

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
Facoltà di Agraria
Corso di Laurea Specialistica in Scienze Alimentari

**CARATTERISTICHE DI PANE PRODOTTO SU LINEE INDUSTRIALI
A PARTIRE DA FARINA ARRICCHITA IN FIBRA**

Relatore: Prof.ssa M. Ambrogina Pagani
Correlatori: Dott.ssa M. Cristina Casiraghi
Dott.ssa Gabriella Bottega

Tesi finale di:
Giada Pessina
Matr. n. 737313

Anno accademico 2008 - 2009
II sessione

*Ringrazio la mia Famiglia e tutti coloro che, con sincerità, mi
sono stati accanto in questi anni di studio.*

INDICE

Indice	I
1. Introduzione	1
1.1 Il pane	1
1.1.1 Cenni storici.....	1
1.1.2 Definizione e tecnologia di produzione.....	2
1.2 Indice Glicemico, definizione e ruolo metabolico	11
1.3 Il pane e la sua risposta glicemica	14
2. Scopo del lavoro	17
3. Materiali e metodi	18
3.1 Materiali	18
3.1.1 Presentazione dell'Azienda	18
<i>Cenni storici</i>	18
<i>La struttura dello stabilimento di Muggiò</i>	18
<i>La rete di vendita</i>	19
<i>I prodotti</i>	20
3.2 Metodi	25
3.2.1 Analisi sulla farina	25
<i>Analisi chimiche</i>	25
<i>Umidità</i>	25
<i>Ceneri</i>	26
<i>Proteine</i>	26
<i>Amido totale</i>	26
<i>Amido danneggiato</i>	28
<i>Fibra solubile e insolubile</i>	29
<i>Misure di light scattering e separazione in SE-HPLC</i>	29
<i>Analisi reologiche</i>	30
<i>Analisi farinografica</i>	30
<i>Analisi alveografica</i>	33
<i>Analisi viscoamilografica</i>	35

<i>Analisi reofermentografica</i>	37
<i>Consistometro Bostwick</i>	42
<i>Analisi fisiche</i>	44
<i>Colore</i>	44
3.2.2 <i>Analisi sul prodotto finito</i>	45
<i>Analisi chimiche</i>	45
<i>Umidità</i>	45
<i>Ceneri</i>	46
<i>Proteine</i>	46
<i>Lipidi</i>	46
<i>Fibra totale</i>	46
<i>Zuccheri solubili</i>	46
<i>Amido totale (TS) ed amido resistente (RS)</i>	46
<i>Analisi chimico-fisiche</i>	47
<i>Attività dell'acqua (aw)</i>	47
<i>Analisi fisiche</i>	47
<i>Peso</i>	47
<i>Volume</i>	47
<i>Volume specifico</i>	48
<i>Colore</i>	48
<i>Analisi dell'immagine</i>	48
<i>Test di compressione</i>	49
<i>Prove in vivo</i>	50
<i>Analisi statistica dei risultati</i>	52
4. Risultati e discussione	53
4.1 <i>Tipologia sfarinati</i>	53
4.2 <i>Caratterizzazione della materia prima</i>	53
4.2.1 <i>Aspetto delle farine</i>	54
4.2.2 <i>Caratteristiche compositive</i>	54
4.2.3 <i>Caratteristiche reologiche</i>	55
4.2.4 <i>Caratterizzazione della frazione "fibra"</i>	62

4.3 Ottimizzazione delle condizioni del processo di panificazione in funzione delle caratteristiche della materia prima.....	66
4.4 Caratterizzazione dei prodotti finiti.....	67
4.4.1 Proprietà fisiche del pane	67
4.4.2 Shelf-life del pane.....	71
4.4.3 Caratteristiche chimiche del pane	75
4.5 Prove in vivo	78
4.5.1 Soggetti e protocollo sperimentale	78
4.5.2 Determinazione del glucosio	79
5. Conclusioni.....	82
6. Riassunto	84
7. Bibliografia.....	87
8. Appendice	91

1. INTRODUZIONE

1.1 IL PANE

1.1.1 Cenni storici

Il pane, inteso come prodotto ottenuto dalla cottura di un impasto a base di farina, acqua e lievito, può essere considerato come l'alimento con origini più antiche: le prime testimonianze risalgono infatti alla civiltà egizia (3100 a.C.). In molte società, il pane è stato e viene tuttora considerato come simbolo sacro. Al tempo degli Egizi era usato nei riti religiosi e veniva gettato nel Nilo in omaggio agli dei, mentre i Greci lo ritenevano di importanza tale da dedicare templi alla Dea del pane (Lucisano, 2005).

