorrere 2 h per il completo raffreddamento dei pani ottenuti.

## 2.7 Misure reologiche degli impasti

### 2.7.1 Proprietà viscosimetriche

Tramite l'ausilio dello strumento Rapid Visco Analyser (RVA-4, Newport Scientific, Warriewood, Australia) sono state determinate le proprietà di pasting, le quali permettono di identificare alcune caratteristiche intrinseche degli sfarinati. Il test "General Pasting" è stato eseguito secondo il metodo AACC 76-21 (AACC, 2000), con impostazioni "standard 1" e 3,5 g di campione disperso in 25 mL di acqua, quantità corrette in base all'umidità iniziale come riportato da metodo. Per valutare le proprietà viscosimetriche sono stati

introdotti nel canister solamente gli ingredienti principali (FR +AM per il controllo e FR+AM+EFG nelle varie percentuali di sostituzione). I campioni sono stati sottoposti ad un ciclo di riscaldamento e raffreddamento alle seguenti temperature: 2 min a 50°C, riscaldamento graduale a 95°C, mantenimento a 95°C per 2 min e 30 sec, raffreddamento a 50°C e mantenimento di questa temperatura per due min. Le analisi sono state condotte in doppio e sono stati misurati i seguenti parametri: il picco di viscosità (cP), Trough (cP), la viscosità finale (cP), il tempo di picco (min), la temperatura di pasting (°C). Tutte le misurazioni sono state effettuate in doppio.

### *2.7.2 Attività $\alpha$ -amilasica e proprietà fisiche*

L'attività amilasica è stata determinata tramite lo strumento RVA (Rapid Visco Analyser - RVA-4, Newport Scientific, Warriewood, Australia) utilizzando il metodo basato sullo Stiring Number (SN) che segue la metodica ufficiale AACC 22-08 (AACC, 2000). Il test consiste in un processo standard di riscaldamento del campione a 95 °C per 3 min, ed è stato effettuato con 3,5 g di campione posti all'interno del contenitore in alluminio con l'aggiunta di 25 mL di acqua distillata, quantità corrette considerando l'umidità di partenza degli sfarinati come riportato da metodo. L'attività enzimatica è stata espressa in Stiring Number (SN), definita come la viscosità apparente ottenuta al 180° secondo di una sospensione di farina sottoposta al trattamento termico. Utilizzando il programma software Thermocline per Windows sono stati calcolati i parametri delle curve ottenute. Tutte le misurazioni sono state effettuate in doppio. Successivamente, sono state effettuate le analisi fisiche WAI, WSI e OAC sulla formulazione di base degli impasti prodotti, tramite le metodiche precedentemente descritte per gli sfarinati (AACC, 2001; Kostić et al., 2015).

### 2.7.3 *Proprietà di lievitazione*

Le proprietà di lievitazione degli impasti sono state testate attraverso l'ausilio di un reofermentometro F3 (Chopin, Parigi, Francia) utilizzando un protocollo adattato per impasti GF che prevede l'inserimento nella camera di fermentazione di un campione di 315 g incubato a 30 °C per 3 ore (tempistica che permette di valutare anche il collasso degli impasti), con pistone privo di pesi. Tramite questa analisi è stata determinata la curva di rilascio dei gas, con i relativi parametri. Hm (mm), T1 (h:min) della curva di sviluppo e H'm (mm), T'1 (h:min), il Volume Totale (Vt) (CO<sub>2</sub>), il Volume di Ritenzione (Vr) (CO<sub>2</sub>), Volume Rilasciato (CR) (CO<sub>2</sub>) e il rapporto Vr/Vt per la curva di rilascio dei gas. Il test è stato eseguito in doppio per tutti i campioni.

## 2.8 *Analisi sul pane*

### 2.8.1 *Volume specifico*

Il volume apparente dei campioni di pane è stato misurato secondo il metodo AACC 10-05.01 (AACC, 2005) e il volume specifico (mL/g) è stato calcolato come volume del pane/peso del pane.

### 2.8.2 *Determinazioni del colore*

Il colore è stato misurato il giorno della cottura sia sulla crosta che sulla mollica utilizzando un colorimetro tristimolo (Minolta DP-301, Konica Minolta Sensing, Osaka, Giappone) equipaggiato con una unità di misurazione CR\_300. Il colore della crosta è stato misurato in tre punti (uno centrale e due distali) su 3 repliche per ogni campione di GFBs, e il colore della mollica è stato misurato centralmente usando 2 fette centrali delle 3 repliche di GFBs. Prima di ogni analisi lo strumento è stato calibrato tramite piastrella standard bianca e i risultati sono stati espressi utilizzando la scala colorimetrica di Hunter. Sono stati determinati i seguenti parametri: L\* che indica la luminosità (L = 0 [nero] e L =

100[bianco]), a\* indica un passaggio di colore dal verde al rosso (-a = verde e +a = rosso), e b\* indica la variazione del colore dal blu al giallo (-b = blu e +b = giallo).

### 2.8.3 *Analisi del profilo di Texture*

La valutazione delle proprietà meccaniche del pane è stata effettuata mediante il test di Texture Profile Analysis (TPA) su fette di 20 mm di spessore utilizzando un testurimetro TA-XT2 plus (Stable Micro Systems, UK). Una geometria cilindrica da 25 mm di diametro è stata utilizzata per eseguire una doppia compressione, per 50% dell'altezza rispetto allo spessore iniziale, con velocità costante di 1mm/s e un intervallo di 30 s tra le compressioni. I parametri misurati sono stati: la durezza (N), l'elasticità all'origine (mm), la coesività, masticabilità (N \*mm), la resilienza.

### 2.8.4 *Analisi della struttura alveolare della mollica*

Per valutare le caratteristiche alveolari della mollica, sono state acquisite delle immagini con uno scanner fotografico Epson Perfection - V500 (Epson, Suwa, Giappone) ad una risoluzione di 360 dpi. Le immagini, dopo esser stata selezionata una superficie centrale di 3x3 cm, sono state sottoposte ad analisi utilizzando il software Image J (Image Pro-Plus v. 1.52a Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, USA) al fine di ottenere i seguenti parametri: tre categorie espresse in rapporto percentuale per identificare la distribuzione dell'area alveolare e la distribuzione del numero degli alveoli in esse contenute (<1 mm<sup>2</sup>, 1-9,99 mm<sup>2</sup>, 10-40mm<sup>2</sup>), il numero totale degli alveoli (n°), la dimensione media (mm<sup>2</sup>) e massima alveolare (mm<sup>2</sup>), il rapporto alveoli/ area totale (n° A/cm<sup>2</sup>) e la densità alveolare (n° A/cm<sup>2</sup>).

### 2.8.5 *Composizione chimica del pane*

Il livello di umidità ed il contenuto di ceneri dei pani sono stati determinati secondo i metodi ufficiali standard AACC 44-15.02 e ICC 104-1, rispettivamente, con tre repliche per entrambe le analisi. Il contenuto di proteine grezze (CP) è stato misurato con due ripetizioni

per ogni campione secondo il metodo Kjeldahl (AOAC, 2000), utilizzando il coefficiente di conversione di 6,25, mentre il contenuto totale di lipidi è stato determinato utilizzando il metodo AOAC 2003.06, mediante lo strumento SER158 Solvent AutoExtractor (VELP), usando come solvente l'etere di petrolio, con tre ripetizioni per ogni campione. I carboidrati totali sono stati calcolati per determinazione indiretta tramite la seguente formula:  $100 - (\text{Umidità} + \text{Proteina} + \text{Lipidi} + \text{ceneri})$  (FAO, 2003).

