UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Scienze Agrarie e Alimentari

Corso di Laurea in Valorizzazione e Tutela dell'Ambiente e del Territorio Montano

CARATTERIZZAZIONE DI IMPASTI ACIDI DELLA VAL CAMONICA

Relatore: Prof.ssa Picozzi Claudia

Correlatore: Prof.ssa Rollini Manuela

Elaborato finale di:

Nicoletta Rossi

Matricola: 00841A

Anno Accademico 2023 - 2024

Indice

Riassunto *4*

1. Introduzione *6*

1.1 Storia e definizione della pasta madre **6**

1.2 Caratteristiche chimico-fisiche impasti acidi **10**

1.3 Lieviti **13**

1.4 Batteri lattici **18**

1.5 Modalità di produzione della pasta madre **21**

1.6 Utilizzo e storia della pasta madre in Val Camonica **24**

2. Scopo del lavoro *28*

3. Materiali e metodi *29*

3.1 Campioni **29**

3.2 Terreni colturali e diluenti per lieviti e batteri lattici **32**

3.3 Conta microbica **34**

3.4 Determinazione del pH **37**

3.5 Conservazione degli isolati microbici **37**

3.6 Upstream e downstream dei ceppi di lievito isolati **37**

3.7 Determinazione del peso secco **40**

3.8 Determinazione del potere fermentativo **42**

3.8.1 Metodo Hayduck **42**

3.8.2 Metodo Burrow-Harrison **43**

4. Risultati e discussione *45*

4.1 Analisi chimiche **45**

4.2 Analisi microbiologiche **46**

4.2.1 Conta vitale **46**

4.2.2 Sviluppo in coltura liquida **47**

4.2.3 Peso secco **49**

4.2.4 Prove di fermentazione **50**

5. Conclusioni *55*

6. Bibliografia e Sitografia *57*

Ringraziamenti *63*

Riassunto

La pasta madre è un impasto fermentato che, da sempre, ha avuto un ruolo cruciale nella panificazione tradizionale. A differenza dei lieviti coltivati su scala industriale, la pasta madre è costituita da una miscela di acqua e farina in cui avviene un processo di fermentazione spontanea a seguito della naturale presenza di lieviti e batteri lattici. La sua storia, nonostante risalga a millenni fa, è ancora oggi una base fondamentale per la produzione di pane artigianale, soprattutto nei contesti locali. L'interesse scientifico verso la pasta madre è cresciuto negli ultimi anni, non solo per le sue caratteristiche organolettiche superiori, ma anche per i benefici che apporta al prodotto finito, come una maggiore digeribilità, un miglioramento del profilo aromatico e un prolungamento della conservabilità del pane.

Nel presente elaborato vengono discussi i risultati e le osservazioni derivanti dall'esperienza di tirocinio condotta nell'inverno del 2024 presso il laboratorio della Sezione di Microbiologia degli Alimenti e Bioprocessi dell'Università degli Studi di Milano. Durante questa attività sono stati analizzati cinque campioni di pasta madre provenienti dalla Val Camonica, una regione caratterizzata da una tradizione panificatoria secolare. Il fine dello studio è quello di comprendere la composizione microbica di questi impasti e le loro caratteristiche chimico-fisiche, con l'obiettivo di fornire un contributo alla valorizzazione di un prodotto tipico di grande importanza culturale e alimentare.

I risultati ottenuti dalle analisi sono stati suddivisi in tre principali categorie: analisi chimiche, microbiologiche e prove di fermentazione. Per ogni campione di impasto acido, sono stati eseguiti controlli sul pH e sulla conta vitale in piastra. A partire dal campione proveniente dalla forneria Salvetti di Malonno è stato inoltre isolato un ceppo di lievito, che è stato successivamente fatto sviluppare in coltura pura; la biomassa ottenuta è stata valutata in termini di conta totale e di peso secco cellulare, e sono state allestite prove di determinazione delle performance fermentative.

L'analisi del pH ha consentito di valutare l'acidità dell'impasto, indicativa dell'attività dei microrganismi presenti. La variabilità dei risultati ottenuti è stata influenzata principalmente dalla frequenza dei rinfreschi e dal tipo di farina utilizzata nella preparazione degli impasti.

Le analisi microbiologiche dei campioni di pasta madre hanno mostrato buoni valori di cellule vitali, con batteri lattici nelle concentrazioni attese, mentre la concentrazione dei lieviti ha presentato una maggior variabilità tra i campioni. Tale diversità dipende da una combinazione di fattori come la modalità di gestione della pasta madre, le condizioni di fermentazione e la composizione della farina.

Le prove di fermentazione sono state effettuate utilizzando due metodi distinti: Hayduck e Burrows Harrison, in grado di valutare la capacità fermentativa del lievito rispettivamente in una soluzione di saccarosio o in un impasto modello costituito da farina e acqua.

Nel caso del metodo Hayduck, la produzione di CO_2 per il lievito isolato è stata superiore allo standard minimo richiesto, a conferma di un'ottima efficienza fermentativa del lievito. Al contrario, con il metodo Burrows Harrison, la produzione di CO_2 è risultata inferiore al valore minimo previsto dalla procedura. Questo risultato potrebbe essere legato alla diversa disponibilità di zuccheri fermentabili: il metodo Burrows Harrison si basa infatti sulla presenza di zuccheri fermentescibili presenti nella farina, più o meno disponibili per la fermentazione. Inoltre, la ridotta produzione di CO_2 con il metodo Burrows Harrison potrebbe riflettere anche le caratteristiche specifiche del ceppo di lievito, caratterizzato da una capacità fermentativa inferiore rispetto ad altri ceppi più commerciali.

Le analisi condotte hanno permesso di fornire un supporto significativo ai panifici coinvolti nel progetto, offrendo indicazioni utili per il miglioramento dei processi di produzione della pasta madre. Inoltre, tali studi hanno evidenziato la varietà dei lievitati prodotti in Val Camonica, sottolineando la ricchezza e la diversità microbica che caratterizzano questi prodotti tradizionali.

1. Introduzione

1.1 Storia e definizione della pasta madre

Nel linguaggio comune e scientifico, l'espressione più ricorrente impiegata come sinonimo di pasta madre, è "impasto acido". Questa espressione corrisponde al tedesco *saurteig*, che è stato tradotto nei paesi anglosassoni come *sourdough*, un termine che oggi è divenuto di uso universale. Un altro sinonimo frequentemente impiegato è "lievito naturale" (o *levain* in francese). Tuttavia, quest'ultimo termine può risultare fuorviante, poiché la pasta madre contiene non solo lieviti, ma una complessa comunità microbica che svolge un ruolo fondamentale nei processi di acidificazione e lievitazione (Gobbetti et al., 2013).

La storia della pasta madre, e dei prodotti da forno correlati, segue l'intero arco dello sviluppo della civiltà umana, dall'inizio dell'agricoltura fino ai giorni nostri. Il pane a lievitazione naturale, e i prodotti a base di cereali, sono esempi di alimenti che riassumono diversi tipi di conoscenza, che spaziano dalle pratiche agricole e dai processi tecnologici fino al patrimonio culturale.

Le origini dell'uso della pasta madre risalgono a tempi remoti e l'Egitto viene generalmente identificato come la culla del pane a lievitazione naturale (Guidotti, 2005). Si ritiene che gli Egizi, circa 3500 anni fa, abbiano scoperto per primi il processo di fermentazione naturale, un metodo che consisteva nel lasciare riposare all'aria aperta una porzione di impasto del giorno precedente. Quest'ultimo, grazie all'azione dei microrganismi presenti nell'ambiente, veniva poi utilizzato per avviare la fermentazione del nuovo impasto a base di farina e acqua. Questo processo, non solo favoriva il rigonfiamento dell'impasto, ma migliorava anche la digeribilità del prodotto finale. Gli Egizi utilizzavano anche la schiuma della birra per la produzione del pane e, contemporaneamente, selezionavano le migliori varietà di farina di grano e adottavano strumenti innovativi per la panificazione come i forni ad alta temperatura (Brandt M.J., 2005).

Nell'antico Egitto, il pane fermentato veniva denominato con il termine arabo *aish*, che significa "vita", a testimonianza del valore simbolico attribuito al pane stesso (Kashika Arora et al., 2021).

Sebbene le nozioni microbiologiche moderne non fossero ancora conosciute, la pratica della panificazione con pasta madre si diffuse rapidamente, tanto che, a partire dal I secolo a.C., tale metodo venne adottato in molte culture del mondo antico. Ogni civiltà sviluppò così varianti proprie della panificazione, sebbene tutte condividessero l'impiego di lievito naturale, tramandato attraverso le generazioni.

Un ruolo determinante nella diffusione della pasta madre lo ebbe il Cristianesimo, in particolare l'attività svolta dai monaci che, attraverso i loro pellegrinaggi, contribuirono significativamente alla

conservazione e alla diffusione di questa pratica. La religione cattolica ha sempre attribuito un'importante valenza simbolica al pane, considerato come "cibo di vita eterna", tant'è che nella Bibbia, la parola "pane" appare più di 400 volte, ed è spesso citato come simbolo di sostentamento spirituale e materiale (Archetti, 2015).

Parallelamente, in Grecia, il pane era un alimento consumato esclusivamente nelle case delle persone benestanti, e ai tempi erano note più di 70 varietà di prodotti da forno ottenuti con diversi processi di preparazione.

I Romani diedero un grande impulso al miglioramento delle tecniche di impasto e cottura dei prodotti lievitati e regolamentarono la produzione e distribuzione del pane. Marco Porcio Catone, politico dell'antica Roma, descrisse molte varietà di pane in *De agricultura* (160 a.C.). Tra queste, ad esempio, le più importanti erano il *libum* o pane votivo, la *placenta*, un pane di farina di grano, orzo e miele, l'*erneum*, una sorta di pandoro, e il *mustaceus*, un pane fatto con mosto d'uva. Nel primo secolo d.C., Plinio il Vecchio, scrittore e naturalista, riportò diversi metodi alternativi di lievitazione dell'impasto nella sua opera più nota: *Naturalis Historia*. Tra questi metodi definisce anche la pasta madre come "una sostanza acida che esegue la fermentazione" (Marcone, 1997).

In Figura 1 è riportata una schematizzazione dell'evoluzione del pane nella storia dell'uomo. Risulta evidente che i panificati, e di conseguenza anche la pasta madre, hanno da sempre avuto un ruolo fondamentale in molte culture, sia in ambito religioso che quotidiano.

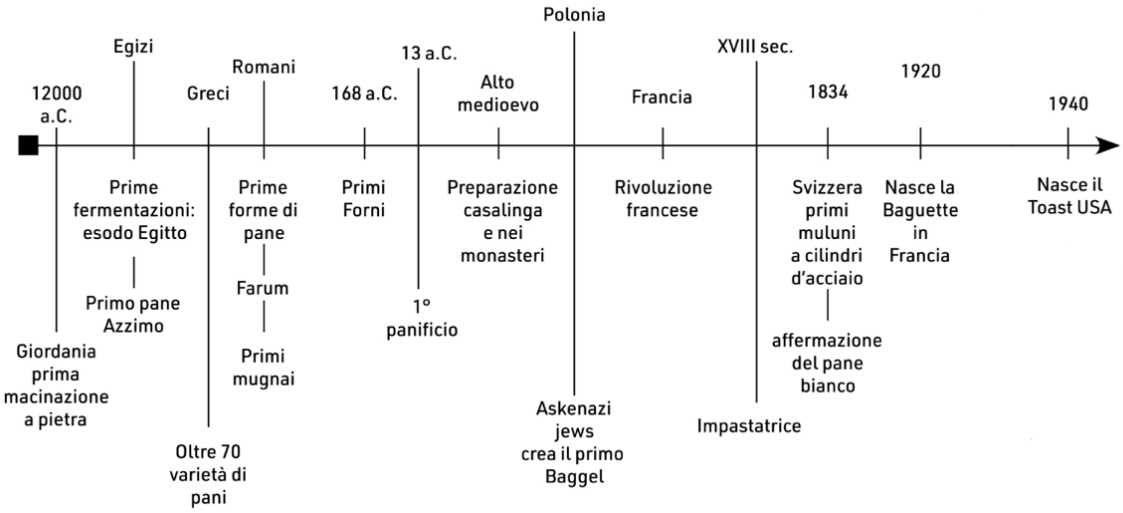

Figura 1. Storia del pane (Le basi della panificazione artigianale moderna, Marino, 2020)

Tuttavia, fu solo nel 1680 che l'ottico danese Antoine Van Leewenhoek intuì il ruolo delle cellule di lievito come principio lievitante, attraverso l'osservazione al microscopio ottico di residui della produzione della birra (Gobbetti, et al., 2013). Più tardi, nel 1850 il chimico francese Louis Pasteur,

riuscì a definire il meccanismo riproduttivo e fermentativo delle cellule di lievito. Inoltre, identificò la loro capacità di trasformare gli zuccheri in assenza di ossigeno, in alcol etilico e anidride carbonica. Dimostrò così il processo di fermentazione. Le sue scoperte non solo confermarono l'importanza dei microrganismi in questi processi, ma segnarono anche l'inizio della microbiologia moderna, rivoluzionando la produzione di alimenti e bevande come il pane e la birra (Gobbetti et al., 2013).

In Europa, le tradizioni più antiche di panificazione con pasta madre si trovano principalmente nei paesi scandinavi, in Germania e nell'Europa dell'Est, dove la coltivazione di cereali, in particolare della segale, ha portato allo sviluppo di tecniche di panificazione specifiche. Per quanto riguarda i paesi dell'Europa meridionale, come Italia, Francia e Spagna, la panificazione con farina di grano è diventata predominante (Brandt, 2007). L' Italia soprattutto si distingue per la produzione di più di 30 varietà tradizionali di prodotti da forno, sia salati che dolci, tra cui alcuni noti anche a livello internazionale, come il Pane di Altamura, il Panettone e pani tipici regionali (Kashika Arora et al., 2021).

Nonostante la lunga storia di questa pratica l'interesse scientifico per la fermentazione della pasta madre è emerso solo negli ultimi decenni. Infatti, fino alla metà del XIX secolo, la panificazione con pasta madre era prevalente, ma a partire dalla seconda metà del secolo la sua diffusione ha subito una progressiva riduzione a favore del lievito di birra (*Saccharomyces cerevisiae*), il quale ha semplificato il processo produttivo, favorendo l'industrializzazione della panificazione.

Nel XX secolo, l'utilizzo della pasta madre si è mantenuto quasi esclusivamente nell'ambito della panificazione artigianale. Tuttavia, negli ultimi anni, grazie alle riconosciute proprietà organolettiche e nutrizionali dei prodotti a lievitazione naturale, si è assistito a un rinnovato interesse verso la pasta madre anche da parte dell'industria, riscoprendone così le sue potenzialità (Gobbetti & Rizzello, 2023). Si stima infatti che il mercato della pasta madre in Europa Occidentale raggiunga un valore superiore ai 900 milioni di euro nel periodo compreso tra il 2016 e il 2026 (CREA, 2020).

I benefici offerti dalla pasta madre rispetto al lievito di birra sono molteplici e comprendono vantaggi sotto il profilo reologico, sensoriale, nutrizionale e una maggiore durata di conservazione. Tali caratteristiche sono il risultato dell'attività fermentativa, della sintesi di composti volatili, e delle proprietà antimicrobiche esercitate dai batteri lattici presenti nella pasta madre (Gobbetti, 1998; Hammes & Ganzle, 1998; Corsetti & Settanni, 2007). Inoltre, è importante sottolineare che l'impiego della pasta madre non è mai stato completamente abbandonato, soprattutto nei paesi del Nord Europa, in quanto rappresenta l'unica tecnica efficace per la panificazione della segale, in grado di garantire il corretto sviluppo dell'acidità necessaria per favorire la fermentazione.

Oggi, il mercato globale offre un'ampia varietà di prodotti da forno a lievitazione naturale con una tradizione documentata e radicata, come i pani tedeschi, il pane di San Francisco, il *pain au levain*

francese, e in Italia il Panettone, il Pandoro, la Colomba, nonché vari pani regionali. Un ruolo fondamentale nella conservazione di queste tradizioni è svolto dai panifici artigianali che hanno permesso di tramandare, di generazione in generazione, antiche ricette e pratiche di panificazione, preservando così un patrimonio culinario che oggi fa parte del valore culturale di numerose comunità locali.

Attualmente, la pasta madre non è regolamentata da una definizione codificata nella legislazione italiana. Tuttavia, grazie alla vasta documentazione storica disponibile riguardante la sua produzione, è possibile formulare una definizione generale di questa tecnica produttiva. La pasta madre può essere definita come una miscela di farina e acqua, eventualmente arricchita con l'aggiunta di sale, fermentata da batteri lattici e lieviti presenti nella farina e nell'ambiente, che ne determinano la capacità di acidificare e lievitare. La sua produzione avviene attraverso una serie di rinfreschi successivi, che permettono di mantenere attiva e vitale la popolazione microbica, garantendo così la capacità di fermentazione e lievitazione dell'impasto. La fermentazione stessa è resa possibile dall'attività di batteri lattici e lieviti endogeni presenti nella farina, i quali sono responsabili della trasformazione biochimica che caratterizza questo prodotto (Gobbetti et al., 2013).

Nel dettaglio, i batteri lattici sono i principali responsabili del processo di acidificazione dell'impasto, mentre i lieviti svolgono un ruolo cruciale nella lievitazione. L'interazione tra questi due gruppi di microrganismi è essenziale per il conseguimento di una pasta madre stabile e con una buona capacità lievitante (Hammes & Ganzle, 1998).

La terminologia della pasta madre varia in funzione delle fasi specifiche del processo produttivo. Ad esempio, quando la pasta madre viene aggiunta alla miscela di farina e acqua durante il rinfresco, si può fare riferimento ad essa come "madre". Al termine del processo produttivo, una volta ottenuta una quantità sufficiente di pasta madre matura, essa è comunemente indicata con i termini "pasta madre matura" o "impasto acido maturo" (Ottogalli et al., 1996). Questa distinzione è importante, poiché segnala il raggiungimento di una fase avanzata del processo, in cui l'impasto ha acquisito la sua piena capacità di lievitazione e fermentazione.