Attualmente il frumento rappresenta il cereale panificatorio per eccellenza, ma originariamente furono impiegati soprattutto orzo e miglio, quest'ultimo è un cereale ad elevato potere nutrizionale tutt'oggi alla base dell'alimentazione delle regioni nord africane (www.coldiretti.it).

Nei più antichi processi di panificazione, risalenti alla preistoria, il frumento veniva frammentato e consumato come una pasta acquosa; solo più tardi venne impiegata la macinazione e la successiva setacciatura di tale cereale. La farina così ottenuta veniva impastata e sagomata in grossi pani che venivano poi cotti su piastre roventi o direttamente sul fuoco. La successiva evoluzione storica fu la cottura di un impasto fermentato: gli antichi Ebrei distinguevano infatti tra pane lievitato e pane non lievitato (*pane azzimo*). Il processo di lievitazione naturale fu casualmente scoperto dagli Egizi: un impasto di farina e acqua dimenticato in un luogo caldo fermentò spontaneamente diventando soffice, voluminoso e acido, e dopo la cottura risultò essere fragrante e buono. La conoscenza della fermentazione venne quindi in seguito tramandata a Greci e Romani.

I Greci aggiunsero nuovi aromi e sapori alla lavorazione, riuscendo a produrre oltre 72 tipi di pane; sono stati però i Romani a dare alla lavorazione del pane un valore artigianale con l'uso di farine bianche e più dolci. A Roma i forni pubblici nacquero nel 168 a.C. e ai tempi di Augusto se ne contavano circa 400 (www.pianetapane.it).

Tra i secoli XI e XII, il mulino si affermò nell'economia rurale. Furono i ricchi e le classi agiate a consentirne l'espansione. Nell'antica Roma si conoscevano decine di qualità differenti di pane, spesso ottenuto con crusca o miscele di cereali meno "nobili" del grano tenero e destinato ai consumatori delle classi più povere; per i ceti più ricchi, invece, venivano aggiunti altri ingredienti quali latte, miele o burro. I panettieri del tempo cuocevano il pane in forni di pietra o di argilla e la panetteria faceva frequentemente parte di un complesso comprendente anche un molino ed una fabbrica di birra.

Durante tutti questi secoli, fino alla rivoluzione industriale, l'evoluzione della panificazione fu assai lenta. I cambiamenti più importanti furono possibili grazie ai nuovi sistemi di macinazione, all'impiego di macchine per impastare e raffinare, ai forni, a nuovi ingredienti capaci di conferire maggiore forza alle farine (www.pianetapane.it).

Da allora, la formulazione base e le principali fasi del processo di produzione del pane sono rimaste sostanzialmente invariate sebbene, in molti Paesi, il processo di panificazione sia stato progressivamente automatizzato e reso "continuo". (Lucisano, 2005).

1.1.2 Definizione e tecnologia di produzione

Secondo la legislazione italiana (L.580/67, art.14; mod. DL 27.01.92 n°109 e L.146/94, art. 44; DPR 502/98, art. 2) è denominato **pane** *"il prodotto ottenuto dalla cottura totale o parziale di una pasta convenientemente lievitata, preparata con sfarinati di grano, acqua e lievito, con o senza aggiunta di sale comune (cloruro di sodio)"*.

Nella produzione del pane è, inoltre, consentito l'impiego di farine di cereali maltati, estratti di malto, alfa e beta amilasi ed altri enzimi naturalmente presenti negli sfarinati, paste acide essiccate, farine pregelatinizzate di frumento, glutine, amidi alimentari, zuccheri (art. 3 e 4, DPR 30 novembre 1998 n. 502).

Tuttavia, come evidenziato dalla stessa definizione di legge, gli ingredienti base utilizzati per produrre un impasto destinato alla panificazione sono farina, acqua e lievito.