#### *2.8.6 Determinazione delle frazioni polifenoliche e dell'attività antiossidante del pane*

Il contenuto di polifenoli solubili, insolubili e bioaccessibili è stato determinato tramite le metodiche descritte da (Conte et al., 2019), allo stesso modo della procedura precedentemente descritta per la determinazione effettuata sulle materie prime, utilizzando 2 g di GFBs essiccato e macinato. Le rette di calibrazione per tutte le frazioni polifenoliche, sono state ottenute usando l'acido gallico come standard e i risultati (media di due repliche) sono stati espressi come mg GAE/100 g di s.s. L'attività antiossidante è stata eseguita tramite il metodo Collar et al. (2014), con alcune modifiche. La procedura è stata effettuata con 2 g di campione di pane secco macinato e i quantitativi delle soluzioni estrattive sono stati dimezzati [10 mL di soluzione MeOH: H<sub>2</sub>O per la prima estrazione (50:50 v/v pH 2), è 10 mL di acetone/H<sub>2</sub>O (70:30 v/v) per la seconda]. Il surnatante combinato delle due estrazioni successive è stato portato a volume in un matraccio di 25 mL, successivamente sono stati prelevati 0,3 mL per la determinazione spettrofotometrica, posti in cuvette da 4 mL con 2,7 mL di soluzione DPPH/metanolo (0,025g/L). Tramite l'impiego di uno spettrofotometro (UV-Vis Cary 3500 Engine, Agilent Technologies, Melbourne, Australia) l'assorbanza è stata letta a 515 nm per ogni minuto fino al raggiungimento del plateau (60 min). Per il bianco di riferimento è stato usato metanolo. AR è stata calcolata tramite l'equazione  $AR = [(DPPH\text{ iniziale} - DPPH\text{ plateau}) \times 100] / DPPH\text{ iniziale}$ , effettuando la media di due repliche per ogni campione esaminato.

## 2.9 Analisi statistica

L'analisi statistica dei risultati è stata eseguita utilizzando il software Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). I dati sperimentali sono stati analizzati utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA) a una via, in cui il fattore di variazione era rappresentato dalla percentuale di EFG. Il test delle minime differenze significative (LSD) di Fisher è stato applicato per conoscere la differenza fra i campioni con un livello di confidenza del 95%.

## 3 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 3.1 Materie prime

#### 3.1.1 *Composizione chimica e analisi sulle proprietà fisiche*

L'estrazione effettuata sulla farina di ghiande ha permesso l'ottenimento di una matrice a granulometria fine (setacciatura eseguita a 125  $\mu\text{m}$ ), con una resa d'estrazione sul prodotto iniziale del 60 %, circa il doppio di quella ottenuta da Correia et al. (2013). Le analisi effettuate sulle materie prime sono riportate nella Tabella 1. La matrice EFG, presenta un elevato contenuto lipidico 8,07 g/100 g di s.s, dipendente probabilmente dal contenuto di partenza della farina di ghiande (11,97 g/100 g di s.s). La composizione della frazione lipidica della farina di ghiande è costituita prevalentemente da acido oleico e linoleico (Silva et al., 2016) con contenuti medi che vanno dal 8,44 al 13,86 % (Szabłowska & Tańska, 2020). Il processo di estrazione oltre a ridurre il contenuto di lipidi ed isolare la frazioni con granulometria minore ha permesso una notevole riduzione del contenuto di ceneri -EFG 0,96 g/100 g di s.s, mentre FG 1,80 g/100 g di s.s) - dovuto probabilmente ad una perdita di Ca e Fe che sono i minerali più rappresentati nella composizione della farina di ghiande.



Per quanto riguarda la caratterizzazione dell'amido, l'EFG ottenuto aveva un contenuto di amiloso del 54,3%, probabilmente dipendente da una preponderanza di *Q. Rotundifolia* nella farina, e dai processi di essiccazione e di estrazione applicati. Cappai et al. (2013) riporta contenuti di amiloso pari al 25,8 %, per la specie *Q. Ilex*, mentre Correia et al. (2013), riporta alti contenuti di amiloso (53,7 %) per l'amido isolato proveniente dalla specie *Q. Rotundifolia*. Come osservato in bibliografia, esiste una stretta correlazione positiva fra i trattamenti termici applicati e il contenuto di amiloso (Correia et al., 2009): durante l'essiccamento di ghiande appartenente alla specie *Q. Rotundifolia*, hanno riscontrato un evidente incremento del contenuto di amiloso proporzionale all'aumento delle temperature di processo applicate (40 °C, 50°C, 60 °C), attribuendone la causa alla possibile interazione degli enzimi amilolitici  $\alpha$ -amilasi e  $\beta$ -amilasi e glucoamilasi con l'amiloso, avvenuta durante l'essiccazione

Inoltre, Cappai et al. (2013), riporta che il rapporto fra amiloso e amilopectina è altamente correlato con la grandezza dei granuli d'amido, dipendente dalla specie. La base senza glutine utilizzata presenta un ottimo indice di rapporto per l'amilopectina, con l'amido di mais con il valore minore (0,29%), poiché l'amido contenente valori elevati di amiloso è meno digeribile (Cappai et al. 2013).

Le proprietà fisiche analizzate mostrano che l'estratto da farina di ghiande ha un indice significativamente maggiore di WAI (3,09 g/g) e di OAC (1,14 g/g) rispetto agli sfarinati di base convenzionali (2,63 g/g e 0,93 g/g rispettivamente per FR e 1,743 g/g e 1,01 g/g per AM).

### 3.1.2 Frazioni polifenoliche e attività antiossidante

Un alto contenuto di polifenoli nella farina di ghiande è stato riscontrato da numerosi autori (Vinha et al., 2016; Parsaei, Goli, & Abbasi, 2018). Purtroppo, l'alto contenuto di tannini (composti appartenenti alla categoria dei polifenoli) presente in numerose specie europee

(7,76 - 10,9 %) limita il consumo della farina di ghiande sia dal punto di vista sensoriale perché interferisce sul gusto e sia perché livelli troppo elevati potrebbero avere effetti anti-nutrizionali che potrebbero causare danni all'epitelio intestinale: i tannini sono capaci di creare complessi con le proteine, i polisaccaridi e gli ioni metallici i quali riducono la digeribilità e l'assorbimento delle sostanze nutritive (Szablowska & Tańska, 2020). Questo aspetto obbliga, qualora si vogliano utilizzare elevate quantità di farina di ghiande negli alimenti, il ricorso ad un pretrattamento finalizzato a ridurre il contenuto di tannini (Rakić, Povrenović, Tešević, Simić, & Maletić, 2006; Rakić et al., 2007). Il processo di estrazione applicato sulla farina ha permesso di ridurre notevolmente il contenuto di polifenoli totali della farina di ghiande (circa il 38%), dilavando in gran parte i tannini che mediamente risultano i composti maggiormente presenti. Pur diminuiti rispetto alla FG, i polifenoli bio-accessibili dell'EFG rappresentano un buon quantitativo (276,1 mg GAE/100 g s.s). Quindi anche l'EFG così come la FG conserva un elevato contenuto di composti biochimici attivi, motivo in più per il quale le ghiande possano essere prese in considerazione come ingrediente al fine di migliorare le caratteristiche nutrizionali dei prodotti trasformati grazie alle loro proprietà anticancerogene, cardioprotettive e antiossidanti (Vinha et al., 2016). La materia prima (EFG) usata in questa attività di ricerca nella produzione di GFBs ha una elevata attività antiossidante (81,9%) se confrontata rispetto agli sfarinati convenzionali FR e AM (29,3 % e 28,9 %). Altri autori hanno già messo in evidenza che i prodotti contenenti la farina di ghiande determinano considerevoli incrementi nell'attività antiossidante (Ajo, 2018; Korus et al., 2015; Rita Beltrão Martins et al., 2020).