In conclusione, la pasta madre rappresenta un prodotto tradizionale che non solo incarna un importante patrimonio culturale e gastronomico ma è anche il risultato di una serie di processi biologici complessi e ben documentati. La sua definizione e terminologia, pur essendo oggetto di diverse interpretazioni, ruota attorno ai principi fondamentali di fermentazione spontanea e interazione tra microrganismi naturali. La comprensione di questi aspetti è essenziale per una corretta applicazione della tecnica nella panificazione e per la tutela delle tradizioni culinarie ad essa legate.

1.2 Caratteristiche chimico-fisiche impasti acidi

La pasta madre è definita da una serie di parametri chimico-fisici e microbiologici, i quali influenzano la sua qualità e le caratteristiche del prodotto finale.
Ovviamente molti dei parametri chimici sono in realtà una conseguenza dell'attività di batteri lattici e lieviti e della composizione sia qualitativa che quantitativa della pasta madre.
Tra le principali caratteristiche chimico-fisiche che contribuiscono a definire la qualità di una pasta madre, è importante ricordare le seguenti:

- Acidità dell'impasto;
- Consistenza;
- Quoziente di fermentazione;
- Concentrazione di amminoacidi liberi (Gobbetti & Rizzello, 2023)

Questi parametri possono variare in funzione delle esigenze specifiche del prodotto finito che a sua volta dipendono dalle tradizioni e dalle preferenze dei diversi Paesi. Come precedentemente accennato, la qualità della pasta madre è definita sia da fattori endogeni (attività enzimatica, disponibilità di lipidi, carboidrati e fonti azotate) sia da fattori esogeni, tra cui quelli applicati in fase di lavorazione dell'impasto, quali temperatura, impiego dell'inoculo e ossigenazione (Gobbetti et al., 2013). I fattori che influenzano il profilo qualitativo della pasta madre sono riportati in Figura 2.

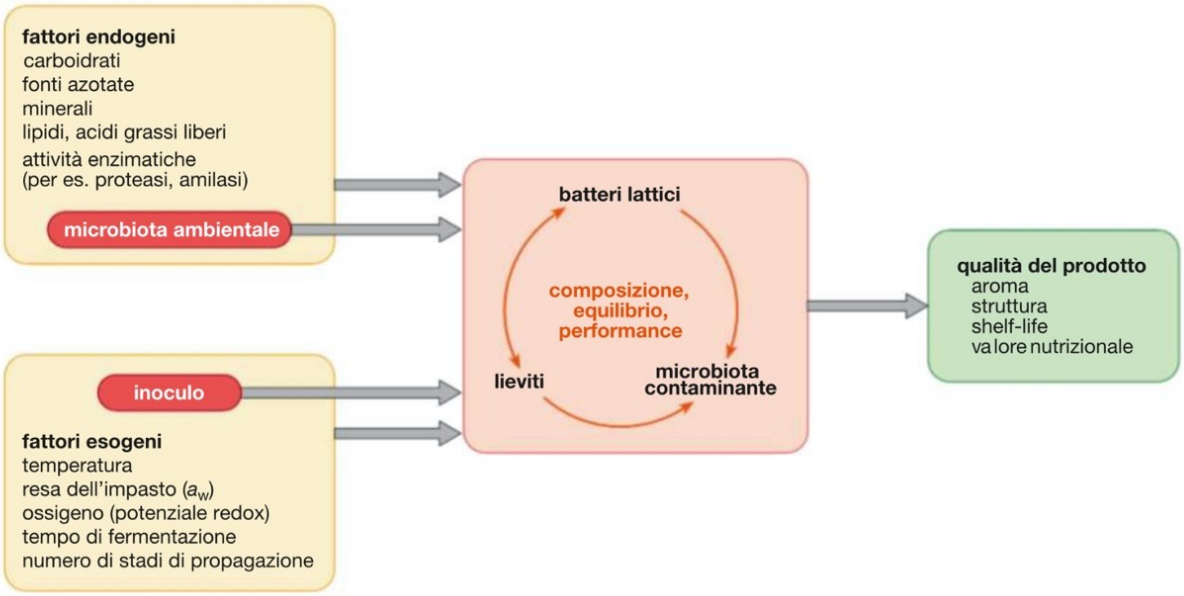

Figura 2. Fattori che influenzano la performance della pasta madre (Gobbetti, adattata da Hammes & Gänzle,1998)

Di seguito vengono approfonditi le principali caratteristiche chimico-fisiche che definiscono la qualità della pasta madre:

- L' **acidità dell'impasto**, comunemente espressa in termini di pH, è un parametro cruciale durante la fermentazione della pasta madre. Essa può variare a seconda delle condizioni di processo e dei microrganismi selezionati durante la preparazione. I valori di pH ottimali per una corretta fermentazione della pasta madre, ottenuta da farina di grano, generalmente rientrano nell'intervallo 3,5 - 4,3 (Collar et al., 1994). È possibile modulare il pH di una pasta madre e il valore di acidificazione dell'impasto intervenendo sulle proporzioni di farina e acqua introdotte durante i rinfreschi, sulla frequenza dei rinfreschi e il tempo di fermentazione. Infatti, dopo il riposo notturno, e a seguito del rinfresco, l'acidità tende ad aumentare, principalmente a causa dell'attività svolta dai batteri lattici. Questi parametri influenzano la crescita dei diversi microorganismi e contribuiscono alla definizione del microbiota della pasta madre. In alcune regioni, come quelle dove si produce tradizionalmente pane di segale, si predilige una pasta madre con un'elevata acidità, poiché un pH basso è fondamentale per il controllo delle attività enzimatiche della farina, per l'elasticità della mollica e per la *shelf-life* del prodotto (Huys et al., 2013). Al contrario, nei Paesi del Sud Europa e negli Stati Uniti, dove la farina di grano è più comunemente utilizzata, la pasta madre presenta un pH superiore (Brandt, 2007).

- La pasta madre può avere **consistenze** differenti. La consistenza, anche definita rendimento dell'impasto, dipende dal rapporto tra acqua e farina. Questo rapporto è fondamentale, poiché la farina può avere diverse capacità di assorbimento dell'acqua, influenzando in tal modo la consistenza finale dell'impasto. Il parametro che descrive questa relazione è il **Dough Yield (DY)**, calcolato attraverso la formula:

$$DY = \frac{(Peso\ della\ farina + Peso\ dell'acqua)}{Peso\ della\ farina}\ x\ 100$$

  Per un calcolo più accurato, sarebbe opportuno sommare al numeratore il peso di tutti gli ingredienti presenti nell'impasto. La consistenza è fortemente influenzata dalla tecnica di gestione dell'impasto: si può infatti parlare di impasti compatti/soffici, fino ad arrivare alla pasta madre liquida. In generale, gli impasti più compatti presentano valori di DY compresi tra 150 e 160, mentre quelli liquidi tendono ad avere valori di DY superiori a 200 (Decock e

Cappelle, 2005). Numerosi studi hanno evidenziato che il DY della pasta madre, insieme alla temperatura di fermentazione, influisce profondamente sulle caratteristiche sensoriali del prodotto finale, in particolare sul rapporto tra acido lattico e acido acetico. In generale, impasti più solidi (bassi valori di DY e temperature di fermentazione intorno ai 25°C) tendono a produrre maggiore acido acetico, mentre valori più alti di DY, associati a impasti più soffici e temperature più elevate (35-37°C), favoriscono la produzione di acido lattico (Onno, 1994).

- Con **quoziente di fermentazione** (QF) si intende il rapporto molare tra l'acido lattico (a.l.) e l'acido acetico (a.a.) presenti nella pasta madre, secondo la formula:

$$QF = \frac{\dfrac{g\ di\ a.l.\ presenti\ in\ 100\ g\ di\ impasto}{peso\ molecolare\ a.l}}{\dfrac{g\ di\ a.a.\ presenti\ in\ 100\ g\ di\ impasto}{peso\ molecolare\ a.a.}}$$

Questo rapporto è considerato ottimale per valori compresi tra 1,5 e 4 (Jayaram et al. 2014). Conoscere il QF consente di anticipare il comportamento della pasta madre durante la fermentazione, offrendo ai panettieri la possibilità di regolare con precisione i tempi e le condizioni per ottenere il giusto livello di acidità e, di conseguenza, l'aroma desiderato.
Il QF può variare in funzione della prevalenza di batteri lattici con metabolismo omofermentante o eterofermentante, della disponibilità di carboidrati fermentescibili e dei parametri ambientali, quali temperatura, DY, e disponibilità di ossigeno, durante la fase di fermentazione.

- Gli **amminoacidi** presenti all'interno della pasta madre derivano da processi di proteolisi che si verificano durante la fase di maturazione degli impasti. Tale processo è mediato dagli enzimi proteolitici endogeni della farina e dalle proteasi e peptidasi prodotte dai batteri lattici. La concentrazione di amminoacidi liberi nella pasta madre rappresenta un indicatore importante dell'intensità dei processi di proteolisi (Arora et al., 2021), nonché un parametro chiave per la valutazione del profilo qualitativo del prodotto finito. Gli amminoacidi liberi contribuiscono a migliorare la sapidità dell'impasto e arricchiscono il prodotto di composti volatili, responsabili degli aromi. La concentrazione di amminoacidi liberi nella pasta madre può variare ampiamente, da 400 a 5000 mg/kg, e dipende da numerosi fattori, quali la tipologia di farina utilizzata, le condizioni di fermentazione e i ceppi batterici coinvolti nel processo.

I fattori sopra citati sono i principali parametri chimico-fisici che influenzano il profilo qualitativo della pasta madre. È importante, tuttavia, sottolineare che la pasta madre rappresenta un sistema complesso, la cui qualità dipende da una molteplicità di fattori. Tra questi, spiccano la materia prima utilizzata, la scelta dei parametri di processo adeguati e le caratteristiche fisiologiche degli agenti lievitanti coinvolti nei processi fermentativi. Un aspetto centrale nella trasformazione dei prodotti lievitati da forno è rappresentato dalle specie microbiche presenti nella pasta madre, con particolare riferimento ai lieviti e ai batteri lattici (LAB, acronimo dell'inglese Lactic Acid Bacteria). I LAB sono responsabili dell'acidificazione della miscela farina-acqua attraverso la produzione di acido lattico e/o acido acetico, nonché della formazione del sapore (principalmente il sapore acido). I lieviti invece sono responsabili della formazione di sapori più complessi (in particolare attribuiti agli alcoli superiori e agli esteri, un composto chiave è l'acetato di etile) e della lievitazione tramite la produzione di anidride carbonica (Gänzle 2015; Pétel, Onno, e Prost, 2017). Una pasta madre può ospitare consorzi microbici che vanno da composizioni semplici (con poche specie) a strutture molto complesse.

1.3 Lieviti

I lieviti sono organismi unicellulari, eucarioti, appartenenti al phylum *Ascomycota*. La loro riproduzione avviene principalmente in modo asessuale, tramite gemmazione.
La pasta madre rappresenta un ecosistema caratterizzato da condizioni ecologiche selettive che favoriscono lo sviluppo esclusivo di alcune specie di lieviti. Diversi fattori possono limitare la proliferazione dei lieviti in questo ambiente, tra cui:

- l'acidità del substrato;
- la competizione per i nutrienti;
- l'elevata pressione osmotica;
- lo stress ossidativo.

Le principali specie di lieviti adattate all'ecosistema della pasta madre appartengono generalmente al subphylum *Saccharomycotina*, classe *Saccharomycetes*, ordine *Saccharomycetales* e famiglia *Saccharomycetaceae* (Huys et al., 2013). La specie di lievito più rappresentativa in questo contesto è *Saccharomyces cerevisiae*, noto nel linguaggio comune della panificazione come "lievito". Questo fungo è ampiamente utilizzato nell'industria alimentare grazie alla sua capacità di metabolizzare fonti zuccherine e convertire il glucosio in alcool durante il processo di fermentazione alcolica. Tale

meccanismo è alla base della produzione di birra, vino e prodotti da forno. Il nome *Saccharomyces cerevisiae* è infatti associato all'uso di questo lievito nella produzione di birra, con il termine "cerevisiae" che deriva dal francese "cerevisiae", che significa appunto "birra" (Mortimer, 2000). Questo fungo colonizza in modo massiccio gli ambienti di fermentazione artificiale, dove si riproduce, si evolve e può essere disperso nell'ambiente. Nonostante *S. cerevisiae* sia considerato un lievito "addomesticato", legato a contesti antropizzati, recenti ricerche hanno evidenziato la sua presenza anche in nicchie ecologiche naturali, prive di intervento umano (Carbonetto et al., 2018). Oltre a *S. cerevisiae*, nella pasta madre si trovano frequentemente altre specie di lieviti, tra cui:

- *Candida glabrata*;
- *Kazachstania bulderi* (sinonimo di *Saccharomyces bulderi*);
- *Kazachstania exigua* (sin. *S. exiguus*; specie anamorfa: *Candida holmii*);
- *Kazachstania humilis* (sin. *Candida humilis*, *Candida milleri*);
- *Kazachstania servazzii*;
- *Kazachstania barnettii*;
- *Pichia kudriavzevii*;
- *Torulaspora delbrueckii*;
- *Wickerhamomyces anomalus* (Vrancken et al., 2010)

Queste specie sono tra le principali isolate in diversi campioni di pasta madre negli ultimi dieci anni. La loro identificazione e classificazione viene regolarmente aggiornata nella banca dati *The Yeasts Trust*, accessibile online.

È importante sottolineare che la composizione della popolazione di lieviti nella pasta madre varia significativamente in funzione della localizzazione geografica. Infatti, la letteratura scientifica riporta l'isolamento di oltre 30 specie di lieviti da paste madri provenienti da diverse aree geografiche (DeVuyst e Vancanneyt, 2007).

Sebbene nella pasta madre i lieviti rappresentino una minoranza rispetto ai batteri lattici, essi sono comunque presenti in tutte le fasi del processo produttivo, dalla coltivazione dei cereali fino alla maturazione dell'impasto. La popolazione microbica nei cereali è inizialmente molto alta, con valori che si aggirano tra 10^2 e 10^4 Unità Formanti Colonia (UFC)/g, ma tende a diminuire progressivamente a causa del processo di disidratazione che sfavorisce la crescita di questi microrganismi (Gobbetti & Rizzello, 2023). Nella farina, i lieviti costituiscono circa l'1% della popolazione microbica, mentre i batteri lattici e le muffe prevalgono. Con il processo di macinatura e la successiva preparazione dell'impasto, la popolazione di lieviti tende ad aumentare, poiché queste operazioni creano un

ambiente favorevole alla proliferazione di specie come *Saccharomyces cerevisiae* e lieviti appartenenti al genere *Candida*. Nell'impasto acido, la popolazione di lieviti può raggiungere valori tra 10^5 e 10^7 UFC/g.

I lieviti sono microrganismi importanti per la produzione di componenti aromatiche e per la lievitazione dell'impasto. Una delle caratteristiche peculiari di queste cellule è la capacità di convertire rapidamente gli zuccheri in etanolo e anidride carbonica. Sebbene tutti i lieviti ottengano energia chimica dalla demolizione dei composti organici, la loro diversità metabolica e catabolica è notevole, variando in relazione al tipo di substrato e alle condizioni chimico-fisiche del sistema.
I lieviti si suddividono in due gruppi: respiro-fermentativi e respiratori. I lieviti respiro-fermentativi, come *S. cerevisiae*, sono caratterizzati da una rapida sintesi di etanolo e CO_2, ma una bassa produzione di biomassa, mentre i lieviti respiratori hanno un'alta resa di biomassa e bassa velocità di trasporto del glucosio (Blank et al., 2005).
Nel processo di panificazione, i lieviti, in presenza di ossigeno, attuano la respirazione aerobica, per poi passare alla fermentazione anaerobica quando l'ossigeno scarseggia.
I carboidrati metabolizzati da *S. cerevisiae* sono principalmente glucosio, galattosio, fruttosio, saccarosio e maltosio, presenti naturalmente nella farina o aggiunti durante la produzione. I monosaccaridi fermentescibili (glucosio, galattosio e fruttosio) vengono trasportati rapidamente nella cellula. Al contrario, i disaccaridi (maltosio e saccarosio) devono essere prima idrolizzati in monosaccaridi da maltasi e invertasi (Gobbetti & Rizzello, 2023). Una volta resi disponibili, i monosaccaridi entrano nella cellula per diffusione facilitata e proseguono nella via glicolitica (EMP, Embden-Meyerhof-Parnas) e nella fermentazione alcolica.
Nel caso di *S. cerevisiae* durante la glicolisi, il glucosio viene trasformato in piruvato, producendo ATP e NADH secondo la seguente reazione.

$$Glucosio + 2\ NAD^+ + 2\ ADP + 2\ Pi \rightarrow 2\ Piruvato + 2\ NADH + 2\ H^+ + 2\ ATP + 2H_2O$$

In presenza di ossigeno, il piruvato entra nel ciclo dell'acido citrico, ma, in condizioni di anaerobiosi, passa alla fermentazione alcolica, dove viene ridotto dal NADH a etanolo e CO_2 (Figura 3).