La **farina** è l'elemento "strutturante": durante l'impastamento, in seguito all'aggiunta di acqua ed all'apporto di energia, si assiste alla formazione del glutine, struttura a maglia tridimensionale nella quale resta intrappolato l'amido. Il glutine possiede contemporaneamente caratteristiche viscoso ed elastiche, le quali permettono alla maglia proteica formata di distendersi sotto la pressione esercitata dai gas di fermentazione e contemporaneamente trattenere tali gas con conseguente aumento di volume dell'impasto. Durante la cottura la struttura glutinica si irrigidisce, in seguito alla denaturazione proteica, determinando il mantenimento della forma e del volume del pane (Lucisano, 2005).

Altro ingrediente fondamentale è l'**acqua**, aggiunto in quantità che possono variare, a seconda del tipo di pane e del metodo di lavorazione, da 40 a 65 parti per 100 parti di farina. L'acqua non solo consente l'idratazione dei componenti macro-molecolari, tappa indispensabile per la formazione del glutine, ma regola anche le attività enzimatiche, idrata i granuli d'amido durante la cottura consentendone la gelatinizzazione ed esplica un'azione solvente per altri ingredienti quali il glucosio, il saccarosio, il sale (Pagani, Manzoni, 2007).

Il principale compito del **lievito**, generalmente *Saccharomyces cerevisiae*, è la conversione dei carboidrati fermentescibili presenti nell'impasto in anidride carbonica ed etanolo. Il gas che si forma determina l'aumento in volume dell'impasto durante la fase di lievitazione, provocando importanti modificazioni nella struttura del prodotto (Pagani, Manzoni, 2007).

La più importante funzione del **sale** è quella sensoriale, solo secondariamente ha anche la funzione strutturale di formare legami salini con le proteine del glutine.

Per quanto riguarda gli altri ingredienti che si possono ritrovare nelle formulazioni da pane, gli zuccheri rappresentano una fonte di carboidrati disponibili per i microrganismi e contribuiscono a migliorare il gusto ed il colore del pane. (Pagani, Manzoni, 2007).

Il pane addizionato di grassi prevede l'aggiunta di burro, strutto o olio d'oliva in quantità tale che la materia grassa rappresenti almeno il 3% della sostanza secca del prodotto finito.

L'impiego di estratti di malto o farina di cereali maltati permette di arricchire l'impasto di enzimi, specialmente alfa amilasi, in grado di idrolizzare l'amido in zuccheri fermentescibili, substrato per i lieviti nella fase di fermentazione. L'addizione di malto e/o di enzimi amilasici consente quindi un rapido avvio della lievitazione, promuovendo un aumento del volume finale del prodotto e migliorandone l'alveolatura.

L'acido ascorbico infine viene aggiunto per la sua capacità di favorire la formazione di ponti disolfuro tra le proteine del glutine che consentono l'aumento di forza dell'impasto (Lucisano, 2005).

Il pane può essere definito come un prodotto in cui sono distinguibili due regioni:

- la **crosta**, generalmente caratterizzata da elevata croccantezza, colore accentuato e aroma caratteristico;
- la **mollica**, caratterizzata da colore chiaro e da una struttura soffice e alveolata, costituita da una fase continua (matrice solida e acqua), al cui interno è dispersa una fase gassosa, racchiusa negli alveoli che rappresenta il 70-75% dell'intero volume del prodotto (Pagani, 2007).

Dal punto di vista nutrizionale il pane è un prodotto in cui l'amido è stato parzialmente o totalmente gelatinizzato, divenendo così più facilmente idrolizzabile da parte degli enzimi presenti nel nostro apparato digerente (amilasi) e rendendo possibile un rapido apporto di energia in tempi brevi.

La legislazione italiana prevede e definisce diverse tipologie di pane: se l'impasto è costituito solamente dagli sfarinati di grano, acqua e lievito, il pane è denominato "*comune*"; se vi sono anche altri ingredienti si ha il pane "*speciale*". Il pane comune, a sua volta, viene classificato in vari tipi a seconda del tipo di farina impiegata, mentre gli altri ingredienti permessi nei pani speciali hanno lo scopo di rendere il pane più appetibile oppure di migliorarne la qualità (ad es. rallentare il raffermaimento, come nel caso del pane speciale all'olio).