## 3.2 Misure sugli impasti

### 3.2.1 Proprietà viscosimetriche, attività $\alpha$ -amilasica e analisi fisiche degli impasti

Le proprietà viscosimetriche dei campioni oggetto d'analisi sono state effettuate tramite l'analisi "pasting profile", e i dati ottenuti sono riportati in Tabella 3. Tutti i campioni

contenenti EFG in crescenti percentuali di sostituzione dell'AM, presentano una diminuzione significativa del picco di viscosità iniziale all'aumento della percentuale di aggiunta di EFG nelle formulazioni, indice di un minore rigonfiamento dei granuli e un decremento della viscosità finale rispetto al controllo. La viscosità finale in A60 è di 4347 cP, mentre nel controllo è di 5257 cP. Infatti, l'aggiunta di prodotti derivati dalle ghiande determina un notevole incremento delle proprietà viscosimetriche negli impasti GF, come determinato da Korus et al. (2015) con gli incrementi del modulo viscoso ( $G''$ ) ed elastico ( $G'$ ) per aggiunta di farina di ghiande. Correia et al. (2013) ha riscontrato una elevata capacità di resistenza al rigonfiamento dell'amido puro isolato da ghiande in condizioni di elevate temperature, risultato conforme con quanto ottenuto nelle prove di pasting effettuate con l'utilizzo di EFG. Questo denota un'alta stabilità alle temperature ed un'elevata resistenza all'agitazione meccanica, riscontrata anche da Stevenson, Jane, & Inglett, (2006) e Molavi et al. (2018). Il contenuto di amilosio e di lipidi è una delle possibili cause: infatti la maggiore concentrazione lipidica e la quantità più elevata di amilosio favoriscono la diminuzione della capacità di rigonfiamento dei singoli granuli (Singh, Singh, Kaur, Sodhi, & Gill, 2003).

### 3.2.2 Attività $\alpha$ -amilasica

L'analisi tramite lo Stiring Number (SN), riportato in Tabella 3, ha mostrato un notevole incremento nell'attività delle  $\alpha$ -amilasi in modo proporzionale alle quantità di EFG utilizzate per la formulazione degli impasti. Infatti, il controllo presenta indice SN di 2449 cP, mentre i campioni A20, A40, 60, riportano indici in ordine decrescente (2140 cP, 1876 cP, 1740 cP rispettivamente) a conferma di una maggiore concentrazione enzimatica di amilasi nello sfarinato EFG.

### 3.2.3 Proprietà di lievitazione

Le differenze significative relative ai parametri misurati tramite l'analisi reofermentografica sono riportati nella tabella 4: l'analisi fermentografica rivela un netto peggioramento della curva di sviluppo degli impasti formulati con EFG rispetto al controllo. Hm, risulta fortemente correlato con tutte le proprietà viscosimetriche e con l'attività  $\alpha$ -amilasica. L'analisi fermentografica è inoltre negativamente correlata con l'indice WAI misurato sugli impasti ( $r=-0,94$ ), e questo indica la capacità dell'EFG nel trattenere e legare l'acqua, rendendola meno disponibile per la formazione della struttura. L'estratto della farina di ghiande presenta un effetto addensante che incide negativamente sulle proprietà di lievitazione degli impasti GF e che presumibilmente si ripercuote anche sul prodotto finito. Questo dato risulta in contrasto con quanto riportato da Korus et al. (2015) e Martins et al. (2020), che per sostituzioni con quantitativi del 20% con farina di ghiande hanno ottenuto effetti positivi sul volume specifico del prodotto finito. Questo aspetto non è stato riscontrato negli impasti formulati con EFG e potrebbe essere dovuto al processo preliminare di estrazione della frazione più fine ( $125\ \mu\text{m}$ ), il quale conferisce agli impasti una struttura compatta. Inoltre, la formulazione base differente riportata negli articoli appena citati, soprattutto per quanto riguarda gli idrocolloidi e gli sfarinati di base, può aver favorito il volume dei pani. Dati invece significativamente positivi sono stati ottenuti per quanto riguarda la curva di produzione dei gas, dove, per tutti i pani fortificati, è stata registrata una maggiore produzione di anidride carbonica ( $V_t$ ) e un tempo di ritenzione maggiore ( $T'1$ ) rispetto al controllo, anche se il rapporto tra  $V_r$  e  $V_t$  è risultato significativamente più basso rispetto al controllo.

### 3.3 Analisi sul pane

#### 3.3.1 Volume specifico e colore.

Gli effetti dell'introduzione nella formulazione dell'EFG che erano stati evidenziati sulle proprietà reologiche e fermentative degli impasti si sono manifestati anche sui prodotti finiti. I campioni di pani ottenuti con l'EFG, a prescindere dalle percentuali di sostituzione effettuate, hanno mostrato un decremento significativo del volume specifico rispetto al controllo, manifestando in misura ancor più evidente i risultati già ottenuti da Skendi et al. (2018) con la fortificazione di GFBs con farina di ghiande. La stretta correlazione fra la capacità d'assorbimento dell'acqua della farina di ghiande con il volume specifico viene evidenziata da Skendi et al. (2018), che la identifica come la principale causa della diminuzione del volume specifico, in quanto la redistribuzione dell'acqua all'interno dell'impasto è dovuta alla fibra alimentare contenuta nella farina di ghiande. La sostituzione con EFG ha portato ad ottenere per il volume specifico risultati simili a quelli riportati in altri lavori con la farina di ghiande: il campione A60 (che rappresenta una sostituzione totale sulla base degli sfarinati utilizzati pari al 30 %) ha mostrato un volume di 1,80 mL/g che rappresenta un valore simile a quello ottenuto da Skendi et al. (2018) pari a 1,83 mL/g con una percentuale di impiego di farina di ghiande del 25 %. Per quanto riguarda il colore, l'uso di EFG sui pani ha determinato un decremento significativo della luminosità ( $L^*$ ), un incremento significativo dell'indice di rosso e di giallo sia sulla crosta che sulla mollica proporzionali al tasso di sostituzione. Questo effetto è stato riportato anche da Korus et al. (2015), Skendi et al., (2018), Martins et al., (2020) sui GFBs formulati con farina di ghiande, tramite l'uso di EFG, si riduce l'impatto negativo creato da un colore troppo scuro, tendente al nero per le percentuali di aggiunta maggiori.

### 3.3.2 *Analisi del profilo di Texture*

L'analisi della TPA (Tabella 5) mostra le caratteristiche meccaniche della mollica dei pani formulati con EGF che, rispetto al controllo, presentano incrementi significativi per il parametro della durezza, ma non presentano differenze significative dovute alle diverse percentuali di aggiunta. Risultati simili sono stati già evidenziati in precedenti lavori di (Korus et al., 2015; Skendi et al., 2018) con farina di ghiande, in cui si ritiene che i risultati ottenuti sono dovuti all'elevata densità della mollica e alla diminuzione del volume specifico. Per quanto riguarda gli altri parametri, non sono state rilevate differenze significative per l'elasticità, mentre valori significativamente maggiori in funzione dei livelli di utilizzo di EFG sono stati riscontrati per la coesività, a dimostrazione di una correlazione tra mollica più densa e tasso di sostituzione di EFG, e per la masticabilità, che è una misura derivata dalla moltiplicazione della durezza, della coesività e dell'elasticità.