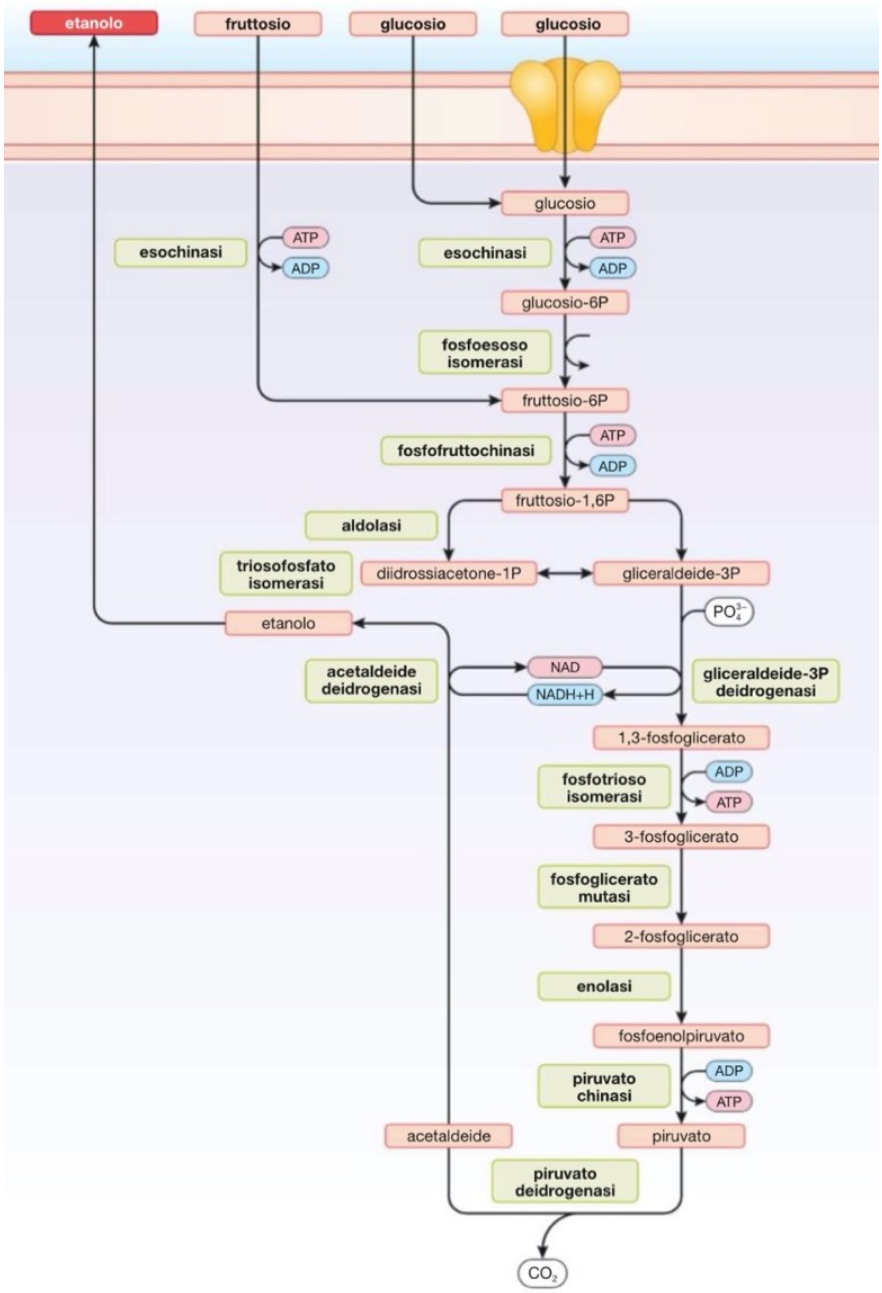

Figura 3. Fermentazione alcolica (Gobbetti, adattata da Pretorius, 2000)

Il maltosio riveste un ruolo fondamentale nella fermentazione degli impasti, in quanto, una volta esauriti il glucosio e il fruttosio (che nella farina hanno una concentrazione bassa, circa 0,5-2%), rappresenta la principale fonte di carbonio fermentabile disponibile. L'attività fermentativa nei lieviti varia in base alla capacità enzimatica dei ceppi di **maltasi** (Barber et al., 1991). Quest'ultima è fondamentale per determinare la velocità di fermentazione: ceppi di *S. cerevisiae* con bassa attività maltasica impiegano circa 20-30 minuti in più per raddoppiare il volume dell'impasto rispetto a ceppi con alta attività maltasica. Questo aspetto è di grande rilevanza applicativa per l'industria della panificazione, poiché la velocità di lievitazione influisce direttamente sulla qualità del prodotto finale

(Gobbetti & Rizzello, 2023). Non tutti i lieviti possiedono la capacità di fermentare il maltosio, come nel caso dei ceppi appartenenti al genere *Kazachstania*. Questi lieviti, infatti, sono privi dei geni necessari per l'utilizzo del maltosio, il che favorisce l'instaurarsi di interazioni cooperative tra i lieviti maltosio-negativi e la popolazione di batteri lattici presenti nella pasta madre.
In generale negli impasti fermentati da lieviti e batteri lattici, la concentrazione di maltosio rimane inizialmente alta, su valori che si aggirano intorno ai 2-5 g/kg (Martinez et al., 1993). Il maltosio si accumula infatti nelle prime fasi, perché non è metabolizzabile dai lieviti finché sono presenti nella pasta madre glucosio e fruttosio, poiché tali zuccheri hanno un effetto di repressione metabolica sulle maltosio-permeasi.
L'assenza di competizione per il maltosio tra i lieviti e i LAB è un altro aspetto cruciale da considerare per favorire una cooperazione metabolica vantaggiosa. Un esempio particolarmente noto è quello del pane francese, in cui *Saccharomyces exiguus* utilizza glucosio e fruttosio senza competere con *Fructilactobacillus sanfranciscensis* per il maltosio (DeVuyst et al., 2021). Quest'ultimo idrolizza il maltosio, accumulando glucosio nel mezzo, che può essere utilizzato dal lievito maltosio-negativo come *S. exigus*. Inoltre, *S. exigus* dimostra un'elevata tolleranza nei confronti dell'acido acetico sintetizzato dal batterio e libera amminoacidi indispensabili a *F. sanfranciscensis.*
Oltre a etanolo e CO_2, durante la fermentazione, *Saccharomyces cerevisiae* produce anche una serie di composti volatili, tra cui acido lattico, acetico, propionico, succinico, piruvico, butirrico e caproico. L'accumulo di questi composti contribuisce alla riduzione del pH, senza però influenzare significativamente l'attività dei lieviti.

Un altro importante processo svolto dai lieviti e dai LAB è il metabolismo delle sostanze azotate, che contribuisce alla formazione del profilo organolettico nei prodotti fermentati. L'aroma nei prodotti da forno deriva da molecole prodotte durante la fermentazione e il trattamento termico, che si volatilizzano durante la cottura. Gli amminoacidi sono precursori di molecole responsabili dell'aroma, come per esempio gli alcoli superiori e gli esteri. In Figura 4 è rappresentata la sintesi delle molecole responsabili dell'aroma, incluse le sostanze azotate. Gli amminoacidi ramificati vengono prima trasformati in α-chetoacidi, che poi diventano aldeidi e, infine, alcoli superiori grazie a specifiche deidrogenasi. Questi alcoli possono anche provenire dai chetoacidi prodotti dal metabolismo dei carboidrati, soprattutto nei dolci da forno (come Colomba e Panettone) (Gobbetti et al., 2013). Gli alcoli superiori possono essere poi convertiti in acidi, e dall' interazione tra alcoli e acidi si formano gli esteri. Tra gli esteri, acidi e chetoni più comuni nella pasta madre ci sono etilacetato, etil lattato, acido acetico e acido propionico. Anche i LAB possono contribuire alla produzione di esteri nei lievitati: il profilo aromatico del pane ottenuto con pasta madre è più

complesso rispetto a quello ottenuto con lievito di birra proprio grazie alle interazioni che si instaurano nell'ambito del complesso microbiota.
Inoltre, amminoacidi come arginina e glutammina interagiscono con gli zuccheri durante la cottura, partecipando alle reazioni di Maillard, che danno sapore e aroma ai prodotti lievitati (Lhomme et al., 2016).

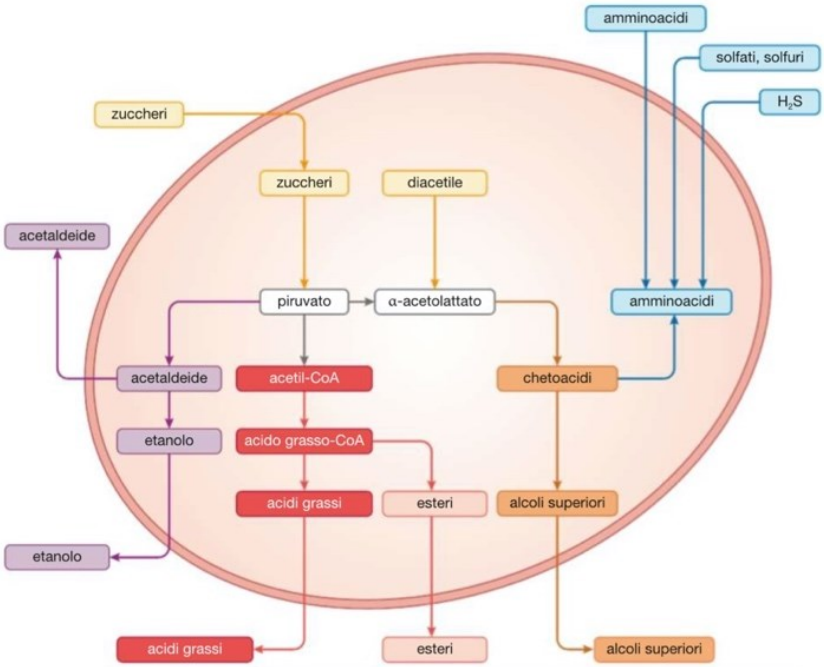

Figura 4. Sintesi di composti responsabili dell'aroma a partire da amminoacidi, carboidrati e composti solforati (Gobbetti, 2023)

1.4 Batteri lattici

All'interno della pasta madre si trovano sia batteri Gram positivi, come i batteri lattici, *Bacillus spp.* e *Staphylococcus spp.,* che batteri Gram negativi, come *Pseudomonas* spp. ed *Enterobacteriaceae* (Gobbetti & Rizzello, 2023). Tuttavia, i batteri Gram negativi sono tipicamente presenti solo nelle fasi iniziali della fermentazione, per poi essere sostituiti dai batteri lattici man mano che il processo di fermentazione prosegue.
I batteri lattici rappresentano un gruppo funzionale di batteri Gram positivi, non mobili e non sporigeni, caratterizzati da un metabolismo fermentativo: producono acido lattico, come prodotto principale, ma possono portare alla formazione di prodotti metabolici differenti (Axelsson, 2004). Questi microrganismi sono predominanti nella pasta madre rispetto ai lieviti e sono ampliamenti diffusi in natura. I LAB prediligono ecosistemi ricchi di nutrienti in quanto presentano esigenze nutrizionali molto complesse, che richiedono non solo una fonte di energia, generalmente un carboidrato, ma anche amminoacidi, peptidi, acidi grassi, sali e vitamine.

Attualmente non è stato identificato un microbiota LAB tipico per la pasta madre, poiché la sua composizione varia in base a diversi fattori: tipo di farina, interazioni tra i LAB e i lieviti, altri batteri presenti, attività enzimatiche endogene e parametri del processo (Arendt et al., 2007)
I LAB presenti nella pasta madre appartengono tutti all'ordine *Lactobacillales*. Sebbene siano state identificate specie di batteri lattici appartenenti ai generi *Pediococcus, Enterococcus, Lactococcus, Weissella e Leuconostoc*, i LAB più frequentemente isolati nella pasta madre appartengono al genere dei *Lactobacillus*.
Recentemente, nel 2020, il genere *Lactobacillus* a cui appartengono le specie di interesse per la fermentazione dei panificati, è stato ridimensionato e molte specie, prima incluse in esso, sono state riclassificate in generi differenti (Zheng et al., 2020).
Uno dei processi più importanti svolti dai LAB all'interno della pasta madre, riguarda la fermentazione lattica. I batteri lattici possono essere suddivisi in tre gruppi in base al substrato glucidico e alla via metabolica che utilizzano:

1) **Batteri omofermentanti obbligati**. Questi batteri fermentano gli esosi (in particolare il maltosio nella pasta madre) attraverso la via EMP (Embden-Meyerhof-Parnas): un tipo di glicolisi che porta alla produzione esclusiva di acido lattico.
   L. delbrueckii e L. acidophilus sono esempi di batteri omofermentanti obbligati.

2) **Batteri eterofermentanti obbligati.** Questi batteri fermentano sia gli esosi che i pentosi attraverso la via dei pentoso-fosfati (6-fosfogluconato-fosfochetolasi, nota come 6-PG/PK). Pertanto, sintetizzano l'acido lattico e l'etanolo oppure l'acido acetico. Gli esosi producono anche una certa quantità di CO_2 che però è minima rispetto alla quantità prodotta dai lieviti. Questa categoria include *Fructilactobacillus sanfranciscensis.*

3) **Batteri eterofermentanti facoltativi**: Questi batteri fermentano gli esosi attraverso la via EMP ed i pentosi attraverso la via dei pentoso-fosfati. Essi sintetizzano perciò l'acido lattico e l'etanolo oppure l'acido acetico (Hammes & Vogel, 1995).

La revisione della tassonomia dei batteri lattici ha portato a una semplificazione delle categorie metaboliche, raggruppando i LAB in due categorie principali: omofermentanti ed eterofermentanti. Abolendo così la distinzione tra eterofermentanti obbligati e facoltativi.
Contrariamente a quanto accade in altri alimenti fermentati, dove i batteri lattici omofermentanti sono prevalenti, nella pasta madre i batteri lattici eterofermentanti sono dominanti (De Vuyst & Neysens,

2005). Questa predominanza non è casuale ma è il risultato di una serie di fattori metabolici, ambientali e adattativi che consentono a questi microrganismi di prosperare nell'impasto. Un fattore fondamentale che favorisce la crescita dei LAB eterofermentanti, è la loro capacità di utilizzare in modo efficiente i carboidrati presenti nella pasta madre. In particolare, il maltosio, principale zucchero derivante dall'amido della farina, viene metabolizzato attraverso l'enzima maltosio fosforilasi. Tale meccanismo differisce da quello usato dai batteri omofermentanti e conferisce un vantaggio competitivo alle specie eterofermentanti. Oltre al maltosio, questi batteri sono anche in grado di sfruttare i pentosi tramite la seconda parte della via 6-PG/PK, aumentando così le loro possibilità di sopravvivenza in condizioni in cui le risorse energetiche sono variabili.
Un altro elemento distintivo dei batteri eterofermentanti è la loro capacità di utilizzare il fruttosio come accettore di elettroni, una strategia che consente di mantenere attivo il metabolismo fermentativo anche quando altre fonti di carbonio sono limitate.
In Figura 5 è riportato il metabolismo di *F. sanfranciscensis*, eterofermentante obbligato di notevole importanza nei prodotti lievitati.

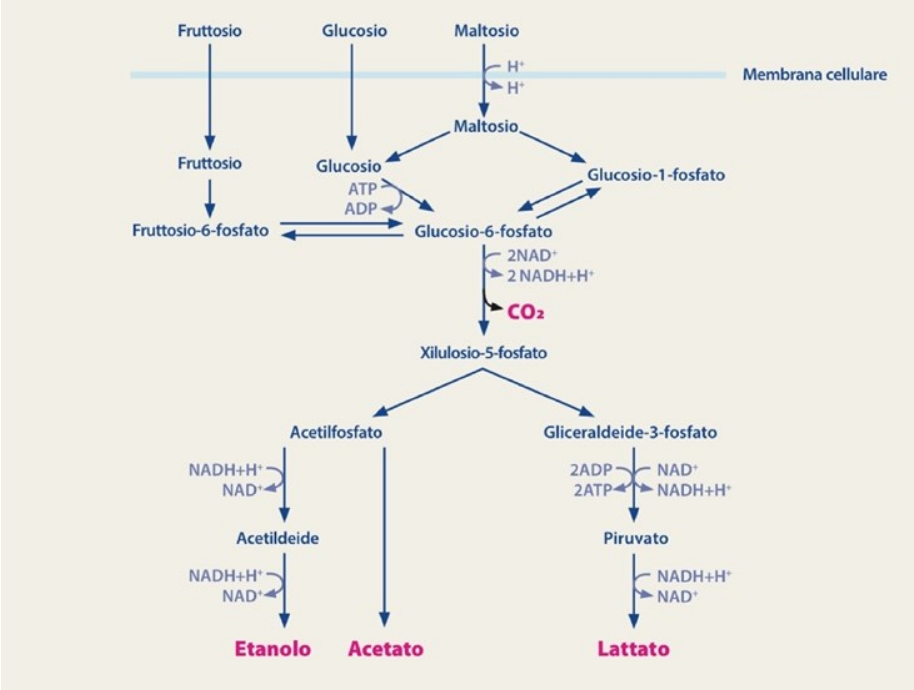

Figura 5. Metabolismo eterofermentante dei batteri lattico (Lesaffre, adattato da Lhomme et al., 2016)

I LAB svolgono un ruolo fondamentale all'interno della pasta madre, non solo per la produzione di acidi organici (essenziali per lo sviluppo del profilo aromatico), ma anche per la sintesi di sostanze che contribuiscono a migliorare la conservazione dei lievitati.
In particolare, i LAB producono gli esopolisaccaridi, che favoriscono l'assorbimento di acqua, migliorando la morbidezza del prodotto e ritardandone il raffermamento. Inoltre, i batteri lattici,

specialmente gli eterofermentanti, secernono sostanze fungicide, che inibiscono microrganismi saprofiti come le muffe, assicurando così una maggior durata e conservazione dei prodotti (Gänzle, 2007).

I LAB, come riportato a pagina 18, sono anche coinvolti nel metabolismo dell'azoto, un processo fondamentale per assicurare il profilo organolettico della pasta madre.

Poiché i LAB sono auxotrofici per diversi amminoacidi, per acquisire questi composti organici, devono ricorrere alla proteolisi (Hebert et al., 2000): un processo mediante il quale le proteine vengono degradate per fornire amminoacidi.

La proteolisi, che avviene durante la fermentazione dell'impasto, si compone di due stadi: la proteolisi primaria e la proteolisi secondaria. La prima fase di questo processo è attribuibile alle proteinasi endogene della farina. L'attività di questi enzimi è ottimale con un pH tra 3,0 e 4,5. L'acidificazione dell'impasto dovuta alla produzione di acido lattico e acido acetico da parte dei LAB nella pasta madre, ne favorisce l'attivazione. La proteolisi primaria porta così alla formazione di oligopeptidi, che attraverso appositi sistemi di trasporto, possono entrare all'interno della cellula batterica e dare avvio alla seconda fase del processo. All'interno dei batteri, infatti, il sistema di peptidasi permette il rilascio di amminoacidi e peptidi di piccole dimensioni. Alcuni amminoacidi sono utilizzati dai batteri per le loro esigenze metaboliche, altri, invece, come l'arginina e la glutammina, attraversano vie metaboliche che determinano la sintesi dei composti aromatici come l'ornitina. È importante notare che l'uso di pasta madre nella produzione di pane richiede un livello di proteolisi limitato per prevenire l'eccessiva degradazione del glutine, ma sufficiente a liberare una considerevole quantità di amminoacidi come precursori di composti volatili.