A livello tecnologico, la realizzazione di un pane prevede un insieme di operazioni che hanno lo scopo di: includere aria sotto forma di bolle (impastamento), aumentare il volume dell'impasto (lievitazione), dare forma all'impasto (formatura), completare lo sviluppo in volume e consentire la differenziazione in mollica e crosta (cottura), permettere l'eventuale confezionamento del prodotto (raffreddamento). Le operazioni principali del processo sono riportate in Figura 1.1.

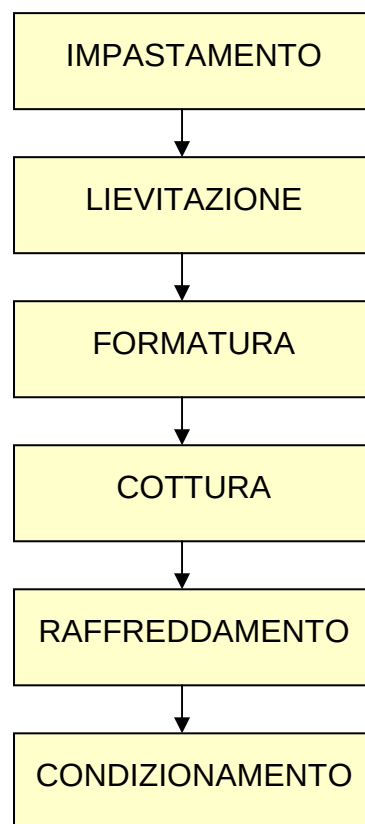


Fig. 1.1 Operazioni principali del processo di panificazione

L'**impastamento** è la prima tappa nella fabbricazione del pane e permette la formazione di una pasta liscia, omogenea, tenace, viscoelastica a partire dai due semplici componenti base: la farina e l'acqua. (D'Egidio, 2004).

Gli obiettivi della fase di impastamento sono: distribuire omogeneamente gli ingredienti, formare una struttura glutinica uniforme e coerente, includere aria sotto

forma di microscopiche bolle che aumenteranno di dimensione durante la seguente fase di lievitazione. (Lucisano, 2005).

Il processo di impastamento può variare per: presenza, o meno, di fasi di riposo, durata, energia apportata nell'unità di tempo.

Si è comunque soliti distinguere nell'impastamento due fasi:

- impastamento a bassa velocità, breve periodo (circa 5 minuti) in cui gli ingredienti sono miscelati. In questo periodo sono possibili eventuali interventi per correggere il prodotto;
- impastamento ad alta velocità, durante il quale è necessario fornire energia affinché la miscela di farina ed acqua sviluppi la struttura glutinica (Pagani, 2007).

L'operazione viene condotta mediante impastatrici che operano generalmente in discontinuo (impastatrici a forcella, a spirale, a bracci tuffanti, ecc.). L'operazione può essere resa continua utilizzando sistemi di impastatrici a carosello che lavorano per cariche successive ed alimentano sistemi continui (Lucisano, 2005).

La **lievitazione** è la fase successiva all'impastamento e ha un duplice scopo: la levata della pasta sotto l'effetto dell'anidride carbonica che si sviluppa durante il processo, e la sintesi di acidi organici e gas volatili che contribuiscono al gusto ed all'aroma del pane. (D'Egidio, 2004). In tale fase possono essere impiegati, in funzione della tipologia di prodotto, il convenzionale lievito per panificazione, costituito da cellule di *Saccharomyces cerevisiae*, o il lievito naturale acido costituito da una popolazione eterogenea di lieviti e batteri appartenenti a più generi e specie. (Pagani, Manzoni, 2007).

Durante l'impastamento, in presenza di ossigeno, il lievito presenta un metabolismo di tipo respiratorio, si moltiplica rapidamente producendo grandi quantità di metaboliti. Dopo qualche minuto dalla fine dell'impastamento, in assenza di ossigeno, passa ad un metabolismo di tipo fermentativo trasformando buona parte del glucosio presente nel mezzo in etanolo ed anidride carbonica. L'anidride carbonica che si sviluppa all'inizio si solubilizza nell'acqua libera presente nell'impasto e dopo saturazione si accumula in forma gassosa esercitando una pressione interna sul reticolo "impermeabile" del glutine. Questo, elastico ed

estensibile, permette all'impasto di aumentare di volume, mantenendo una struttura ben definita. (Pagani, 2007).