### 3.3.3 *Analisi sulle caratteristiche della mollica*

Le analisi svolte sulle caratteristiche della mollica, riportate in Tabella 6, mostrano per tutti i campioni prodotti con EFG incrementi significativi nei valori della densità alveolare rispetto al controllo (65,9 A/cm<sup>2</sup>) che raggiungono il valore massimo di 93 A/cm<sup>2</sup> per A60 che rappresenta il campione con la maggior percentuale di sostituzione. I risultati sono simili a quelli ottenuti da Skendi et al. (2018) per l'incorporazione della farina di ghiande: per esempio, la dimensione media alveolare si riduce in modo inversamente proporzionale all'incremento delle percentuali di sostituzione, dato riscontrato anche per i campioni formulati con EFG. Anche il numero totale di alveoli aumenta considerevolmente per i GFBs formulati con EFG: il campione di controllo non differisce significativamente dall'A20 (593 e 662), ma per A40 e A60 è stato registrato un incremento significativo (rispettivamente, 822 e 837). L'incorporazione di EFG ha avuto un impatto significativo nella distribuzione dell'area alveolare e nella distribuzione del numero degli alveoli (Figure

1 e 2). L'incremento maggiore nella distribuzione alveolare è stato riscontrato per la categoria di pori  $<1 \text{ mm}^2$ , i quali raggiungono il valore massimo di 34 % (A60) rispetto al 12 % del controllo, indice di una struttura uniforme. Infatti, nella distribuzione del numero degli alveoli (Figura 2) è visibile un incremento nella categoria  $<1 \text{ mm}^2$  e nella categoria 1-10  $\text{mm}^2$  per i campioni A40 e A60 rispetto al controllo.

### *3.3.4 Composizione chimica dei pani senza glutine*

I risultati, riportati nella Tabella 7, evidenziano livelli di umidità significativamente maggiori rispetto al controllo (43,5 g/100g) nei pani formulati con EFG (A20=46,3 g/100g; A40= 47,7 g/100g; A60=48,6 g/100g). Skendi et al. (2018) hanno dimostrato che la farina di ghiande è un ingrediente che modifica significativamente il contenuto d'acqua dei pani GF, incrementando l'abilità nel trattenere le molecole di acqua durante la conservazione. I dati di umidità riscontrati in questo studio potrebbero dipendere da quanto appena riportato, ma oltre alla possibile interazione dovuta all'uso di EGF, l'incremento di umidità riscontrato nei pani a percentuali di sostituzione crescenti è probabilmente dovuto anche ad un livello maggiore di acqua utilizzata nella formulazione per ottenere impasti della stessa consistenza. I dati di questo studio inoltre mostrano che la sostituzione di amido di mais con EFG nei GFBs determina una riduzione del contenuto di carboidrati, mentre aumentano i lipidi. Il contenuto di proteine aumenta rispetto al controllo (4.82g/ 100 g di s.s) in modo significativo ( $p<0.05$ ) nel GFB sperimentale con percentuali maggiori di aggiunta (A60). Anche Korus et al. (2015) hanno dimostrato che l'aggiunta di farina di ghiande nei pani GF aumenta il contenuto di proteine, grassi e fibre alimentari a scapito dei carboidrati rispetto al pane di controllo.

### 3.3.5 *Componente fenolica e attività antiossidante dei pani GF*

I dati nella Tabella 8 mostrano gli effetti positivi per i GFBs formulati con EFG, con un incremento significativo per il contenuto di polifenoli totali di tutti i campioni contenenti EFG rispetto al controllo. Il contenuto maggiore è stato trovato in A60 (711 mg GAE/100 g s.s), che rispetto al controllo (189,5 mg GAE/100 g s.s) ha portato ad un incremento di circa 3,75 volte. Aumenta in modo proporzionale al tasso di sostituzione dell'amido di mais con EFG rispetto al controllo (125,8 mg GAE/100 g s.s) anche la bioaccessibilità dei polifenoli con il suo massimo in A60 (152,7 mg GAE/100g s.s). Anche l'attività antiossidante è significativamente aumentata rispetto al controllo (29%), sino al valore massimo di 91 % per la percentuale di sostituzione del 40 % (A40). Come riscontrato in letteratura anche l'aggiunta di farina di ghiande nei prodotti da forno ha un effetto positivo sulle caratteristiche nutrizionali, migliorando in particolare l'attività antiossidante e il contenuto di polifenoli totali (Korus, Gumul, Krystyjan, Juszcak, & Korus, 2017; Martins et al., 2020; Skendi et al., 2018; Parsaei, Goli, & Abbasi, 2018). Gli articoli precedentemente citati presentano metodiche e ingredienti differenti, ma tutti gli articoli mostrano un aspetto comune nell'incremento delle caratteristiche nutrizionali dei prodotti fortificati con derivati provenienti dalle ghiande.

## 4 CONCLUSIONI

Il processo di estrazione dalla farina di ghiande ha permesso di ottenere una matrice (EFG) costituita dagli elementi a granulometria più piccola (125 µm) con un elevato contenuto di carboidrati totali e lipidi, e un ridotto contenuto proteine e di polifenoli totali rispetto alla farina, probabilmente sono diminuite in modo preponderante le forme tanniche che nella farina di ghiande son preponderanti, ma comunque rimane in EFG una buona attività antiossidante. Le caratteristiche dell'amido, come il contenuto di amilosio e la possibile quantità di fibra delle frazioni minori, hanno determinato alcuni effetti negativi dell'utilizzo

Roberto Arca, *“Potenzialità di utilizzo dei prodotti derivati da risorse non convenzionali nelle formulazioni di pane senza glutine”* - Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie

- *Curriculum* “Produttività delle Piante coltivate” - Ciclo “XXXIII” Università degli Studi di Sassari  
Anno Accademico 2018 - 2021



della matrice in sostituzione all'amido di mais nelle formulazioni per GFBs, richiedendo quantità maggiori di acqua da aggiungere agli impasti. Le caratteristiche dell'amido di ghiande, che conferisce resistenza al rigonfiamento in condizioni di temperature elevate, insieme ad un'elevata resistenza all'agitazione meccanica hanno determinato difficoltà in fase fermentativa per gli impasti formulati con EFG. Comunque, anche per i quantitativi maggiori d'incorporazione di EFG (30% sugli sfarinati di base), il volume specifico dei GFBs era simile ai pani quelli ottenuti in letteratura con percentuali inferiori di farina di ghiande (25%) (Skendi et al.2018) e l'uso di EGF ha notevolmente migliorato il colore della crosta e della mollica riducendo l'impatto negativo creato dall'introduzione di farina di ghiande nelle formulazioni GF che determina un colore troppo scuro tendente al nero per le percentuali di aggiunta maggiori (25-30%). L'analisi del profilo di texture ha messo in evidenza un incremento della durezza della mollica, della coesività e della masticabilità per tutti i GFBs sperimentali rispetto al controllo - indici che indicano una maggiore compattezza della mollica, con struttura alveolare uniforme costituita da alveoli di piccole dimensioni ( $\leq 1 \text{ mm}^2$  e  $1-10 \text{ mm}^2$ ). I GFBs formulati con EFG, per tutte le percentuali di introduzione testate, presentano caratteristiche migliori rispetto al controllo dal punto di vista nutrizionale: anche se diminuiscono i contenuti proteici, probabilmente dovuto all'interazione della componente durante il processo di cottura, migliorano i contenuti delle frazioni polifenoliche (totali, insolubili e bioaccessibili) e incrementa, notevolmente, la capacità antiossidante. In definitiva, l'uso della farina di ghiande come risorsa alimentare da aggiungere nelle formulazioni GFBs necessita di essere ancora esplorata, comunque il processo preliminare, adottato in questo studio, ha determinato alcuni aspetti positivi. Le componenti con minore granulometria della farina di ghiande la rendono una valida risorsa per migliorare il profilo nutrizionale dei GFBs, e, utilizzata in percentuali minori, potrebbe essere considerata come un additivo alimentare con effetti addensanti.