1.5 Modalità di produzione della pasta madre

Esistono diversi sistemi che possono essere utilizzati per la preparazione della pasta madre, ma, indipendentemente dal protocollo adottato, l'obiettivo comune è ottenere un agente lievitante contenente microrganismi capaci di produrre CO_2 e di favorire un'adeguata acidificazione.

Per mantenere attivo il metabolismo della popolazione microbica, è necessario effettuare i rinfreschi. Il termine "rinfresco", o propagazione, si riferisce alla tecnica con la quale un impasto, composto da farina e acqua (e talvolta anche da altri ingredienti), fermenta spontaneamente per un certo periodo di tempo e, successivamente, viene utilizzato come innesco per avviare la fermentazione di una nuova miscela di farina e acqua.

Indipendentemente dal metodo impiegato, la composizione microbica di una pasta madre è rappresentata da un insieme di batteri lattici e lieviti. Durante le fasi che conducono alla preparazione della pasta madre, la popolazione microbica subisce notevoli cambiamenti sia qualitativi che

quantitativi. Nelle fasi iniziali della fermentazione, i batteri lattici prendono rapidamente il sopravvento sui batteri Gram negativi, i quali, dopo circa 24 ore di fermentazione, costituiscono ancora il 98% della popolazione microbica. La soppressione dei batteri Gram negativi, rappresentati in gran parte da Enterobacteriaceae, è dovuta principalmente alla capacità dei batteri lattici di produrre acido acetico e lattico con conseguente rapido decrescimento del valore di pH da circa 5,8 a 4,5 nelle prime 24 ore di fermentazione (Onno & Roussel, 1994). Dopo circa 72 ore di fermentazione, la popolazione microbica è costituita per l'80% da batteri lattici e per la restante parte da lieviti. Le proporzioni tra batteri lattici e leviti possono variare in base al tipo di pasta madre impiegata. Infatti, secondo la classificazione di De Vuyst et al. (2021) è possibile distinguere quattro tipologie di pasta madre:

- **Tipo 0**: La pasta madre di tipo 0 prende spesso il nome di pre-impasto o, più comunemente biga. Si tratta di un impasto fermentato costituito solamente da acqua e farina a cui segue poi l'aggiunta di lievito di birra. A causa di questo ultimo passaggio, i prodotti ottenuti non sono considerati dei prodotti a lievitazione naturale. In questo tipo di impasto i lieviti crescono più velocemente dei batteri lattici ma, nonostante ciò, i LAB possono comunque contribuire alla produzione di aromi, attraverso i processi di acidificazione. I prodotti ottenuti tramite impasto di Tipo 0 sono ad esempio le baguette, le ciabatte italiane e i cracker americani.

- **Tipo I**: La pasta madre di tipo I si ottiene mediante rinfreschi quotidiani, a temperature comprese tra i 20 e 30 °C, che portano allo sviluppo di un impasto con consistenza solida, avente un Dough Yield inferiore a 200. I tempi di fermentazione sono lunghi (6-24 ore) e permettono di ottenere un pH intorno a 4. Una volta completato il rinfresco, la pasta madre può essere utilizzata come starter naturale in cui si ritrovano un'ampia varietà di microrganismi. Le paste madri di tipo I vengono generalmente preparate e mantenute nelle panetterie artigianali e a livello domestico per produrre pane tradizionale. Inoltre, le pratiche delle panetterie artigianali spesso prevedono un controllo rigoroso ed efficiente delle condizioni di fermentazione (temperatura di conservazione e ambientale, durata del periodo di fermentazione tra i rinfreschi, e numero di rinfreschi) e quindi del microbiota di fermentazione, in modo che la maggioranza delle panetterie possieda paste madri caratterizzati dalla presenza di *F. sanfranciscensis* e *K. humilis* rispettivamente come specie di LAB e lieviti (Gänzle e Zheng 2019).

- **Tipo II**: I processi di produzione della pasta madre di tipo II prevedono una fermentazione prolungata della miscela farina-acqua, in un unico passaggio, che viene avviata mediante l'aggiunta di una coltura starter acido tollerante. In questo modo è possibile ottenere proprietà specifiche nei prodotti finali, come l'acidificazione e la formazione di sapore. La fermentazione avviene all'interno di bioreattori termostatati (30-37 °C) per un periodo che varia da 24 a 72 ore. Le condizioni di fermentazione, in termini di tempo e temperatura, favoriscono un'intensa attività acidificante da parte dell'inoculo, fino a raggiungere un pH inferiore a 4 e un rendimento dell'impasto elevato (il DY è superiore a 200 e, infatti, la pasta madre si presenta liquida). Quando necessario, una porzione di un impasto già maturo può essere aggiunta ad un impasto per acidificarlo e arricchirlo con gli aromi ed i sapori caratteristici di un prodotto da forno lievitato. L'inoculo ha la funzione di acidificare l'impasto, apportando componenti utili per l'acquisizione del sapore e dell'odore. Poiché il processo di produzione di questo tipo di pasta madre non favorisce lo sviluppo di lieviti endogeni, la lievitazione dell'impasto finale si ottiene mediante l'aggiunta di lievito di birra (Gänzle and Zheng 2019). Le paste madri di tipo II sono generalmente impiegate in ambito industriale e vengono commercializzate sotto forma di preparati semi-liquidi, trattati termicamente e spray-drying in grado di preservare la vitalità dei microrganismi. Le specie più frequentemente utilizzate per la produzione di paste madri di tipo II sono *Lactobacillus amylovorus*, *Levl. brevis*, *Liml. fermentum*, *Lacp. plantarum*, *Limosilactobacillus reuteri*, e *Furfurilactobacillus rossiae* (De Vuyst et al., 2021).

- **Tipo III**: La produzione di paste madri di tipo III segue un processo simile a quello delle paste madri di tipo II, ma include una fase di essiccazione mediante spray-drying o drum-drying (Decock & Cappelle, 2005). Anche in questo caso è richiesta l'aggiunta di lievito di birra per garantire la lievitazione degli impasti a causa dell'eccessiva acidità e disidratazione della pasta.

In Figura 6 sono schematizzati i processi di produzione e rinfresco delle paste madri di tipo 0, I, II e III.

Per quanto riguarda le colture starter utilizzate nei processi di produzione delle paste madri di tipo II e tipo III, è possibile fare una distinzione tra due tipologie principali: le **coltura starter definite** e la **coltura starter naturali**. L'impiego di colture starter definite prevede l'inoculo di colture pure di ceppi batterici accuratamente selezionati e combinati, in rapporti prestabiliti, con ceppi selezionati di lievito. Generalmente vengono commercializzati in forma liofilizzata o congelata.

Gli starter naturali invece sono consorzi microbici vivi e attivi sottoforma di impasti liquidi, semiliquidi o solidi, propagati attraverso la tecnica tradizione dei rinfreschi.

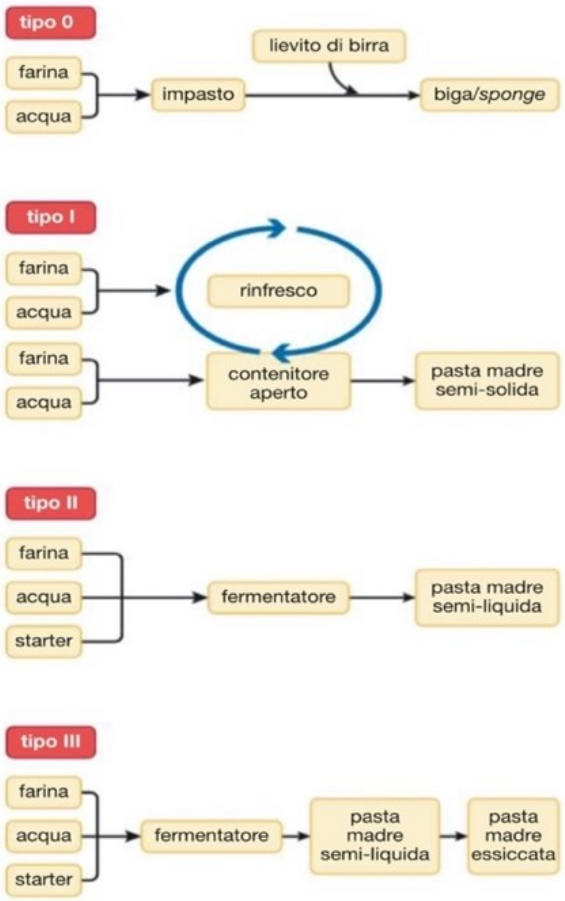

Figura 6. Processi di produzione della pasta madre (Gobbetti, 2023)

1.6 Utilizzo e storia della pasta madre in Val Camonica

Il notevole numero di prodotti fermentati con pasta madre presenti in Italia può essere attribuito alle profonde differenze geografiche, storiche e culturali che caratterizzano il territorio nazionale (Gobbetti & Rizzello, 2023). Inoltre, le caratteristiche artigianali di tali prodotti, l'impiego di ricette tradizionali e la produzione su scala ridotta ne favoriscono una disponibilità principalmente locale, piuttosto che globale.

Negli ultimi trent'anni si è assistito a una riscoperta, da parte dei produttori e dei consumatori europei, degli alimenti tipici e tradizionali dei propri paesi, accompagnata dalla valorizzazione delle proprietà nutrizionali, organolettiche, qualitative e culturali di tali prodotti. I lievitati, infatti, sono apprezzati non solo per i loro sapori, aromi distintivi e per la loro texture, ma anche per le caratteristiche

nutrizionali e una durata di conservazione più lunga rispetto ad altri tipi di pane proprio grazie all'utilizzo della pasta madre.

Un fattore determinante per la produzione di panificati in Europa e in Italia è la diversa diffusione dei cereali, che ha influenzato le tecniche di panificazione e quindi la varietà dei lievitati.

In Val Camonica (BS), infatti, l'impiego della pasta madre è strettamente associato all'utilizzo della farina di segale, un cereale in grado di adattarsi al territorio montano, al freddo e a terreni poveri (Fracasso et al., 2022). La segale è anche nota come "cereale minore" in relazione alla sua produzione mondiale: secondo i dati riportati da Statista (www.statista.com/statistics/263977/world-grain-production-by-type/) solo l'1% del raccolto mondiale di cereali è costituito da segale. Questa coltura è diffusa principalmente nelle regioni del Nord e Centro-Est Europa e nelle zone alpine, per la sua capacità di adattarsi ai climi freddi (Deleu et al., 2020).

Gli Archivi della Vicinia di Ponte di Legno riportano che già nel Medioevo la segale era coltivata in Val Camonica e che nel 1870, circa il 26% delle terre arate era destinato alla sua produzione. La segale, considerata un cereale rustico che tollera forti stress ambientali, veniva coltivata fino a 1000 – 1200 metri di altitudine su terreni dalle caratteristiche difficili, caratterizzati da pendenze elevate e scarsa fertilità del terreno. Nel 500 il ciclo di coltivazione prevedeva la semina in autunno e la raccolta ad agosto, e il cereale veniva impiegato principalmente per la panificazione e, in secondo luogo, per la produzione di mangimi. La molitura del cereale avveniva in opifici locali ed erano impiegati degli appositi mulini. Essi erano distinti in mulini «a rotha», ovvero a macina, e mulini «a piganzolo», dotati invece di un pestello che batte in un mortaio ricavato da una pietra cava (Figura 7) (Franzoni, 1992).

Figura 7. Mulino a piganzolo.

Il processo di panificazione si svolgeva in genere ogni due settimane, per garantire che il pane si conservasse, non si seccasse troppo o non ammuffisse. La preparazione avveniva la sera, quando si setacciava una piccola quantità di farina in un contenitore, la panèra, cui si aggiungevano acqua calda, sale e un pezzo di pasta madre. Il panetto di pasta madre veniva custodito da una famiglia che ne cedeva un pezzo a chi volesse fare il pane, in cambio di due panetti per il ciclo successivo.
Il primo impasto veniva fatto velocemente per evitare che si raffreddasse troppo, in seguito veniva coperto e conservato in stalla dove le temperature erano normalmente più alte durante la sera. Nel corso della notte il primo impasto aumentava notevolmente di volume e solo il mattino successivo si poteva procedere ad aggiungere altra farina e ad impastare nuovamente. Durante la lievitazione del secondo impasto si cominciava a preparare il forno. Una volta cotto, il pane veniva poi conservato in casa per circa due settimane in un apposito locale, l'*invòlt*: un ampio magazzino dai muri massicci a volta, sprofondato a metà nel suolo e impiegato per la conservazione degli alimenti (Tognali, 2010).
In alcune località, come nel comune di Berzo Demo (BS), si praticava una tradizione religiosa che aveva come protagonista il pane di segale: la "Benedisù del Toc" (benedizione del pezzo). Ogni famiglia, durante la celebrazione, portava un pezzo di pane di segale sul sagrato della chiesa, dove tutto il pane veniva raccolto e distribuito ai forestieri. Prima della distribuzione il pane raccolto veniva benedetto dalla statua della Madonna, la quale era successivamente portata in processione lungo le vie del paese (Franzoni, 1992).
Dagli anni 50 ai giorni nostri, la presenza sul territorio della Valle Camonica di coltivazioni di segale e in generale dei cereali, ha subito un drastico declino, con conseguente abbandono dei terreni prima coltivati. Tuttavia, negli ultimi anni molto panifici hanno iniziato a riscoprire l'utilizzo della farina di segale e varietà locali per valorizzare i prodotti del territorio e garantire dei prodotti autoctoni. Tra questi, uno dei più famosi è la spongada: un dolce di forma bassa e rotonda a base di miele, frutta secca, marzapane e canditi tipica della Val Camonica (Salvetti, 2013).
Al giorno d'oggi sono diverse le iniziative volte a garantire la valorizzazione dei prodotti locali, come ad esempio la "Festa de lo Pan Ner – I pani delle Alpi" (Figura 8): un noto evento transfrontaliero che nasce nel 2015 in Valle d'Aosta con l'intento di valorizzare il pane di segale e le tradizioni ad esso connesso. Questo evento negli ultimi anni si è diffuso in molte regioni d'Italia, in Francia e in Slovenia. Iniziative di questo tipo sono fondamentali per tutelare le piccole attività di montagna e promuovere le pratiche tradizionali della panificazione. Gli agricoltori e panificatori locali rivestono infatti un ruolo cruciale

Figura 8. Logo Festa del Pan Ner (https://lopanner.com/main/)

nella preservazione delle tradizioni e nella protezione dell'ambiente; sono attivamente coinvolti nella conservazione delle varietà cerealicole autoctone e ancestrali, e, dal punto di vista culturale e storico, i prodotti da forno tradizionali e i loro antichi protocolli di produzione, rappresentano un patrimonio di inestimabile valore che merita di essere preservato.

2. Scopo del lavoro

Il presente studio si propone di analizzare i microrganismi presenti in cinque campioni di pasta madre, prelevati da diversi panifici situati in Val Camonica. I panifici coinvolti nel progetto sono:

- Forneria Salvetti (Malonno);
- Forneria Mille (Edolo);
- Panificio Nomelli (Corteno Golgi);
- Forneria Cristini (Darfo B.T);
- Forneria Ferretti (Darfo B.T).

Le analisi sono state effettuate presso il Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente (DeFENS) dell'Università degli Studi di Milano, nel periodo compreso tra dicembre 2023 e aprile 2024. Lo studio ha offerto l'opportunità di applicare le conoscenze acquisite durante il corso di Microbiologia, consentendo così di condurre un'esperienza pratica di laboratorio.

L'obiettivo principale di questo lavoro di tesi è stato quello di identificare la presenza di lieviti e batteri lattici nei campioni di pasta madre, attraverso la stima della popolazione vitale di questi microrganismi. La quantificazione dei microrganismi vitali presenti nella pasta madre è un aspetto cruciale per la corretta gestione dell'agente lievitante, in quanto tale popolazione influisce direttamente sulla struttura, le caratteristiche sensoriali, nutritive e sulla conservabilità dei prodotti da forno. Pertanto, le informazioni ottenute dallo studio sono destinate a fornire un supporto significativo per il miglioramento dei processi di produzione e conservazione della pasta madre nei panifici coinvolti nel progetto.

In aggiunta, è stata condotta una valutazione della performance fermentativa del campione di pasta madre proveniente dalla Forneria Salvetti. La capacità di fermentazione, mediata dall'attività di lieviti e/o batteri lattici vitali, è fondamentale per garantire la corretta lievitazione e acidificazione dell'impasto, due processi essenziali per ottenere i caratteristici attributi qualitativi del prodotto finale. Pertanto, la determinazione della capacità fermentativa del campione rappresenta uno strumento utile per valutare la qualità del prodotto finito e per individuare eventuali margini di miglioramento.

Il progetto mira a riscoprire e valorizzare i prodotti tipici del territorio camuno, mettendo in luce la loro varietà e la tradizione dei lievitati che, da decenni, viene tramandata di generazione in generazione.

3. Materiali e metodi

3.1 Campioni

I campioni di pasta madre analizzati provengono da cinque panifici diversi della Val Camonica (Tabella 1).