## 5 RIFERIMENTI

- AACC International (2000). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, (11th Ed). Methods 22-08, 56-20.01. The Association: St. Paul, MN, USA
- AACC International (2001). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, (11th Ed). Methods 76-21. The Association: St. Paul, MN, USA
- AACC International. (2005). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists (10<sup>th</sup> Ed.). Methods 10-05.01, 44–15.02 St. Paul, MN, USA.
- AOAC (2000) Official Methods of Analysis. 17th Edition, *The Association of Official Analytical Chemists*, Gaithersburg, MD, USA.
- AOAC. (2003) Official Methods of Analysis. Vol.I.17th ed. *Association of Analytical Chemists*, Washington, DC, USA
- Ajo, R. Y. (2018). Effect of acorn flour substitution on arabic bread properties. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 55(4), 913–919.  
<https://doi.org/10.21162/PAKJAS/18.6455>
- Cappai, M. G., Alesso, G. A., Nieddu, G., Sanna, M., & Pinna, W. (2013). Electron microscopy and composition of raw acorn starch in relation to in vivo starch digestibility. *Food and Function*, 4(6), 917–922. <https://doi.org/10.1039/c3fo60075k>
- Collar, C., Jiménez, T., Conte, P., & Fadda, C. (2014). Impact of ancient cereals, pseudocereals and legumes on starch hydrolysis and antiradical activity of technologically viable blended breads. *Carbohydrate Polymers*, 113, 149–158.  
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.07.020>
- Conte, P., Del Caro, A., Urgeghe, P. P., Petretto, G. L., Montanari, L., Piga, A., & Fadda, C. (2019). Nutritional and aroma improvement of gluten-free bread: is bee pollen effective? *LWT-Food Science and Technology*, 118, 108711.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108711>
- Correia, P. R., Leitão, A. E., & Beirão-Da-Costa, M. L. (2009). Effect of drying temperatures on chemical and morphological properties of acorn flours. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(9), 1729–1736.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01988.x>
- Roberto Arca, “Potenzialità di utilizzo dei prodotti derivati da risorse non convenzionali nelle formulazioni di pane senza glutine” - Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie  
- Curriculum “Produttività delle Piante coltivate” - Ciclo “XXXIII” Università degli Studi di Sassari  
Anno Accademico 2018 - 2021

- Correia, P. R., & Beirão-Da-Costa, M. L. (2012). Starch isolation from chestnut and acorn flours through alkaline and enzymatic methods. *Food and Bioproducts Processing*, 90(2), 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.06.005>
- Correia, P. R., Nunes, M. C., & Beirão-da-Costa, M. L. (2013). The effect of starch isolation method on physical and functional properties of Portuguese nut starches. II. *Q. rotundifolia Lam.* and *Q. suber Lam.* acorns starches. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 448–455. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.06.014>
- El-Khoury, D., Balfour-Ducharme, S., & Joye, I. J. (2018). A Review on the Gluten-Free Diet: Technological and Nutritional Challenges. *Nutrients*, 10, 1410 <https://doi:10.3390/nu10101410>
- European Commission. (2014). Commission implementing regulation (EU) No 828/2014 of 30 July 2014. *Official Journal of the European Union*
- European Parliament Regulation (EU) No 609/2013 of the European Parliament and of the Council on food intended for infants and young children, food for special medical purposes, and total diet replacement for weight control. *Official Journal of the European Union*. 2012, 35–56
- FAO/WHO (2003). Food energy – methods of analysis and conversion factors. *Food and nutrition paper 77*, Rome. ISSN 0254-4752.
- Gallagher, E., Gormley, T. R., & Arendt, E. K. (2004). Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends in Food Science and Technology*, 15(3–4), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.012>
- Hall, N. J., Rubin, G., & Charnock, A. (2009). Systematic review: adherence to a gluten-free diet in adult patients with coeliac disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 30(4), 315–330. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2009.04053.x>
- ICC No. 104/1: Determination of ash in Cereals and Cereal Products. Available online: <https://www.icc.or.at/publications/icc-standards/standards-overview/104-1-standard-method> (accessed on 10 January 2020).
- Kagnoff, M. F. (2005). Overview and pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology*, 128(4), S10–S18. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.02.008>
- Roberto Arca, “Potenzialità di utilizzo dei prodotti derivati da risorse non convenzionali nelle formulazioni di pane senza glutine” - Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie  
- Curriculum “Produttività delle Piante coltivate” - Ciclo “XXXIII” Università degli Studi di Sassari  
Anno Accademico 2018 - 2021

- Kaushal, P., Kumar, V., & Sharma, H. K. (2012). Comparative study of physicochemical, functional, antinutritional and pasting properties of taro (*Colocasia esculenta*), rice (*Oryza sativa*) flour, pigeonpea (*Cajanus cajan*) flour and their blends. *LWT - Food Science and Technology*, 48(1), 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.02.028>
- Korus, A., Gumul, D., Krystyan, M., Juszcak, L., & Korus, J. (2017). Evaluation of the quality, nutritional value and antioxidant activity of gluten-free biscuits made from corn-acorn flour or corn-hemp flour composites. *European Food Research and Technology*, 243(8), 1429–1438. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2853-y>
- Korus, J., Witczak, M., Ziobro, R., & Juszcak, L. (2015). The influence of acorn flour on rheological properties of gluten-free dough and physical characteristics of the bread. *European Food Research and Technology*, 240(6), 1135–1143. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2417-y>
- Kostić, A. T., Barać, M. B., Stanojević, S. P., Milojković-Opsenica, D. M., Tešić, Ž. L., Šikoparija, B., Pešić, M. B. (2015). Physicochemical composition and techno-functional properties of bee pollen collected in Serbia. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.031>
- Łuczaj, Ł., Adamczak, A., & Duda, M. (2014). Tannin content in acorns (*Quercus* spp.) from Poland. *Dendrobiology*, 72, 103–111. <http://dx.doi.org/10.12657/denbio.072.009>
- Martins, R. B., Nunes, M. C., Ferreira, L. M. M., Peres, J. A., Barros, A. I. R. N. A., & Raymundo, A. (2020a). Impact of acorn flour on gluten-free dough rheology properties. *Foods*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/foods9050560>
- Martins, R. B., Gouvinhas, I., Nunes, M. C., Peres, J. A., Raymundo, A., & Barros, A. I. R. N. A. (2020b). Acorn flour as a source of bioactive compounds in gluten-free bread. *Molecules*, 25(16), 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules25163568>
- Molavi, H., Razavi, S. M. A., & Farhoosh, R. (2018). Impact of hydrothermal modifications on the physicochemical, morphology, crystallinity, pasting and thermal properties of acorn starch. *Food Chemistry*, 245, 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.117>