Campione	**Provenienza campione**
Campione 1	Forneria Salvetti
Campione 2	Forneria Cristini
Campione 3	Panificio Nomelli
Campione 4	Forneria Mille
Campione 5	Forneria Ferretti

Tabella 1. Elenco dei campioni di pasta madre

Il primo campione di impasto acido è stato prelevato da *Forneria Salvetti*, situata a Malonno (BS) e gestita da Armando Salvetti. Questo panificio a conduzione familiare, fondato nel 1885, è profondamente legato alle tradizioni gastronomiche del territorio montano camuno. Per preservare e valorizzare l'uso di antichi cereali nella panificazione, nei laboratori Salvetti si utilizza farina di segale per la produzione della pasta madre. La segale, infatti, è una coltura diffusa principalmente nei paesi nordici e meno comune in Italia; tuttavia, dal 2019 la *Forneria Salvetti* ha avviato diverse collaborazioni sul territorio della Valle Camonica per garantire una filiera di segale di montagna.
Lo starter della pasta madre è stato realizzato dieci anni fa e viene quotidianamente rinfrescato alle 6:00 del mattino con un'idratazione pari al 45% rispetto alla farina. Per i rinfreschi viene utilizzata la farina di tipo 1, mentre l'impasto acido è conservato in acqua a una temperatura compresa tra 18 e 20°C. La *Forneria Salvetti* è specializzata nella produzione di pane, panettoni e vari prodotti da forno, tra cui biscotti, grissini e torte. Particolarmente rilevante per il legame con il territorio è la *Spongada*, una focaccia soffice ricoperta di zucchero, tipica della tradizione camuna (Figura 9).
Il secondo campione analizzato proviene dalla *Forneria Cristini* di Darfo Boario Terme (BS), un panificio dalle origini storiche, fondato da Riccardo Cristini e Clara Sillini. Dal 1986 è gestito dalla famiglia Ghiroldi, che ogni giorno sforna pane fresco, spongade e dolci da forno. Nel 2020 il panificio ha ricevuto il premio per il miglior panettone camuno. Pur mantenendo un forte legame con la tradizione, la *Forneria Cristin*i si distingue anche per l'uso di farine speciali, tra cui quella di riso venere e quella alla spirulina. Altro punto forte del panificio è la produzione di pane nero. Quest'ultimo viene realizzato con farina integrale, ottenuta da frumento coltivato a Piamborno (BS)

e macinato a pietra. La macinazione a pietra permette di preservare le fibre, sali minerali, proteine ed enzimi del cereale, rendendo il pane più nutriente e facilmente digeribile.

Figura 9. Spongada camuna

La pasta madre impiegata dal panificio ha origini piemontesi: lo starter utilizzato proviene dal laboratorio del celebre pasticcere torinese *Mauro Morandin*, vincitore del Premio Gambero Rosso per il miglior panettone nel 2011 e 2017. Dal 2003, il lievito viene rinfrescato quotidianamente alle 7:00 del mattino, con un'idratazione pari al 50% rispetto alla farina (rapporto 1:2). Per i rinfreschi si utilizza farina 00, mentre l'impasto viene conservato a temperatura ambiente.

Il terzo campione di pasta madre proviene dal *Panificio Nomelli,* situato nel comune di Corteno Golgi (BS). Si tratta di una forneria a conduzione familiare che dal 1987 sforna e distribuisce prodotti dolci e salati in tre diversi punti vendita. La famiglia Nomelli si impegna a preservare e a tramandare di generazione in generazione le tecniche tradizionali della panificazione locale, utilizzando materie prime selezionate e di origine territoriale. Oltre i prodotti tipici da forno come pane, biscotti e torte, il panificio è noto per la produzione di specialità tipiche locali, tra cui la *Bisciola*. Questo dolce, tradizionalmente associato alla Valtellina, è una pagnotta arricchita con frutta secca, burro, uova e, in alcune varianti, miele. Il *Panificio Nomelli* propone anche una versione arricchita con cioccolato. Spesso definita il "Panettone Valtellinese" per la sua somiglianza con il dolce natalizio lombardo, la *Bisciola* è tutelata dal Marchio Collettivo Geografico (MCG) dal 2013. Il panificio è specializzato anche nella produzione di panettoni artigianali, realizzati in diverse varianti, tra cui pistacchio, pera e cioccolato, mela, brandy e frutti di bosco. Tutti questi prodotti sono ottenuti mediante l'impiego di pasta madre, il cui starter è stato realizzato dieci anni fa. Da allora, il lievito viene rinfrescato ogni 2

ore e 30 minuti con farina di tipo 0. Il processo di rinfresco prevede l'utilizzo di 100 g di lievito, 100 g di farina e una quantità d'acqua pari al 38% della farina.

Il quarto campione di pasta madre è stato prelevato dalla *Forneria Mille*, situata nel comune di Edolo (BS). Fondata nel 1946, l'attività è attualmente gestita da Michele Mille, il quale ha specializzato il panificio nella lavorazione della pasta madre e nell'uso delle farine speciali. La forneria mantiene un forte legame con la tradizione, producendo la *Spongada* e utilizzando materie prime del territorio camuno. Tra queste, si distingue la farina di frumento di tipo Ardito, coltivata nel comune di Ceto (BS). Questa varietà di frumento è caratterizzata da una forza ridotta, risultando particolarmente adatta alla produzione di pani e dolci.
La produzione della *Forneria Mille* è basata sull'utilizzo della pasta madre, di cui il panettiere Michele Mille possiede diverse tipologie. Per la realizzazione di pane e dolci destinata alla vendita quotidiana, utilizza una pasta madre di un anno, rinfrescata ogni mattina con 500 g di pasta madre, 500 g di farina e un'idratazione al 50%. Per i prodotti tipici, invece, viene impiegato uno starter a base di farina di segale, conservato e rinfrescato giornalmente da otto anni.

Il quinto campione proviene dalla *Forneria Ferretti,* situata a Darfo Boario Terme (BS). Fondata nel 1976, l'attività ha ampliato la propria offerta nel 1996, specializzandosi anche nel settore della pasticceria. I due prodotti di punta del panificio sono la *Spongada* e il panettone artigianale, sebbene la forneria sia apprezzata anche per la produzione di pani meno tradizionali, come il *pane pugliese* realizzato con semola di grano duro. La pasta madre utilizzata presso la Forneria Ferretti è stata creata nel 2000 e, da allora, viene mantenuta attiva con rinfreschi effettuati ogni due giorni. Il processo prevede l'uso di farina di tipo 0, con un'idratazione pari al 50% rispetto al peso della farina.

I cinque campioni sono stati prelevati in due tempi diversi per poter condurre le analisi. I primi due, provenienti dalla Forneria Salvetti e dalla Forneria Cristini, sono stati prelevati in data 18 gennaio 2024. Gli altri tre campioni, provenienti dal Panificio Nomelli, dalla Forneria Mille e dalla Forneria Ferretti, sono stati prelevati il giorno 25 gennaio 2024.
Per il prelievo sono stati utilizzati dei guanti in modo da evitare qualsiasi tipo di contaminazione e successivamente i campioni sono stati inseriti in appositi sacchetti sterili (Figura 10).
Oltre ai campioni di pasta madre, presso ogni panificio sono stati prelevati anche 500 g di farina utilizzata per i rinfreschi per condurre le prove di fermentazione.

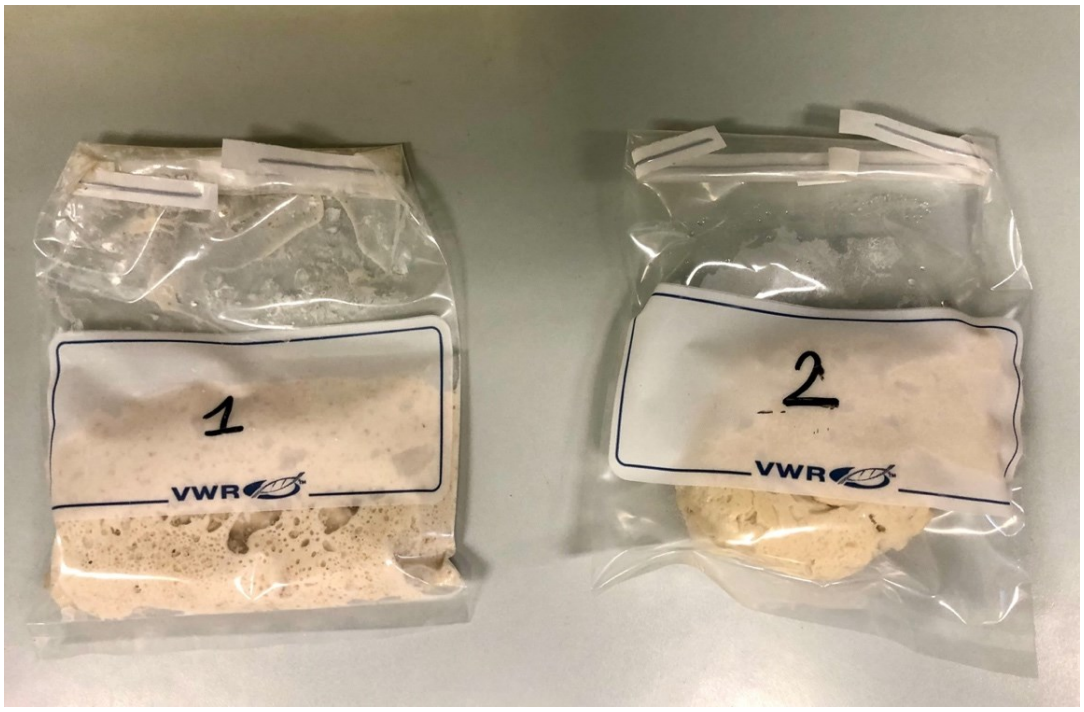

Figura 10. Campioni di pasta madre

3.2 Terreni colturali e diluenti per lieviti e batteri lattici

Per condurre le analisi microbiologiche sono stati preparati, in fase preliminare, i terreni colturali e i diluenti per le diluizioni decimali.
I batteri lattici, così come i lieviti, richiedono l'uso di terreni di coltura complessi e spesso ricchi di nutrienti. Per questo motivo, come terreni di crescita sono stati scelti l'YGC (Yeast Glucose Chloramphenicol – Liofilchem S.r.l., Roseto d. Abruzzi (TE)) e l'SFM (San Francisco Medium).

Il terreno YGC è utilizzato comunemente per la crescita e la conta dei lieviti in piastra nelle analisi dei prodotti alimentari.
La presenza di cloramfenicolo (*Chloramphenicol)*, un antibiotico ad ampio spettro, è fondamentale per inibire la crescita di potenziali batteri contaminanti. L'estratto di lievito fornisce i nutrienti essenziali e le vitamine mentre l'agar rappresenta l'agente solidificante.

Il terreno SFM (*San Francisco Medium*) consente il recupero di batteri lattici da pasta madre. La sua composizione è riportata in Tabella 2 e il pH del terreno, per garantire la crescita dei batteri lattici, è stato portato a 5,4.

Componente	Quantità (g/L)
Triptone	10,00
Estratto di carne	2,00
Estratto di lievito	7,00
Glucosio	7,00
Fruttosio	7,00
Maltosio	7,00
Gluconato di sodio	2,00
Acetato di sodio	5,00
Acido citrico	5,00
$KH_2PO_4 \cdot 3 H_2O$	2,50
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,20
$MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	0,05
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,01
Cisteina HCl	0,50
Tween80	1,00
Agar	15,00
Estratto di lievito fresco	150,00 ml
Acqua distillata	850,00 ml

Tabella 2. Composizione del terreno colturale SFM

Entrambi i terreni sono stati sterilizzati in autoclave a 112°C per 30 min.

Per quanto riguarda le diluizioni decimali (necessarie per la preparazione dei campioni di pasta madre) è stata utilizzata come soluzione tampone l'acqua peptonata. Si tratta infatti di un diluente utilizzato per diverse matrici alimentari la cui composizione è riportata in Tabella 3. Il suo pH è stato portato a un valore di 6,5.

Componente	Quantità
Peptone	10 g
Acqua distillata	1000 ml

Tabella 3. Composizione acqua peptonata

Per il mantenimento in coltura liquida dei lieviti è stato utilizzato il brodo nutritivo YEPD (*Yeast-Extract-Peptone-Dextrose Broth*) il cui pH è stato portato a 5,5. La composizione del brodo è riportata in Tabella 4. Tutte le soluzioni sono state sterilizzate in autoclave a 112 °C per 30 min.

Componente	Quantità (g/L)
Estratto di lievito	10,0
Peptone	20,0
Glucosio	20,0
Acqua distillata	1000 ml

Tabella 4. Composizione terreno colturale YEPD

3.3 Conta microbica

Una volta preparati i terreni e le soluzioni tampone, è possibile procedere con l'isolamento dei microrganismi dai campioni in analisi. A questo scopo, viene utilizzata la tecnica di semina per distribuzione superficiale dell'inoculo su substrato solido (tecnica *Spread Plate*).

Prima della semina su piastra è necessario preparare i campioni di pasta madre. Questi ultimi sono stati pesati in sterilità, misurando una quantità tra gli 8 g e i 10 g di pasta madre. Ai campioni è stata poi aggiunta una quantità di acqua peptonata pari alla quantità di pasta madre pesata precedentemente moltiplicato per 9. Si ottiene così la prima diluizione decimale (Figura 11).

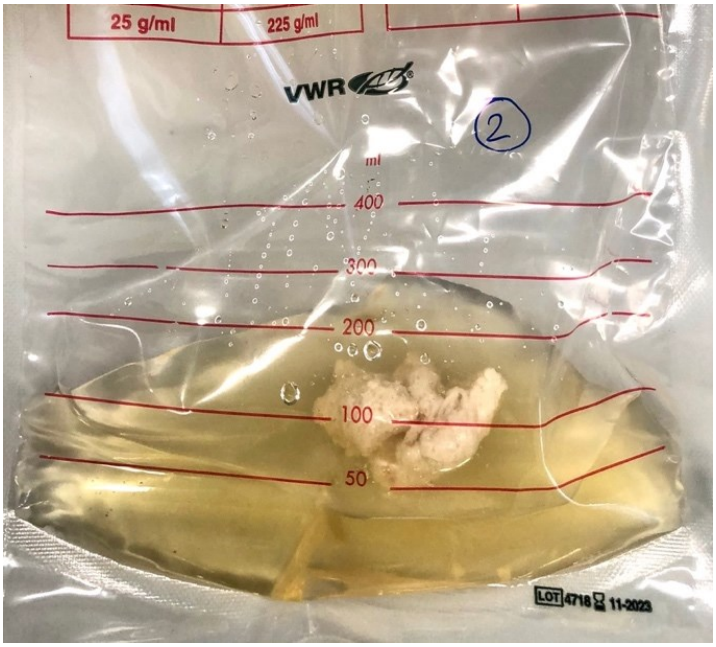

Figura 11. Prima diluizione pasta madre

Segue poi l'omogenizzazione del campione. Tale processo deve avvenire in modo tale da evitare il danneggiamento delle cellule microbiche. Per fare ciò è stato quindi utilizzato lo Stomacher (Generon, Modena), un omogeneizzatore peristaltico a pale che "massaggia" il campione, favorendo

la liberazione dei microrganismi dall'alimento al diluente. Il tempo di omogeneizzazione è di circa due minuti, e permette di ottenere così una soluzione uniforme (Figura 12).

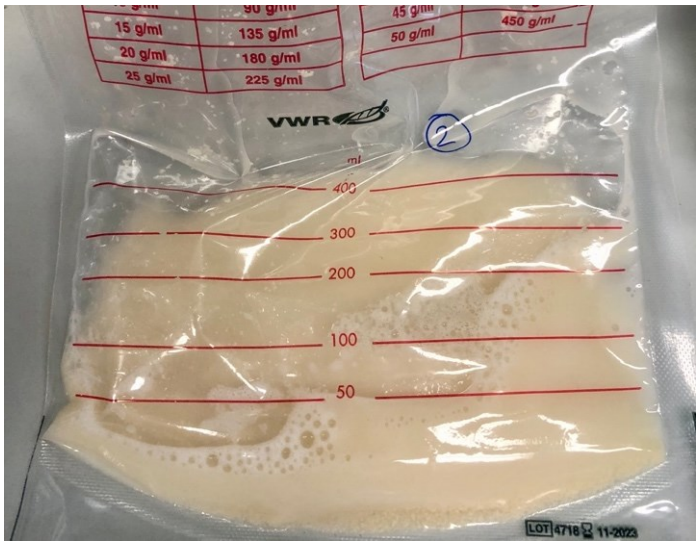

Figura 12. Campione dopo Stomacher

Si procede con la preparazione delle diluizioni decimali seriali. Questo è un passaggio fondamentale per l'analisi microbiologica quantitativa in quanto il numero di microrganismi presenti in un dato campione alimentare è così alto da non poter essere contato se non dopo essere stato sottoposto a diluizioni seriali. Con una pipetta sterile si preleva 1 ml dalla soluzione di pasta madre e acqua peptonata appena omogenizzata, e si trasferisce in una provetta contenente 9 ml di acqua peptonata. Il contenuto della provetta viene poi omogenizzato mediante un vortex.
Tali operazioni dovranno essere ripetute per ottenere le diluizioni decimali successive.

Una volta preparate le diluizioni decimali seriali del campione, è necessario trasferirle nello specifico terreno di crescita tramite la tecnica di spatolamento. Questa tecnica segue il metodo Spread Plate, per cui le piastre contenenti il terreno solidificato devono essere preparate prima dell'operazione di inoculo. Al momento della semina, viene depositato 0,1 ml della appropriata diluizione con una pipetta sulla superficie agarizzata del terreno e distribuita su di essa con una spatola sterile. Per le piastre dei campioni in esame, sono state utilizzate diluizioni di fattore diverso in base al microrganismo ricercato (Tabella 5), e ogni analisi è stata svolta in doppio.

Terreno di coltura	Microrganismo	Diluizione decimale seminata in piastra		
YGC	Lieviti	-5	-6	-7
SFM Agar	Batteri lattici	-6	-7	-8

Tabella 5. Fattore di diluizione dei terreni

Per garantire lo sviluppo dei microrganismi, le piastre YGC sono state poi incubate a 25 °C mentre le piastre SFM Agar sono state poste in anaerobiosi a 30°C.

Trascorse 48 ore dalla fase di isolamento, si procede con la conta vitale. Le cellule vive di lieviti e batteri lattici, presenti all'interno dei campioni, si moltiplicheranno dando origine a colonie visibili sul terreno nutritivo (Figura 13).

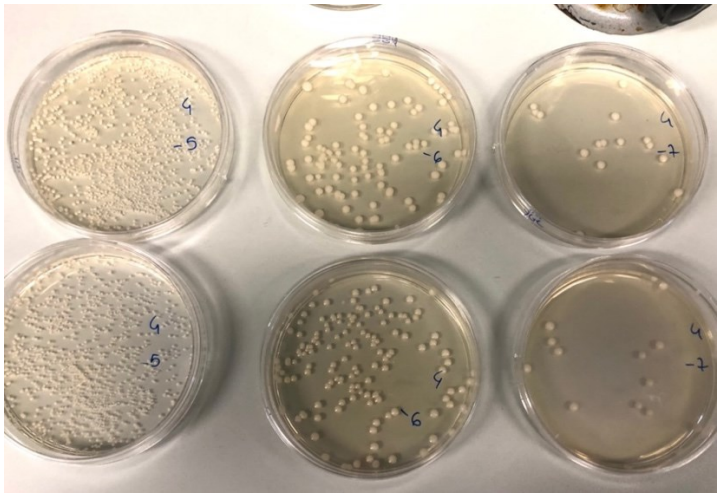

Figura 13. Microrganismi su terreno nutritivo

È quindi possibile contare ad occhio nudo le cellule di lieviti e batteri lattici. In microbiologia si esprime il valore delle conte in Unità Formanti Colonia (UFC) per grammo di campione, che può essere determinato attraverso la seguente formula:

$$\frac{\Sigma\, colonie}{[(n_1 \cdot 1) + (n_2 \cdot 0{,}1)] \cdot d} = \frac{UFC}{g}$$

dove:

- n_1 numero di piastre della prima diluizione considerata;
- n_2 numero di piastre della seconda diluizione considerata;
- $\Sigma\, colonie$ somma delle colonie nelle piastre considerate (10< colonie <300);
- d fattore di diluizione della prima diluizione considerata.

3.4 Determinazione del pH

Dopo il prelievo per le analisi microbiologiche, il campione di impasto acido diluito con acqua peptonata è stato sottoposto a misurazione del pH tramite pH-metro (Mettler-Toledo).

3.5 Conservazione degli isolati microbici

Dalle piastre su cui si sono moltiplicati i microrganismi si procede con il trasferimento in brodocoltura dei lieviti e dei batteri lattici. L'inoculo si effettua prelevando con un'ansa sterile una colonia isolata e stemperandola in provette sterili contenti il terreno liquido. Per la coltura dei lieviti è stato utilizzato il terreno YEPD mentre per i batteri lattici il terreno MRS. Infine, le brodocolture sono state incubate per 24 - 48 ore a 25 °C per i lieviti e a 30 °C per i batteri lattici.

La conservazione dei lieviti e dei batteri lattici è avvenuta mediante la tecnica della crioconservazione in presenza di glicerolo. Il glicerolo viene comunemente utilizzato per la conservazione in quanto crioprottettivo, permettendo di preservare a lungo termine le strutture cellulari e le funzioni biologiche dei microrganismi alle temperature di congelamento.
Le brodocolture di lieviti sono state inizialmente risospese utilizzando un Vortex per miscelare il sedimento sul fondo. Successivamente in ciascuna provetta è stata aggiunta una quantità di glicerolo pari al 20% del terreno liquido. A seguito dell'aggiunta di glicerolo, le provette sono state nuovamente omogenizzate mediante l'agitatore automatico. Per concludere è stata distribuita 1,2 ml di tale sospensione in microprovette Eppendorf e poi congelata a –80 °C.
Per la conservazione dei batteri lattici invece si è prima proceduto alla centrifugazione dei campioni in brodocoltura per 15 minuti e successivamente è stato poi rimosso il surnatante e addizionato l'MRS con il 20% di glicerolo rispetto al terreno liquido. Dopo la miscelazione al Vortex la sospensione è stata distribuita in microprovette Eppendorf (1,2 ml di soluzione) e posta a -80°C.

3.6 Upstream e downstream dei ceppi di lievito isolati

Per ottenere la biomassa per la analisi microbiologiche si allestiscono operazioni di Upstream e Downstream dei ceppi di lievito isolati.
L'Upstream consente infatti di far crescere i lieviti nelle migliori condizioni colturali possibili, mentre la fase di Downstream si effettua la separazione e la purificazione del prodotto finale d'interesse.
Per la fase di Upstream si procede innanzitutto con il rinfresco del campione di lievito: dalla Eppendorf contenente il campione di lievito glicerolato, una volta scongelato, si prelevano 0,5 ml di

soluzione e si inoculano in una provetta Falcon da 10 ml contenente 5 ml di terreno YEPD (percentuale di inoculo: 10% v/v). Dopo 24 h di incubazione a 25°C la coltura ottenuta viene impiegata per allestire il pre-inoculo delle colture in beuta.
Si prelevano quindi 25 ml di YEPD e, insieme a 2,5 ml di campione rinfrescato il giorno precedente, si inoculano in una provetta Falcon da 50 ml. Il tappo della provetta non viene chiuso totalmente per favorire lo sfiato di CO_2 eventualmente prodotta dal lievito; la coltura liquida viene messa a incubare a 25 °C per 24 h. Passate le 24 ore per favorire la crescita dei microrganismi, la coltura ottenuta viene utilizzata come inoculo di beute da 500 ml contenenti 100 ml di terreno liquido MEB (Malt Extract Broth), la cui composizione è riportata nella tabella sottostante (Tabella 6).

Componenti	Quantità (g/l)
Estratto di malto	20,0
Peptone di soia	1,0
Acqua distillata	1 L
Glucosio	20,0

Tabella 6. Composizione terreno liquido MEB

Dalla provetta Falcon si prelevano quindi 10 ml di coltura e si inoculano nella beuta contenete il terreno colturale liquido (percentuale di inoculo: 10% v/v). Per ogni ceppo sono state allestite due beute. Tutte le operazioni vengono eseguite in condizioni di sterilità. Le beute così inoculate sono state incubate in cella termostata a 25 °C per 24 h in condizioni di agitazione (Figura 14).
Si procede poi con la fase di Downstream. Dopo 24 ore nelle beute è possibile notare una maggior torbidità della sospensione, segno che i lieviti sono cresciuti. Le colture così ottenute da due beute sono state riunite in un'unica beuta. Per determinare la concentrazione cellulare sono state successivamente condotte diluizioni decimali in serie con acqua peptonata fino alla diluizione 10^{-9}. La coltura così diluita dalle diluizioni 10^{-5} a 10^{-9} è stata seminata per inclusione impiegando il terreno colturale YGC. Le colture sono poste a incubare a 25 °C per 24 – 72 ore, per determinare la conta vitale raggiunta a fine incubazione e per poterla poi confrontare con la conta totale dei microrganismi.

Figura 14. Incubazione delle colture liquide in agitazione

La determinazione della conta totale avviene tramite l'impiego del microscopio ottico (Zeiss, ingrandimento 400x) e della camera di Burker. Tale tecnica consente di stimare numericamente la popolazione totale di lieviti in un campione, indipendentemente dalla loro vitalità.
Dalla provetta con fattore di diluizione di $10^{-2,}$ utilizzata per la preparazione delle diluizioni decimali in serie (Downstream), si preleva 1 ml di sospensione e si introduce per capillarità nel reticolo della camera di Burker. Si procede poi alla conta delle cellule presenti in 10 campi diversi, scegliendo il riquadro più appropriato (A, B o C). Si calcola poi la popolazione totale di lieviti (cell/ml) utilizzando l'opportuna formula riportata in Tabella 7.

Riq. A	n° cellule (valore medio) x	4000* x 1000** x	diluizione campione
Riq. B	n° cellule (valore medio) x	1000* x 1000** x	diluizione campione
Riq. C	n° cellule (valore medio) x	250* x 1000** x	diluizione campione

Tabella 7. Calcolo conta totale camera di Burker

* fattore in funzione del volume del reticolo in cui è stata effettuata la conta (A, B o C).

** fattore per il passaggio da mm^3 (in relazione alle dimensioni dei singoli riquadri) a cm^3.

Le formule fanno riferimento alla camera di conta riportata in Figura 15.

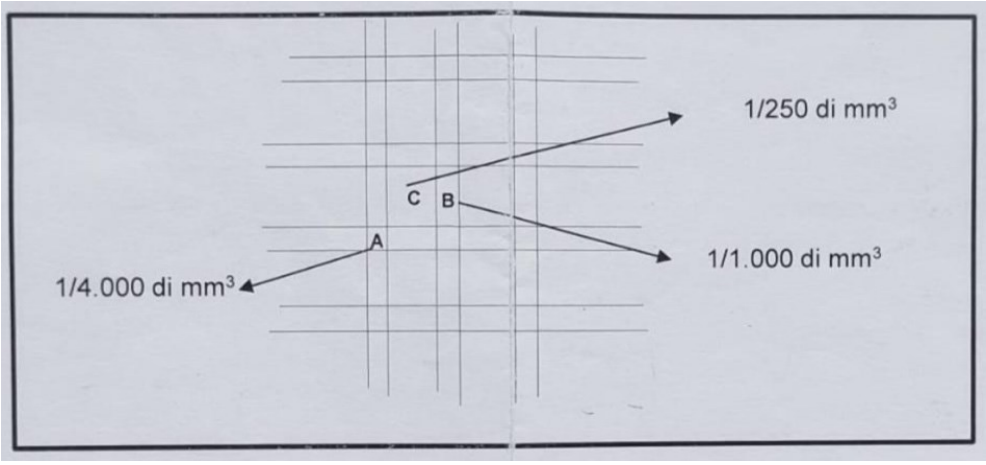

Figura 15. Camera di conta di Burker

3.7 Determinazione del peso secco

La determinazione del peso secco cellulare permette di definire il quantitativo di cellule in una coltura in termini di resa di fermentazione (g/L), attraverso pesata della biomassa ottenuta da un volume noto di coltura tramite essicamento in stufa.

Dalla beuta contenente la coltura liquida si prelevano 50 ml e si depositano in una provetta per centrifuga. Le provette devono essere bilanciate per evitare che all'interno della centrifuga si verifichino sbilanciamenti (Figura 16).

Figura 16. Bilanciamento provette per centrifuga

Viene poi avviata la centrifuga che è impostata a 7500 giri per 7 minuti. Al termine, viene rimosso il surnatante e il residuo di cellule viene lavato con acqua distillata per eliminare eventuali residui di terreno colturale. Si effettua poi una seconda centrifuga, sempre impostata a 7500 giri per 7 minuti (Figura 17).

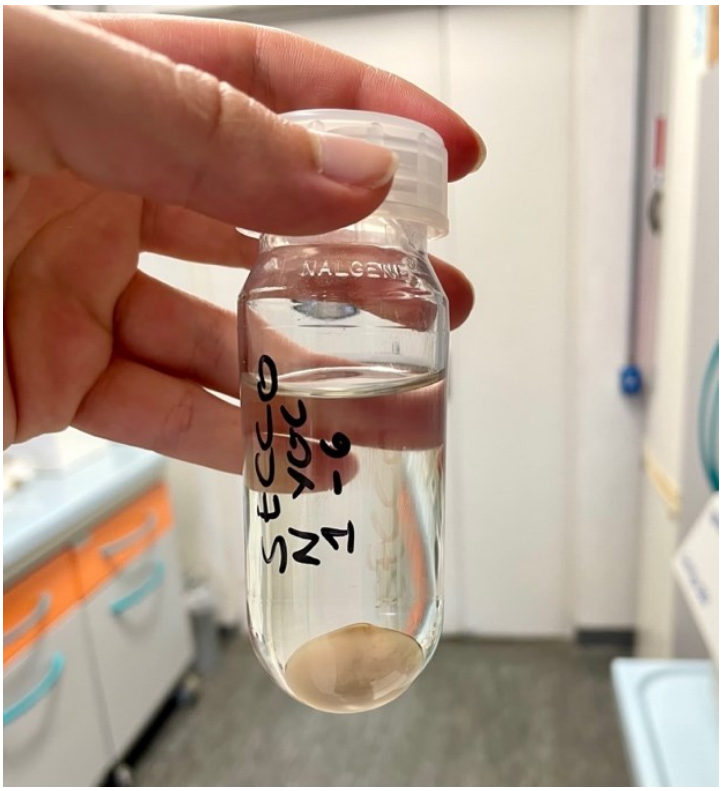

Figura 17. Fondello di cellule dopo centrifuga

Il fondello di cellule così ottenuto viene posto all'interno di un piattello di alluminio precedentemente tarato. I piattelli vengono lasciati essiccare in stufa a 110 °C per 24 ore e successivamente verranno nuovamente pesati.

La determinazione del peso secco avviene attraverso la seguente formula:

$$Peso\ piattello(dopo\ essicazione) - Tara\ piattello = Peso\ secco'(\ 50\ ml\ di\ brodocoltura)$$

$$Peso\ secco'\ (g) : 50\ mL = X\ (g) : 1000\ mL$$

$$X = Peso\ secco\ \left(\frac{g\ ss}{L}\right)$$

Per la determinazione della biomassa si procede invece con il seguente calcolo:

$$Peso\ piattello\ (dopo\ essiccazione) - Tara\ piattello\ = Peso\ biomassa$$

$$\frac{Peso\ biomassa}{0{,}5\ g} \times 100\ = \%\ lievito\ \text{secco}\ (cellule)$$

3.8 Determinazione del potere fermentativo

Il potere fermentativo rappresenta la capacità delle cellule di lievito di produrre anidride carbonica attraverso la fermentazione alcolica. Nel presente lavoro sono state impiegate due diverse procedure di determinazione: il metodo Hayduk e il metodo Burrows Harrison.

3.8.1 Metodo Hayduck

Nella procedura Hayduck un campione di lievito compresso pari a 0,476 g è sospeso in 35 ml di una soluzione di saccarosio al 20% (p/v), precedentemente termostata a 30°C. La sospensione viene posta in un apposito reattore incamiciato collegato a una buretta graduata (Figura 18), monitorando lo spostamento del menisco di una soluzione satura di NaCl per effetto del gas sviluppato all'interno del bioreattore.
I risultati sono espressi come CO_2 sviluppata, riferita a 10 g di lievito compresso.
La produzione di anidride carbonica con procedura Hayduk deve raggiungere un valore minimo di 250 ml di CO_2, sviluppati a 60 minuti di reazione.

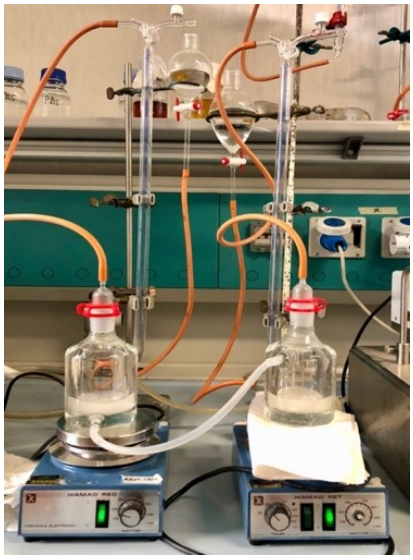

Figura 18. Reattore incamiciato

La produzione di anidride carbonica provoca una variazione del volume della soluzione di NaCl all'interno della buretta graduata, permettendo così di leggere i valori di CO_2 prodotti dalla fermentazione.
Il volume di CO_2 prodotto a 60 min di reazione a partire dalla sostanza secca contenuta in 0,476 g di lievito compresso, calcolato dopo l'essicazione in stufa, è riferito a 3 g di sostanza secca.

l volume minimo di CO_2 prodotto è possibile calcolarlo con la seguente formula:

$$V_{60'\,(mL)}:\ ss\,(g)\ =\ X_{\,(mL)}:\ 3\,g$$

$$X\ \geq\ 250\,mL\,CO_2$$

3.8.2 Metodo Burrow-Harrison

Con questa procedura si determina la CO_2 prodotta in un impasto modello preparato a partire da un campione di lievito compresso pari a 160 mg di sostanza secca, mescolato con 15 ml di acqua distillata e 20 g di farina. L'impasto ottenuto, dopo mescolamento per 45 secondi, è posto nel reattore incamiciato a 29 °C (Figura 19).

Figura 19. Reattore incamiciato

Lo sviluppo di anidride carbonica (ml) è valutato fino a 150 minuti di reazione.
I risultati sono espressi in termini di sviluppo di CO_2 riferito a 1 g di lievito compresso e il valore minimo è fissato a 110 ml di anidride carbonica sviluppati a 120 minuti di reazione.
Per determinare la quantità di lievito compresso da inserire nel reattore, la biomassa secca contenuta in 0,5 g (ottenuta dopo essicazione in stufa) è stata messa in equazione con 0,16 g di sostanza secca:

$$Biomassa\ \text{secca}_{(g)}:\ 0{,}5\ g\ =\ 0{,}16\ g : X_{(g)}$$

Per poter determinare il potere fermentativo, la produzione di CO_2 sviluppata a 120 min di reazione è stata messa in relazione con il peso secco del campione analizzato in riferimento a 0,3 g di sostanza secca (contenuto in 1 g di lievito compresso):

$$V_{120'\,(mL)} : ss_{(g)} =\ X :\ 0{,}3\ g$$

$$X\ \geq\ 110\ ml\ CO_2$$

4. Risultati e discussione

I risultati delle analisi sono stati suddivisi in tre categorie:

- analisi chimiche;
- microbiologiche;
- prove di fermentazione.

Per tutti e cinque i campioni di impasto acido è stata eseguita l'analisi del pH e la conta vitale in piastra. Il campione proveniente dalla forneria Salvetti di Malonno è stato inoltre sottoposto anche alla conta totale delle cellule di lievito, alla determinazione del peso secco e alle prove di fermentazione. Ogni campione è stato identificato come riportato in Tabella 8.

Provenienza campione	**Identificativo**
Forneria Salvetti	C1
Forneria Cristini	C2
Panificio Nomelli	C3
Forneria Mille	C4
Forneria Ferretti	C5

Tabella 8. Identificazione dei campioni di pasta madre

4.1 Analisi chimiche

All'arrivo in laboratorio, tutti i campioni di pasta madre sono stati sottoposti alla misurazione del pH. I valori ottenuti sono riportati in Tabella 9.

Campione	**pH**
C 1	3,92
C 2	3,40
C 3	5,20
C 4	5,56
C 5	4,90

Tabella 9. pH dei campioni di pasta madre

Si evidenzia una significativa variabilità nei valori di pH tra i diversi campioni. L'acidità della pasta madre è influenzata da molteplici fattori, tra cui le condizioni di processo e la composizione microbica dell'impasto.