- Parsaei, M., Goli, M., & Abbasi, H. (2018). Oak flour as a replacement of wheat and corn flour to improve biscuit antioxidant activity. *Food Science and Nutrition*, 6(2), 253–258. <https://doi.org/10.1002/fsn3.524>
- Rakić, S., Povrenović, D., Tešević, V., Simić, M., & Maletić, R. (2006). Oak acorn, polyphenols and antioxidant activity in functional food. *Journal of Food Engineering*, 74(3), 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.03.057>
- Rakić, Sveto, Petrović, S., Kukić, J., Jadranin, M., Tešević, V., Povrenović, D., & Šiler-Marinković, S. (2007). Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. *Food Chemistry*, 104(2), 830–834. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.025>
- Šálková, T., Divišová, M., Kadochová, Š., Delawska, K., Kadlčková, E., Němečková, L., Žemličková, A. (2011). Acorns as a food resource. An experiment with acorn preparation. *Interdisciplinaria Archaeologica Natural Sciences in Archeology*, 2(2), 133–141. <https://doi.org/10.24916/iansa.2011.2.6>
- Silva, S., Costa, E. M., Borges, A., Carvalho, A. P., Monteiro, M. J., & Pintado, M. M. E. (2016). Nutritional characterization of acorn flour (a traditional component of the Mediterranean gastronomic folklore). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10(3), 584–588. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9340-1>
- Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Sodhi, N. S., & Gill, B. S. (2003). Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*, 81, 219–231. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00416-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00416-8)
- Skendi, A., Mouselemidou, P., Papageorgiou, M., & Papastergiadis, E. (2018). Effect of acorn meal-water combinations on technological properties and fine structure of gluten-free bread. *Food Chemistry*, 253, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.144>
- Stevenson, D. G., Jane, J.-L., & Inglett, G. E. (2006). Physicochemical properties of pin oak (*Quercus palustris* Muench.) acorn starch. *Starch/Stärke*, 58, 553–560. <https://doi.org/10.1002/star.200600533>

- Szablowska, E., & Tańska, M. (2020). Acorn flour properties depending on the production method and laboratory baking test results: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 980–1008. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12683>
- Trier, J. S. (1991). Celiac Sprue. *New England Journal of Medicine*, 325(24), 1709–1719. <https://doi.org/10.1056/NEJM199112123252406>
- Vinha, A. F., Barreira, J. C. M., Costa, A. S. G., & Oliveira, M. B. P. P. (2016). A New Age for Quercus spp. Fruits: Review on Nutritional and Phytochemical Composition and Related Biological Activities of Acorns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 947–981. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12220>
- Witczak, M., Ziobro, R., Juszczak, L., & Korus, J. (2016). Starch and starch derivatives in gluten-free systems - A review. *Journal of Cereal Science*, 67, 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.07.007>
- Zhang, Z., Saleh, A. S. M., Wu, H., Gou, M., Liu, Y., Jing, L., Li, W. (2019). Effect of Starch Isolation Method on Structural and Physicochemical Properties of Acorn Kernel Starch. *Starch/Staerke*, 1900122, 1–10. <https://doi.org/10.1002/star.201900122>

## 6 TABELLE

Tabella 1. *Composizione chimica e analisi fisiche delle materie prime*

		Campioni															
u.m		FR			AM			EFG			FG						
<i>Composizione chimica</i>																	
Umidità	g/100 g	11,27	±	0,08	b	13,71	±	0,08	a	11,33	±	0,41	b	7,59	±	0,01	c
Carboidrati Totali	g/100 g s.s	79,51	±	0,22	b	85,43	±	0,10	a	75,23	±	0,20	c	74,06	±	0,09	d
Proteina Grezza	g/100 g s.s	8,27	±	0,08	a	0,43	±	0,02	c	4,63	±	0,05	b	4,58	±	0,09	b
Lipidi Totali	g/100 g s.s	0,32	±	0,05	c	0,35	±	0,07	c	8,07	±	0,07	b	11,97	±	0,03	a
Ceneri	g/100 g s.s	0,67	±	0,02	c	0,07	±	0,03	d	0,96	±	0,04	b	1,80	±	0,04	a
WAI	g/g	2,63	±	0,15	c	1,74	±	0,03	d	3,09	±	0,03	b	3,19	±	0,11	a
OAC	g/g	0,93	±	0,03	c	1,01	±	0,03	a	1,14	±	0,06	ab	1,03	±	0,05	bc
Amilosio	%	33,23	±	3,00	c	22,18	±	1,70	b	54,39	±	0,32	a	/	±	/	
Amilopectina	%	66,77	±	3,00	b	77,82	±	1,70	a	45,61	±	0,32	c	/	±	/	
Am/Amilopec		0,50	±	0,07	b	0,29	±	0,03	c	1,19	±	0,02	a	/	±	/	

<sup>1</sup>Media dei valori ±deviazione Standard. Fra le righe, i valori con la stessa lettera non si discostano significativamente l'uno dall'altro secondo il test LSD ( $p < 0,05$ )

Tabella 2. Polifenoli (mg GAE/100 g s.s) e attività antiossidante (%) delle materie prime

	Campioni <sup>1</sup>											
	FR		AM		EFG		FG					
<i>Polifenoli</i>												
Solubili	53,3	± 19,37	c	10,8	± 0,2	c	1156,6	± 164,0	b	1860,5	± 36,9	a
Insolubili	107,7	± 18,33	b	3,9	± 0,2	b	751,4	± 159,1	a	944,1	± 52,1	a
Totali	161,0	± 1,04	c	14,7	± 0,0	d	1908,0	± 4,9	b	2804,6	± 15,2	a
Bioaccessibili	140,7	± 1,20	d	9,6	± 0,5	c	276,1	± 4,7	b	487,9	± 5,0	a
AR	29,3	± 3,92	b	28,9	± 0,0	b	81,9	± 3,3	a	/	±	/

<sup>1</sup>Media dei valori ±deviazione Standard. Fra le righe, i valori con la stessa lettera non si discostano significativamente l'uno dall'altro secondo il test LSD (p < 0,05)

Tabella 3. Proprietà viscosimetriche, attività  $\alpha$ -amilasica (SN), e analisi fisiche degli impasti

Caratteristiche		Campioni													
		Controllo				A20				A 40				A 60	
Viscosità iniziale	cP	3686,5	± 34,65	a	3031,0	± 2,83	b	2562,5	± 124	c	2046,5	± 116,67	d		
Trough 1	cP	2849,0	± 179,61	a	2455,0	± 108,9	ab	2076,5	± 269	bc	1668,0	± 138,59	c		
Viscosità Finale	cP	5257,0	± 113,14	a	4875,5	± 229,8	ab	4742,5	± 107	b	4347,0	± 49,50	c		
(SN)	cP	2449	± 2,83	a	2141	± 7,78	b	1877	± 53	c	1740	± 90,51	c		
<i>analisi fisiche</i>															
WAI	g/g	1,9	± 0,04	c	2,1	± 0,03	b	2,2	± 0,09	b	2,4	± 0,12	a		
WSI	g/g	2,0	± 0,02	a	1,9	± 0,01	ab	1,9	± 0,03	b	1,9	± 0,03	b		
OAC	g/g	0,8	± 0,05	b	0,8	± 0,05	b	1,0	± 0,03	a	1,0	± 0,05	a		

<sup>1</sup>Media dei valori ±deviazione Standard. Fra le righe, i valori con la stessa lettera non si discostano significativamente l'uno dall'altro secondo il test LSD (p < 0,05)