Da letteratura, il pH di un impasto acido maturo a base di farina di grano tende ad essere compreso in un range tra 3,5 e 4,3 (Collar et al., 1994). I campioni C1 e C2 presentano valori di pH compresi entro questo intervallo precedentemente indicato, mentre i campioni C3, C4 e C5 mostrano valori più elevati.

Questa differenza può essere attribuita a diversi fattori, tra cui la frequenza dei rinfreschi, che incide direttamente sul pH, sulla vitalità e sulla concentrazione microbica della pasta madre. In particolare, i campioni analizzati sono stati soggetti a rinfresco diverse ore prima delle analisi. Si può quindi affermare che le paste madri sono mature.

Un ulteriore elemento determinante nell'acidità dell'impasto è la tipologia di farina impiegata. Ad esempio, nel caso della panificazione con farina di segale un pH basso è essenziale per il controllo dell'attività enzimatica della farina e per garantire l'elasticità della mollica.

Il campione C1, ottenuto da uno starter a base di farina di segale, mostra un valore di pH inferiore rispetto agli altri campioni, confermando l'influenza della composizione della farina sulle proprietà acidificanti della pasta madre.

4.2 Analisi microbiologiche

4.2.1 Conta vitale

La popolazione microbica della pasta madre influenza le caratteristiche qualitative e sensoriali dei prodotti lievitati da forno. In particolar modo, i batteri lattici sono ritenuti i principali responsabili del processo di acidificazione della pasta madre, mentre i lieviti hanno ruolo fondamentale nell'attività di fermentazione.

Per questo motivo, la conoscenza della composizione microbica della pasta madre in termini quantitativi è di importanza fondamentale per garantire una corretta gestione del processo di lievitazione. La lettura delle piastre di Petri ha permesso di determinare la conta vitale dei lieviti e dei batteri lattici all'interno dei campioni di pasta madre. I risultati sono espressi nell'unità di misura UFC/g (Tabella 10).

Campione	Lieviti (UFC/g)	Batteri lattici (UFC/g)
C1	$1,90 \times 10^7$	$4,95 \times 10^8$
C2	$1,72 \times 10^7$	$8,35 \times 10^8$
C3	$3,32 \times 10^7$	$1,44 \times 10^9$
C4	$1,20 \times 10^8$	$1,09 \times 10^9$
C5	$4,10 \times 10^6$	$1,67 \times 10^9$

Tabella 10. Risultati ottenuti dalla conta vitale

I primi tre campioni in Tabella 10 (C1, C2 e C3) presentano una popolazione di lieviti pari a circa $1 - 3 \text{ x } 10^7$ UFC/g. Il campione C4, invece, presenta una popolazione di lieviti leggermente superiore, pari a $1{,}2 \text{ x } 10^8$ UFC/g mentre, il campione C5, ha una concentrazione di lieviti inferiore ($4{,}1 \text{ x } 10^6$ UFC/g) rispetto a C1, C2 e C3.
Osservando i dati in Tabella 10, emerge inoltre che i batteri lattici risultano più numerosi dei lieviti con una popolazione variabile di un fattore $10^8 - 10^9$ UFC/g per tutti e cinque i campioni.
Sia i lieviti che i batteri lattici mostrano valori perfettamente in linea per questo tipo di impasto: in una pasta madre matura, i lieviti e i batteri lattici sono presenti, rispettivamente, in concentrazione cellulare variabile di circa $10^5 - 10^7$ UFC/g e $10^7 - 10^9$ UFC/g, con un rapporto, in genere, pari a 1:100 (*Gobbetti et al., 2001*).
In conclusione, i campioni di pasta madre analizzati presentano una buona popolazione di lieviti e batteri lattici in termini quantitativi.

4.2.2 Sviluppo in coltura liquida

Uno dei ceppi di lievito isolato a partire dal campione C1 è stato fatto crescere in coltura liquida per ottenere un quantitativo di biomassa sufficiente ad allestire una serie di prove di fermentazione.
La coltura liquida ottenuta dopo 24 h di incubazione a 25°C in condizioni di agitazione è stata sottoposta a determinazione della concentrazione cellulare sia tramite la tecnica della conta vitale in piastra (UFC/mL) sia della conta totale al microscopio ottico in camera di Burker (cell/mL).
Quest'ultima ha permesso di stimare numericamente la popolazione totale dei lieviti del campione, indipendentemente dalla loro vitalità.
La conta è avvenuta al microscopio ottico (Zeiss, ingrandimento 400x) e sono stati considerate solo le cellule presenti nei riquadri B (Figura 20). La procedura per la determinazione della conta è descritta dettagliatamente nel capitolo dei Materiali e metodi (pag. 40).

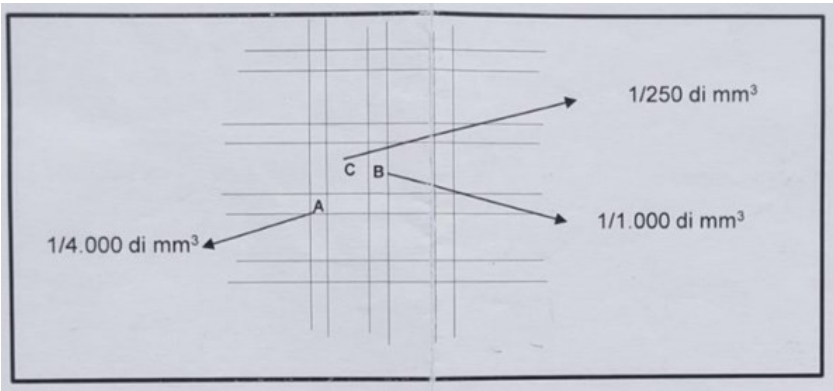

Figura 20. Camera di conta di Burker

Sono state quindi contate le cellule di lievito presenti in dieci riquadri B differenti ed è stato determinato il valore medio del numero delle cellule:

$$Valore\ medio\ delle\ cellule: \frac{(26 + 29 + 38 + 43 + 35 + 39 + 34 + 28 + 37 + 34)}{10} = 34{,}3$$

È stata poi applicata la formula per il calcolo della conta totale in riferimento al riquadro B:

$$Conta\ totale: n°\ cellule\ (valore\ medio)\ x\ 1000\ x\ 1000\ x\ diluizione\ campione$$

Dove:

- $n°\ cellule\ (valore\ medio)$ = 34,3
- $diluizione\ campione$ = 10^2

In Tabella 11 sono riportati i dati relativi alla conta in piastra e alla conta totale a scopo comparativo, mentre in Figura 21 è riportata una fotografia del campo di conta al microscopio ottico.

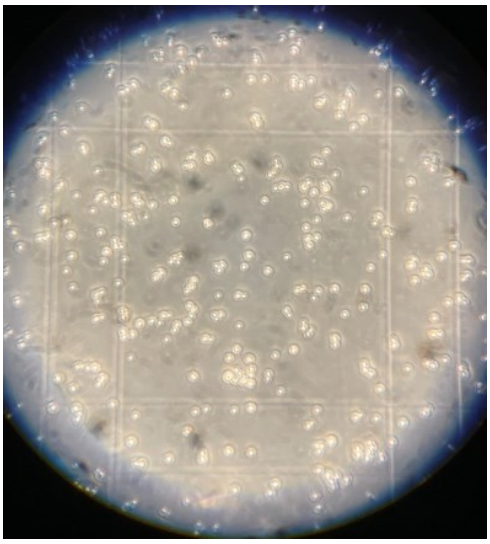

Figura 21. Cellule di lievito al microscopio (ingrandimento 400x)

La determinazione della conta totale può risultare utile per fare un confronto con la popolazione vitale e verificare così la vitalità delle cellule di lievito, ma anche il loro grado di aggregazione.

Campione	Conta vitale	Conta totale	Differenza
C1	9,25 x 10^8 [UFC/ml] 8,96 [Log UFC/ml]	3,43 x 10^9 [cell/ml] 9,54 [Log UFC/ml]	0,58 [Log UFC/ml]

Tabella 11. Conta vitale in piastra (UFC/ml), Conta totale al microscopio ottico (cell/ml), differenza logaritmica tra le due popolazioni

La popolazione totale delle cellule di lievito è poco più alta rispetto a quella vitale, infatti, la differenza tra conta vitale e conta totale è molto bassa:

$$9{,}54\ [\text{Log UFC/ml}] - 8{,}96\ [\text{Log UFC/ml}] = 0{,}58\ [\text{Log UFC/ml}]$$

Questo dimostra che la quasi totalità delle cellule di lievito sviluppate in coltura liquida sono vitali e quindi è in grado di effettuare il metabolismo fermentativo e produrre CO_2, responsabile della lievitazione dell'impasto. La lieve differenza tra i due valori denota un certo grado di aggregazione cellulare, evidente anche nella Figura 2: le cellule singolarmente contabili al microscopio, una volta inoculate in terreno colturale adatto, se tendono ad aggregare possono dare origine ad una sola unità formante colonia (UFC).

4.2.3 Peso secco

La biomassa proveniente da un volume noto di coltura del ceppo C1 è stata poi sottoposta a essiccazione in stufa per la determinazione del peso secco cellulare (g ss/L). Tale parametro consente di definire il quantitativo di cellule di lievito in una coltura per via gravimetrica.
Il peso secco riferito a 1 litro di coltura liquida è stato determinato attraverso le equazioni riportate nel Capitolo Materiali e Metodi (pagina 41).
I dati utilizzati per il calcolo del peso secco sono riportati in Tabella 12:

Peso piattello (g)	Tara piattello (g)	Peso secco (g)
4,593	4,440	0,153

Tabella 12. Dati per il calcolo del peso secco

Dall'analisi in laboratorio, il peso secco riferito a 1 litro di coltura liquida risulta pari a 3,06 g ss/L.
In questa fase del lavoro è stato necessario anche calcolare la percentuale di secco cellulare del campione di biomassa isolato dal fondello ottenuto dopo centrifugazione della coltura.
Per la determinazione della % di peso secco presente nel fondello si applica la formula riportata di seguito. Si è proceduta ad essiccare un quantitativo noto (circa 0,5 g) di biomassa di lievito ottenuta per centrifugazione della coltura liquida.

$$\frac{Peso\ biomassa}{0{,}5\ g} \times 100 \ = \ \%\ lievito\ \text{secco}\ (cellule)$$

Il "peso biomassa" è pari a:

$$Peso\ piattello\ (dopo\ essicazione) - Tara\ piattello = 4{,}521 - 4{,}429 = 0{,}092\ \text{g.}$$

Di conseguenza la percentuale di lievito in termini di secco cellulare è pari al 18,42%.

4.2.4 Prove di fermentazione

La biomassa di lievito isolata dal campione C1 è stata impiegata per allestire prove di fermentazione sia con il metodo Hayduck sia con il metodo Burrows Harrison.
Il metodo Hayduck prevede che il campione di lievito compresso venga disciolto in una soluzione di saccarosio. Una volta disposto il bioreattore e avviata la fermentazione, sulla buretta graduata è possibile leggere gli andamenti dei volumi di CO_2. Lo sviluppo della fermentazione è riportato in Tabella 13, dove i dati fanno riferimento a intervalli di 5 minuti.

Tempo (minuti)	**CO_2 letta sulla buretta (mL)**	**CO_2 sviluppata (mL)**
0	5,8	0
5	6,2	0,4
10	7,6	1,8
15	9,2	3,4
20	11,2	5,4
25	13,2	7,4
30	15,4	9,6
35	17,2	11,4

40	19,2	13,4
45	21,0	15,2
50	23,2	17,4
55	25,0	19,2
60	26,8	21,0
65	28,6	22,8
70	30,0	24,2

Tabella 13. Sviluppo di CO_2 metodo Hayduck

Di seguito viene riportato anche il grafico (Figura 22) relativo all'andamento dello sviluppo di CO_2 in termini di volume (ml) in funzione del tempo (min).

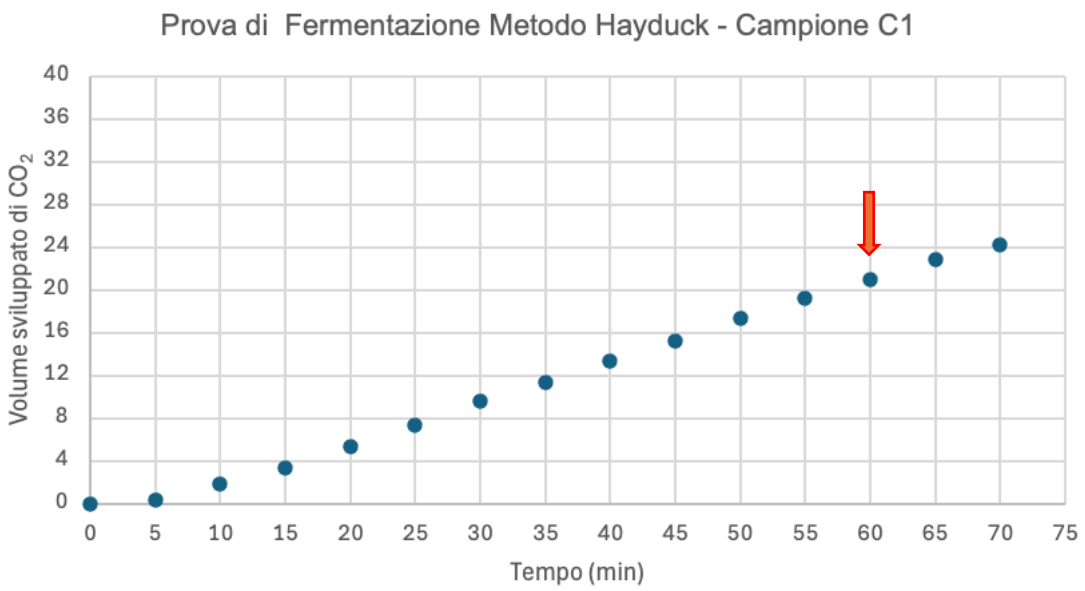

Figura 22. Andamento dello sviluppo di CO_2

Dal grafico è possibile notare che il volume di CO_2 prodotta tende ad aumentare con il passare dei minuti assumendo un andamento lineare. Lo sviluppo di CO_2 viene valutato a 60 min di reazione (indicato in blu in Tabella 13). Il limite minimo per questa metodica è pari a 250 mL di CO_2 sviluppati a 60 min riferiti a 1 g di lievito compresso (che contiene il 30% secco cellulare).

Sono stati quindi determinati i grammi di sostanza secca contenuti in 0,476 g di biomassa di lievito inizialmente pesata (pesata imposta dalla metodica) e derivante dal fondello centrifugato. I grammi

ottenuti sono quindi stati rapportati alla % di lievito secco stimata durante il calcolo del Peso secco (18,47%).
La sostanza secca presente in 0,476 g di fondello di biomassa di lievito calcolata per il ceppo C1 risulta pari a:

$$\frac{18{,}47}{100}\ x\ 0{,}476 = 0{,}0876\ g\ di\ secco$$

Per la determinazione del volume di CO_2 con il metodo Hayduck si procede con l'applicazione della seguente formula:

$$V_{60\,'\,(mL)}:\ ss\ (g)\ =\ X_{\,(mL)}:\ 3\ (g)$$

Dove:

- Il volume di CO_2 prodotto a 60 minuti di reazione è pari a 21 ml
- La sostanza secca è di 0,0876 g

Svolgendo la proporzione sopra riportata, il volume di CO_2 sviluppato a 60 min di reazione per il ceppo di lievito isolato dal campione C1 risulta pari a 719 ml, ben al di sopra del limite minimo di 250 ml stabilito dalla procedura. Di conseguenza, il ceppo di lievito isolato dall'impasto acido si è confermato in grado di svolgere in maniera efficiente la fermentazione alcolica.

Il metodo Burrows Harrison prevede che la performance fermentativa venga valutata in un impasto modello costituito da farina e acqua. Come farina è stata utilizzata quella prelevata dal Panificio di provenienza dell'impasto acido, ovvero quella di tipo "1". Con questa procedura si determina la CO_2 prodotta a partire da un campione di lievito contenente 0,16 g di secco cellulare, che viene miscelato con 15 ml di acqua distillata e 20 g di farina. Per determinare quanti grammi di lievito compresso corrispondono a 0,16 g di sostanza secca, si applica la seguente reazione:

$$Biomassa\ \text{secca}_{\,(g)}:\ 0{,}5\ g\ =\ 0{,}16\ g\ :\ X_{\,(g)}$$

La Biomassa secca (g) è stata calcolata attraverso il procedimento del peso secco dopo essicazione in stufa di circa 0,5 g di biomassa di lievito ottenuta dalla centrifugazione. Tale parametro risulta pari a

0,092 g. Applicando la formula, si ottiene così che i grammi di fondello di lievito corrispondenti a 0,16 g di sostanza secca sono 0,868 g.
Questo quantitativo è stato quindi miscelato con acqua distillata e farina all'interno del reattore. È stato così possibile leggere a intervalli di 10 min le variazioni di volume avvenute nella buretta graduata del fermentatore (Tabella 23).

Tempo (minuti)	**CO_2 letta sulla buretta (ml)**	**CO_2 sviluppata (ml)**
0	6,8	0
10	10,2	3,4
20	19,6	12,8
30	29,8	23,0
40	36,2	29,4
50	40,0	33,2
60	42,4	35,6
70	44,6	37,8
80	46,6	39,8
90	48,2	41,4
100	50,0	43,2
110	51,4	44,6
120	52,6	45,8
130	54,0	47,2

Figura 23. Sviluppo di CO2 metodo Burrows Harrison

Di seguito viene riportato il grafico relativo alla variazione di volume avvenuta nella buretta graduata (Figura 24).

Con il metodo Burrows Harrison lo sviluppo di CO_2 (ml) è determinato a 120 min di reazione.
Per la determinazione del volume di CO_2 sviluppato a 120 min di reazione è stata usata l'equazione riportata di seguito, in cui il secco cellulare (g) è stato calcolato in base alla % di sostanza secca del campione.
Il volume minimo di produzione di CO_2 è fissato a 110 ml.

$$V_{120'\,(ml)} : ss_{(g)} = X : 0{,}3_{(g)}$$

Dove:

- $V_{120'\,(ml)} = 45{,}8$ ml
- $ss_{(g)} = 18{,}42\% \times 0{,}868 = 0{,}1598$ g

Il volume di CO_2 sviluppato a 120 min di reazione risulta quindi pari a 85,98 ml, un po' più basso rispetto al valore minimo stabilito dalla metodica.

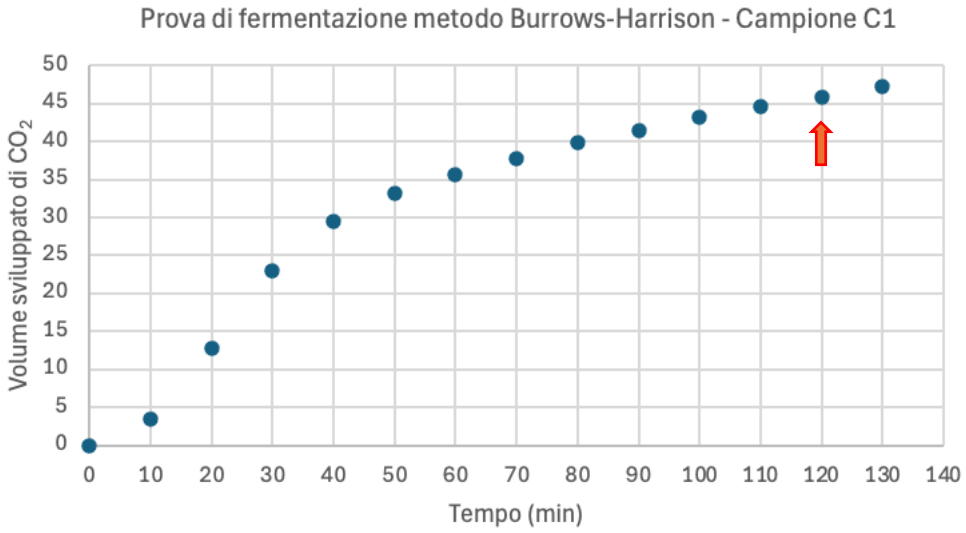

Figura 24. Andamento dello sviluppo di CO_2 Metodo Burrows Harrison

In conclusione, l'analisi dei risultati evidenzia come, rispetto alla procedura Hayduck, il volume di CO_2 prodotto dal metodo Burrows-Harrison non sia conforme agli standard previsti. Questo fenomeno può essere attribuito alla differente disponibilità di substrati fermentescibili nei due metodi. Nella procedura Hayduck, la presenza di saccarosio, fornisce ai microrganismi un carboidrato facilmente fermentescibile, favorendo un'intensa attività fermentativa. Al contrario, nel metodo Burrows Harrison, in cui la fonte di carboidrati è rappresentata dall'amido contenuto nella farina, l'efficienza della fermentazione dipende dalla presenza e dalla concentrazione di zuccheri fermentescibili. A riguardo, l'utilizzo di una farina di tipo 1 meno raffinata potrebbe aver contribuito al risultato meno performante rispetto alle condizioni standard della procedura.
È inoltre plausibile che la ridotta produzione di CO_2 osservata nella procedura Burrows-Harrison sia anche riconducibile al ceppo di lievito analizzato. Nello specifico, il ceppo isolato dal campione di impasto acido potrebbe essere caratterizzato da capacità fermentative diverse e da una diversa velocità di utilizzo dei carboidrati rispetto ai ceppi di lievito presenti in commercio.

5. Conclusioni

Le analisi microbiologiche e, in particolar modo la conta vitale, hanno permesso di dimostrare che tutti e cinque i campioni di pasta madre presentano buoni valori di cellule vitali. I batteri lattici mostrano una concentrazione in linea con quanto riportato nella letteratura scientifica, variando tra $10^7 - 10^9$ UFC/g. Al contrario, la concentrazione dei lieviti presenta una maggior variabilità tra i campioni. Questo è un fenomeno normale e non necessariamente problematico, ma sarebbe opportuno monitorare con attenzione il processo produttivo per controllare la concentrazione di lieviti e migliorare così la qualità del prodotto finale. In particolar modo, i fattori principali da controllare sono: pulizia dell'ambiente di lavoro (per prevenire contaminazioni), temperatura di fermentazione (la temperatura ottimale è compresa tra i 20 e i 35 °C) e frequenza dei rinfreschi (interventi frequenti favoriscono la proliferazione dei lieviti). Le differenze osservate nella concentrazione di lieviti analizzati potrebbero essere attribuite a una combinazione di fattori, tra cui le condizioni di fermentazione e le pratiche di gestione della pasta madre.

Per il campione C1, proveniente dalla *Forneria Salvetti*, è stata valutata la capacità fermentativa delle cellule di lievito attraverso le prove di fermentazione. Mentre con il metodo Hayduck il campione ha mostrato un'efficace fermentazione, conforme agli standard prefissati, la procedura Burrows Harrison non ha dato lo stesso risultato. Questa differenza nelle performance fermentative potrebbe dipendere dalla diversa disponibilità di zuccheri fermentabili nei due metodi e, in particolare, dall'uso della farina nella procedura Burrows Harrison. La farina, essendo l'ingrediente principale nella panificazione, ricopre un ruolo cruciale nel processo di fermentazione. Per i rinfreschi del campione C1, il panificio utilizza normalmente una farina di tipo 1, meno raffinata rispetto alle farine 0 e 00. Questa farina offre una maggiore complessità di sapore e valori nutrizionali, ma la presenza di fibre può rendere l'impasto più pesante e ridurre il volume del lievitato (Sissons, 2008). Le farine 0 e 00, al contrario, favoriscono una fermentazione più rapida e una pasta madre più leggera. Per questi motivi, per mantenere la complessità del sapore e migliorare la performance fermentativa della pasta madre proveniente dalla *Forneria Salvetti,* si consiglia un rinfresco misto, che combina farina integrale e raffinata.

Un altro fattore che potrebbe aver influito sulla performance fermentativa è il ceppo di lievito analizzato. La pasta madre contiene infatti diverse specie di lieviti, ognuna con capacità fermentative differenti, in contrasto con il lievito di birra, ovvero il lievito commerciale. Quest'ultimo infatti è costituito da un concentrato di cellule vive, selezionate in laboratorio e con elevate capacità fermentative. Al contrario, nella pasta madre, la composizione di lieviti e batteri lattici è determinata principalmente dal tipo di farina utilizzata e dalle condizioni ambientali, che consentono di ottenere un prodotto autentico e distinto rispetto ai metodi industriali.

In conclusione, l'analisi dei campioni di pasta madre provenienti dai panifici della Val Camonica ha messo in luce caratteristiche microbiologiche di buona qualità, con un ottimo contenuto di batteri lattici e lieviti, pur mostrando una certa variabilità tra i campioni. Tale variabilità è ciò che rende i panificati di montagna unici e particolarmente apprezzati per la loro diversità.

Un possibile sviluppo futuro del progetto riguarda l'estensione dell'analisi delle performance fermentative ai campioni rimanenti, al fine di confrontare le capacità fermentative delle paste madri della Val Camonica in relazione alle diverse modalità di gestione applicate. Inoltre, per ottenere un quadro più accurato della variabilità microbica presente nell'impasto, sarebbe opportuno eseguire test di identificazione dei ceppi di lieviti e batteri lattici. L'identificazione di questi microrganismi è cruciale per monitorare e ottimizzare il processo di fermentazione, migliorare le caratteristiche organolettiche del pane, come sapore e aroma, e prevenire contaminazioni indesiderate. Questo approccio permetterebbe di garantire un processo di panificazione più sicuro e controllato, favorendo la produzione di un lievitato finale di qualità costante.

6. Bibliografia e Sitografia

Archetti, 2015. La civiltà del pane, Vol. 3: 1663-1704.

Arendt, E.K., Ryan, L.A.M., Dal Bello, F., 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. Food Microbiology, 24: 165-174.

Arora, K., Ameur, H., Polo, A., Di Cagno, R., Rizzello, C.G. & Gobbetti, M., 2021. Thirty years of knowledge on sour-dough fermentation: A systematic review. Trends in Food Science Technology, 108: 71-83.

Axelsson, L., 2004. Lactic acid bacteria: Classification and physiology, in Salminen, S., Von Wright, A. & Ouwehand, A. (a cura di), Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects, 3a ed., Marcel Dekker Inc.

Barber, S., Baguena, R., Barber, C. B., & Martinez-Anaya, M. A., 1991. Evolution of biochemical and rheological characteristics and breadmaking quality during a multistage wheat sour dough process. Z Lebensm Unters Forch 192: 46–52.

Blank, L.M., Lehmbeck, F. & Sauer, U., 2005. Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts: FEMS Yeast Research, 5: 545-558.

Brandt M.J., 2005. Geschichte des Sauerteiges, 1-5.

Brandt, M.J., 2007. Sourdough products for convenient use in baking. Food Microbiology, 24:161-164.

Carbonetto, B., Ramsayer, J., Nidelet, T., Legrand, J. & Sicard, D., 2018. Bakery yeasts, a new model for studies in ecology and evolution. Ecoyeast review, 35: 591-603.

Collar, C., Benedito de Barber, C. & Martìnez-Anaya, M.A., 1994. Microbial sourdoughs influence acidification properties and bread-making potential of wheat dough. Trends in Food Science & Technology, 59: 629-633

Corsetti, A. & Settanni, L.,2007. Lactobacilli in sourdough fer-mentation: A review. Food Research International, 40: 539-558.

De Vuyst, L., Comasio, A., & Kerrebroeck, S. Van., 2021. Sourdough production: fermentation strategies, microbial ecology, and use of non-flour ingredients. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2447–2479.

De Vuyst, L. & Neysens, P., 2005. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. Trends Food Science & Technology, 16 (3): 43-56.

De Vuyst, L. & Vancanneyt, M., 2007. Biodiversity and identification of sourdough lactic and acid bacteria. Food microbiology, 24:120-127.

Decock, P. & Cappelle, S., 2005. Bread technology and sourdough technology. Trends in Food Science Technology, 16: 113-120.

Deleu, L.J., Lemmens, E., Redant, L.& Delcour, J.A., 2020. The major constituents of rye flour and their role in the production of rye bread, a food product to which multitude of health aspects are ascribes. Review, 97 (4): 739-754.

Fracasso, I., Dinella, A., Giammarchi, F., Marinchel, N., Kołaczek, P., Lamentowicz, M., et al. 2022. Climate and human impacts inferred from a 1500-year multi-proxy record of an alpine peat bog in the South-Eastern Alps. Ecological Indicators, 145:109737.

Franzoni, O., 1992. Antiche descrizioni di Valle Camonica, in «Quaderni camuni», 239-251.

Gänzle, M. G., 2015. Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. Current Opinion in Food Science, 2:106–17.

Gänzle, M. G. e J. Zheng, 2019. Lifestyles of sourdough lactobacilli - Do they matter for microbial ecology and bread quality? International Journal of Food Microbiology, 302: 15–23.

Gänzle, M.G., Vermeulen, N. & Vogel, R.F., 2007. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough: Food Microbiology, 24 (2):128-138.

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

Gobbetti, M., Gànzle, M., 2013. Handbook on Sourdough Biotechnology, 7- 85-97-17.

Gobbetti, M., Lavermicocca, P., Corsetti, A., 2001. Microbiologia degli Alimenti, in De Filip, G. (a cura di), Recenti sviluppi di igiene e microbiologia degli alimenti, cap 10.

Gobbetti, M. & Rizzello, C. G., 2023. Biotecnologia dei prodotti lievitati da forno, 174- 207- 208- 209-214-334.

Greco, L., Gobbetti, M., Auricchio, R., Di Mase, R., Landolfo, F., Paparo, 2011. Safety for patients with celiac disease of baked goods made of wheat flour hydrolyzed during food processing. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 9: 24–29.

Guidotti, M. C., 2005. L'alimentazione nell'antico Egitto. Cibi e Sapori Nel Mondo Antico, 18–24.

Hammes, W.P. & Gänzle, M.G., 1998. Sourdough breads and related products. Microbiology of Fermented Foods, 1, cap. 8, Blackie Academic and Professional.

Hammes, W. P., & Vogel, R. F., 1995. The genus Lactobacillus. In B. J. B. Wood & W. H. Holzapfel (Eds.), The Genera of Lactic Acid Bacteria (p. 19).

Hebert, E. M., Raya, R. R., & De Giori, G. S., 2000. Nutritional Requirements and Nitrogen Dependent Regulation of Proteinase Activity of Lactobacillus helveticus. Applied and Environmental Microbiology, 66 (12): 5316–5321.

Huys, G., Daniel, H.-M. & De Vuyst, L., 2013. Taxonomy and biodiversity of sourdough yeasts and lactic acid bacteria, in Gobbetti, M., Gänzle, M. (a cura di), Handbook on Sourdough Biotechnology, Springer, New York, 105-154.

Jayaram, V. B., S. Cuyvers, K. J. Verstrepen, J. A. Delcour, and C. M. Courtin, 2014. Succinic acid in levels produced by yeast (Saccharomyces cerevisiae) during fermentation strongly impacts wheat bread dough properties. Food Chemistry, 151: 421–428.

Kashika Arora, Hana Ameur, Andrea Polo, Raffaella Di Cagno, Carlo Giuseppe Rizzello, Marco Gobbetti, 2021. Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review. Trends in Food Science Technology, 108: 71-72.

Lhomme, E., Urien, C., Legrand, J., Dousset, X., Onno, B., & Sicard, D. (2016). Sourdough microbial community dynamics: An analysis during French organic bread-making processes. Food Microbiology, 53: 41–50.

Marcone, A., 1997. Storia dell'agricoltura romana. Dal mondo arcaico all'età imperiale.

Marino, F., 2020. Le basi della panificazione artigianale moderna, Vol. 1: 49.

Martinez-Anaya M.A., Pitarch B., Benedito de Barber C.,1993. Biochemical Characteristics and breadmaking performance of freezed-dried wheat sour dough starter; Lebensm Unters Forsch.

Mortimer, R.K., 2000. Evolution and Variation of the Yeast (Saccharomyces). Genome, 10: 403-409.

Onno, B., Les levains, in Guinet, R., Godin, B., 1994. La panification française, cap. 8, Lavoisier, Paris.

Onno, B. & Roussel, P., 1994. Technologie et microbiologie de la panification au levain, in De Roissart, H., Luquet, F.M., vol. 11, cap 5.

Ottogalli, G., Galli, A & Foschino, R., 1996. Italian bakery products obtained with sourdough: characterization of the typical microflora. Advances in Food Sciences, 18 (5-6). 5-6.

Pétel, C., B. Onno, and C. Prost. 2017. Sourdough volatile compounds and their contribution to bread: A review. Trends in Food Science & Technology, 59:105–23.

Sissons, M., 2008. Role of durum wheat composition on the quality of pasta and bread. Food, 2:75-90.

Spicher, G., 1983. Baked goods, in Rehm, H.J, Reeds G. (a cura di). Biotechnology, vol. 5, Verlag VCH, Weinheim.

Spicher, G. & Pomeranz, Y., 1985. Bread and other baked products, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5a ed., vol. A4, Verlag VCH, Weinheim.

Tognali Dino Marino, 2010. La mia terra, la mia gente. Storia, tradizioni e linguaggio dell'Alta Valle Camonica. Volume 2, Amministrazione Comunale di Vione e Museo Etnografico dell'Alta Valle Camonica 'L Zuf di Vione.

Vrancken, G., De Vuyst, L., Van der Meulen, R., Huys, G., Vandamme, P., & Daniel, H.-M. (2010). Yeast species composition differs between artisan bakery and spontaneous laboratory sourdoughs. FEMS Yeast Research, 10 (4): 471–481.

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G. & Leeber, S., 2020. A taxonomic note on the genus Lactobacillus: description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 70 (4): 2782-2858.

Banca dati lieviti.
https://theyeasts.org/species-search

Caratteristiche di Saccharomyces cerevisiae.
https://www.microbiologiaitalia.it/micologia/saccharomyces-cerevisiae/

Eventi regione Lombardia. Lo Pan Ner. Il Pane delle alpi.
https://eventi.regione.lombardia.it/it/lo-pan-ner-il-pane-delle-alpi

Il metabolismo del lievito madre, figura pagina 3.
https://lesaffre.it/wp-content/uploads/2024/03/LESAFFRE_ComunicazioneTecnica-14.pdf

La lunga storia del "Pane nero in Alta Valcamonica".
https://www.ecomuseoaltaviaoglio.org/wordpress/wp-content/uploads/2017/10/Pane-Nero.pdf

La produzione mondiale di cereali nel 2024/25, suddivisa per tipo.
www.statista.com/statistics/263977/world-grain-production-by-type/

Lo Pan Ner.
https://www.lopanner.com/brescia/

Salvetti e la segale.
https://www.salvettibakery.com/segale/

Ringraziamenti

Ringrazio innanzitutto la Professoressa Claudia Picozzi per avermi dato l'opportunità di svolgere questa esperienza di laboratorio, per avermi seguita con attenzione e per i preziosi suggerimenti nella stesura di questo lavoro. Grazie anche alla Professoressa Manuela Rollini per il suo supporto fondamentale nell'attività di laboratorio e per la revisione di queste pagine.
Vorrei poi ringraziare i miei genitori, anche se queste poche righe non potranno mai esprimere l'immensa gratitudine che ho nei loro confronti. Grazie a entrambi per avermi sempre sostenuta, non solo concretamente, ma soprattutto con il vostro affetto e incoraggiamento. Grazie per avermi spinta a seguire la mia strada e per avermi fatto scoprire la passione più grande della mia vita: la montagna.
Ai miei fratelli Isa e Dudù, perché siete e sarete per sempre un porto sicuro e un punto di riferimento più di quanto possiate immaginare. La nostra famiglia sarà sempre il mio posto preferito.
Ai nonni Anna, Nino, Caia e Ugo: grazie per ogni parola di incoraggiamento prima di ogni esame.
Un ringraziamento prezioso va al mio Loris: grazie per tutto l'amore e il sostegno che mi hai dato in questi anni, per aver reso questo traguardo ancora più significativo. Grazie per avermi insegnato che nella vita ci saranno sempre montagne da scalare, ma che, "un passo alla volta", posso affrontarle tutte.
Infine ci tenevo a ringraziare il Professore Marco Saracchi, perché all'ultimo esame della triennale, mi ha detto delle parole bellissime che mi ricorderò per tutta la vita.