Tabella 4. *Proprietà di lievitazione degli impasti*

Caratteristiche	u.m	Campioni															
		Controllo			A20			A 40			A 60						
<i>Curva di sviluppo</i>																	
A. sviluppo (Hm)	mm	59,3	±	0,3	a	47,9	±	1,3	b	37,2	±	0,4	c	36,0	±	0,28	c
h	mm	45,9	±	0,1	a	14,1	±	3,4	c	20,2	±	0,2	b	19,3	±	0,49	b
(Hm-h) /Hm	%	22,3	±	0,5	c	70,5	±	7,9	a	46,2	±	0,3	b	47,1	±	0,35	b
<i>Curva dei gas</i>																	
H'm:	mm	73,9	±	1,41	a	69,5	±	3,11	b	70,9	±	0,78	ab	68,9	±	1,06	b
T'1	h:min	0:50	±	0:02	c	1:22	±	0:22	b	1:11	±	0:03	b	1:18	±	0:02	a
Volume totale (Vt)	CO <sub>2</sub>	1163,0	±	22,63	b	1316,3	±	131,4	a	1300,0	±	9,90	a	1296,0	±	21,21	a
Volume Ritenuto (Vr)	CO <sub>2</sub>	1118,0	±	14,14	ns	1180,3	±	44,9	ns	1185,0	±	4,24	ns	1182,0	±	19,80	ns
Volume Rilasciato (Vc)	CO <sub>2</sub>	45,5	±	9,19	c	136,0	±	86,6	a	115,0	±	5,66	b	114,0	±	2,83	b
Vr/Vt	%	96,1	±	0,71	a	90,0	±	5,3	c	91,2	±	0,35	b	91,2	±	0,00	b

<sup>1</sup>Media dei valori ±deviazione Standard. Fra le righe, i valori con la stessa lettera non si discostano significativamente l'uno dall'altro secondo il test LSD (p < 0,05).

Tabella 5. *Colore, Volume specifico e caratteristiche di struttura dei pani senza glutine*

Caratteristiche	u.m	Campioni			
		Controllo	A 20	A 40	A 60
<i>Colore della crosta</i>					
L		84,0 ± 0,4 a	68,1 ± 0,7 b	60,2 ± 1,1 c	52,8 ± 0,5 d
a*		0,01 ± 0,2 d	4,8 ± 0,2 c	6,5 ± 0,2 b	8,5 ± 0,3 a
b*		11,9 ± 1,5 d	19,8 ± 0,5 c	22,9 ± 0,3 b	24,6 ± 0,5 a
<i>Colore della mollica</i>					
L		60,4 ± 0,9 a	54,2 ± 2,7 b	52,2 ± 0,8 b	49,2 ± 1,3 c
a*		0,1 ± 0,1 d	4,7 ± 0,3 c	5,8 ± 0,1 b	6,4 ± 0,3 a
b*		5,7 ± 0,2 d	15,5 ± 0,4 c	18,6 ± 0,3 b	19,8 ± 0,2 a
<i>Volume e Struttura</i>					
Volume Specifico	mL/g	2,28 ± 0,01 a	1,85 ± 0,0 b	1,76 ± 0,02 c	1,80 ± 0,03 c
Durezza	N	5,82 ± 0,5 b	23,8 ± 0,8 a	21,7 ± 1,4 a	22,4 ± 4,7 a
Elasticità	mm	0,97 ± 0,0 ns	0,96 ± 0,0 ns	0,95 ± 0,0 ns	1,0 ± 0,0 ns
Coesività		0,44 ± 0,0 d	0,48 ± 0,0 c	0,53 ± 0,0 b	0,55 ± 0,0 a
Masticabilità	N*mm	2,48 ± 0,2 b	10,83 ± 0,4 a	10,81 ± 0,7 a	11,7 ± 2,2 a
Resilienza		0,16 ± 0,0 d	0,19 ± 0,0 c	0,24 ± 0,0 b	0,2 ± 0,0 a

<sup>1</sup>Media dei valori ±deviazione Standard. Fra le righe, i valori con la stessa lettera non si discostano significativamente l'uno dall'altro secondo il test LSD ( $p < 0,05$ )

Tabella 6. *Caratteristiche della mollica dei pani senza glutine*

Caratteristiche	u.m	Campioni			
		Controllo	A 20	A 40	A 60
Numero tot alveoli		593 ± 115 b	662,3 ± 53 b	822 ± 64 a	837 ± 40 a
Dimensione media alveolare	mm2	0,69 ± 0,2 a	0,467 ± 0 b	0,38 ± 0 b	0,37 ± 0 b
Alveoli/area totale	%	44 - 56	34,17 - 66	34,2 - 66	34,3 - 66
Densità Alveolare	n° Alveoli/cm2	65,9 ± 13 b	73,59 ± 5,9 b	91,4 ± 7,1 a	93 ± 4,4 a
Area massima Alveolare	mm2	35,5 ± 4,7 a	17,51 ± 4,2 b	12,9 ± 3,1 b	16,7 ± 9,3 b

<sup>1</sup>Media dei valori ±deviazione Standard. Fra le righe, i valori con la stessa lettera non si discostano significativamente l'uno dall'altro secondo il test LSD (p < 0,05)

Tabella 7. *Composizione chimica dei pani senza glutine (g/100 g di s.s)*

Caratteristiche	Campioni			
	Controllo	A 20	A40	A 60
Umidità	43,50 ± 0,02 d	46,31 ± 0,14 c	47,79 ± 0,08 b	48,69 ± 0,15 a
Carboidrati Totali	49,22 ± 0,16 a	46,23 ± 0,10 b	44,08 ± 0,01 c	42,37 ± 0,40 d
Proteina Grezza	4,88 ± 0,19 bc	4,82 ± 0,02 c	5,14 ± 0,03 ab	5,41 ± 0,01 a
Lipidi Totali	0,37 ± 0,03 d	0,51 ± 0,01 c	0,81 ± 0,03 b	1,26 ± 0,06 a
Ceneri	2,04 ± 0,03 ns	2,20 ± 0,03 ns	2,20 ± 0,12 ns	2,28 ± 0,19 ns

<sup>1</sup>Media dei valori ±deviazione Standard. Fra le righe, i valori con la stessa lettera non si discostano significativamente l'uno dall'altro secondo il test LSD (p < 0,05)

Tabella 8. Polifenoli e attività antiossidante (%) dei pani senza glutine (mg GAE/100 g s.s )

Caratteristiche	Campioni			
	Controllo	Acorn 20	Acorn 40	Acorn 60
Solubili	32,9 ± 1,9 c	71,1 ± 14 c	135 ± 18 b	218 ± 32 a
Insolubili	157 ± 24 c	204,2 ± 3,4 c	352 ± 27 b	493 ± 8,5 b
PI/PS	4,8 ± 1 ns	2,937 ± 0,6	2,63 ± 0,5	2,29 ± 0,4
Totali	190 ± 23 d	275,3 ± 11 c	487 ± 8,6 b	711 ± 23 a
Bioaccessibili	125,8 ± 7,1 c	143,4 ± 5,3 ab	134,0 ± 1,1 bc	152,7 ± 2,2 a
Attività antiossidante (%)	29,4 ± 0,3 d	68,4 ± 0,6 c	91,7 ± 0,1 a	84,5 ± 2,3 b

<sup>1</sup>Media dei valori ±deviazione Standard. Fra le righe, i valori con la stessa lettera non si discostano significativamente l'uno dall'altro secondo il test LSD (p < 0,05)

## 7 FIGURE

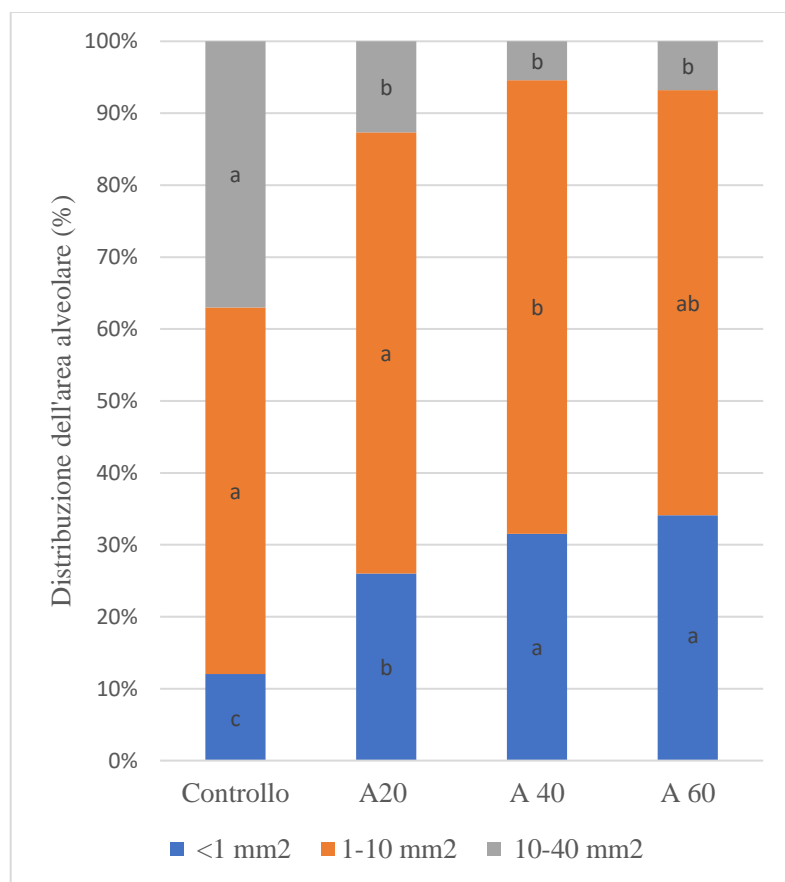


Figura 1. Distribuzione dell'area alveolare dei GFBs

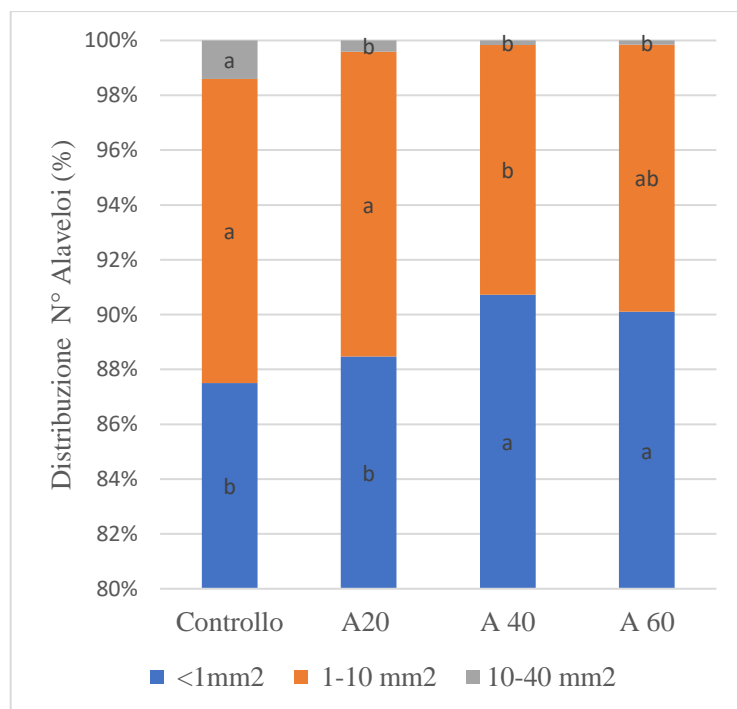


Figura 2. Distribuzione del numero degli alveoli dei GFBs

## CAPITOLO 4 CONCLUSIONI GENERALI E PROSPETTIVE FUTURE

Tutt'oggi l'assenza di glutine come terapia per la CD è l'unico metodo valido per prevenire il manifestarsi dei sintomi e delle possibili patologie annesse. L'eliminazione del glutine dal processo di panificazione determina una sfida da parte dei ricercatori e dei produttori per la produzione di pane con buone caratteristiche tecnologiche, nutrizionali e con un'elevata accettabilità sensoriale da parte dei consumatori. La bibliografia esistente ritiene fondamentale l'incorporazione di più alimenti e additivi per la formulazione di GFBs che abbiano caratteristiche simili alla controparte con glutine. In particolare, il crescente utilizzo di prodotti non convenzionali (pseudocerali, cerali minori, legumi, frutta secca e le farine da risorse alternative) ha determinato un miglioramento delle caratteristiche nutrizionali e tecnologiche. Tuttavia, l'interazione tra più componenti nella matrice complessa GF implica il continuo confronto delle prestazioni a seconda dell'ingrediente utilizzato, considerando che alcune formulazioni GFBs determinano degli impasti difficili da maneggiare, appiccicosi, poco elastici e pastosi, ovvero, caratteristiche che influenzano negativamente il prodotto finale. Infatti, si riscontrano difetti qualitativi sul prodotto finito come, per esempio, un basso volume specifico, un colore della crosta e della mollica troppo chiaro, mancanza di una struttura alveolare, consistenza secca e friabile e breve shelf-life. Inoltre, i GFBs formulati solamente con prodotti convenzionali presentano carenze dal punto di vista nutrizionale come scarsi quantitativi di proteine, di vitamina B, ferro e acido folico. Questo studio, articolato con due proposte di ricerca, presenta diverse caratteristiche positive riscontrate nei GFBs sperimentali (per esempio, migliora notevolmente il profilo nutrizionale) che convalidano l'uso di queste risorse non convenzionali per la panificazione senza glutine. I dati presentati nel capitolo 3 mostrano come l'uso di polline d'api abbia determinato un miglioramento delle caratteristiche del colore di crosta e mollica dei GFBs, mentre, è stata riscontrata una variabilità significativa per quanto riguarda le caratteristiche

di struttura, volume specifico e caratteristiche della mollica. L'aggiunta di polline in questo studio, se pur dipendente dalla tipologia di polline, ha determinato in tutti i casi un incremento delle qualità nutrizionali, con un aumento del contenuto di proteine, dei polifenoli e della capacità antiossidante dei pani rispetto al riferimento formulato con materie prime convenzionali; risultati confermano che questo prodotto naturale è un ottimo elemento funzionale per i GFBs.

Nel capitolo 4 è stata esplorata la possibilità di sostituzione dell'amido di mais con una matrice amidacea estratta dalla farina di ghiande. L'estratto EFG ha causato un peggioramento negli impasti, probabilmente dovuto alle caratteristiche dell'amido di ghiande che si presentava costituito da una elevata percentuale di amilosio, che, insieme ad un elevato contenuto di  $\alpha$ -amilasi ed una probabile componente di fibra, hanno determinato forti effetti addensanti con difficoltà nella fermentazione e un prodotto finale con mollica compatta, con un basso volume specifico e con un incremento dei parametri di durezza e coesività. Tuttavia, il processo di estrazione dell'amido dalla farina di ghiande ha determinato un miglioramento delle caratteristiche del colore dei pani prodotti e l'uso di questo prodotto ha determinato un incremento del contenuto di polifenoli e dell'attività antiossidante. Questo elemento innovativo, che si presenta come una possibile risorsa alimentare in epoche recenti, necessita di ulteriori studi per migliorare le caratteristiche tecnologiche sui GFBs, ma potrebbe tutt'oggi essere considerato un valido fortificante delle qualità nutrizionali dei pani senza glutine.