Durante la fase di lievitazione si assiste anche all'acidificazione dell'impasto per formazione di acido carbonico ed acidi organici che portano ad un abbassamento del pH e ad un aumento dell'acidità titolabile, nonostante il forte potere tampone delle proteine, inoltre, si formano i precursori dell'aroma e del gusto del pane.

Altra operazione presente nel processo di panificazione, prima della cottura, è la **formatura**, ovvero l'operazione che conferisce al prodotto la forma definitiva. A livello industriale, questa operazione viene realizzata con particolari attrezzature in grado di formare, dalla massa di impasto, uno strato di spessore regolare che verrà poi porzionato (cilindratrice-spezziatrice, filonatrice-spezziatrice, ecc.). Altri sistemi di porzionatura degli impasti lavorano invece su principi volumetrici.

L'operazione conclusiva di qualsiasi processo di panificazione è rappresentata dalla **cottura**, operazione durante la quale l'impasto aumenta di volume per l'espansione dei gas e dove si ha la solidificazione del film elastico che circonda ogni bolla di gas, condotta in forno per tempi proporzionali alla pezzatura del prodotto. La cottura induce trasformazioni radicali all'impasto lievitato che acquisisce così le caratteristiche peculiari di un "prodotto da forno". Da essa dipendono i caratteri sensoriali e l'aspetto dell'alimento, nonché la sua conservabilità. Fino a che la temperatura dell'impasto è inferiore ai 50° C le attività enzimatiche e fermentative riescono a proseguire. Al di sopra di tale temperatura i gas di lievitazione, l'anidride carbonica ed i vapori della miscela etanolo-acqua si espandono in maniera sempre più vistosa. Contemporaneamente i lieviti vanno incontro ad una morte rapida, buona parte delle attività enzimatiche si riduce ed inizia ad aver luogo il fenomeno della gelatinizzazione dell'amido. Le proteine del reticolo glutinico, che si sono ulteriormente estese a seguito della dilatazione termica dei gas di lievitazione (fenomeno dell'*oven spring*) vanno incontro a denaturazione, perdendo così la loro capacità di estendersi, si fissa così la forma del pane e la struttura alveolata della mollica. Durante la cottura solo a livello del sottile strato di crosta la temperatura si avvicina a quella del forno, raggiungendo ed oltrepassando i 150° C, all'interno del prodotto, invece, si raggiungono temperature vicine ai 100° C, ed è dunque possibile

assistere alla differenziazione tra crosta e mollica. La cottura è inoltre di fondamentale importanza anche per l'allontanamento di una buona parte dell'acqua presente nell'impasto, così da consentire al prodotto di non oltrepassare i limiti imposti dalla legge. Il pane, infatti, essendo venduto a peso, deve avere un contenuto massimo di umidità in funzione della sua pezzatura, come specificato nella Legge n. 580.

Durante l'evoluzione del processo di panificazione particolare attenzione è stata rivolta al soddisfacimento delle esigenze sensoriali: risultano grandemente apprezzate, infatti, la consistenza, la sofficità, la masticabilità di un prodotto alveolato; il gusto, la fragranza, l'aroma che da esso si sprigiona e il mantenimento di tutte queste peculiarità nel tempo. In ogni caso alcune operazioni del processo produttivo hanno un ruolo chiave sulle caratteristiche finali del prodotto. Le tappe fondamentali sono l'impastamento, la lievitazione e la cottura finale in forno, tutte indispensabili per formare, trattenere e "fissare" numerose bolle di gas nell'impasto: solo questa struttura permette di avere un prodotto soffice e gradevole alla masticazione. In particolare la lievitazione dell'impasto per opera dei lieviti è una tappa fondamentale non solo per la formazione di una struttura porosa e soffice, ma anche per la produzione di metaboliti determinanti per il gusto e l'aroma del prodotto. Sebbene sia stata ottimizzata nel corso dei secoli, ancora oggi la produzione di pane rappresenta un processo complesso, sofisticato, che richiede tempi lunghi, continue attenzioni e notevole esperienza per garantire buoni risultati.

La panificazione è tradizionalmente un processo discontinuo in quanto le diverse fasi di impastamento, di lievitazione e di cottura sono condotte su quantità discrete di materiale ed in impianti separati. Tuttavia verso la fine degli anni '50, vennero introdotti negli Stati Uniti alcuni processi di panificazione in continuo, in cui il dosaggio degli ingredienti e le successive operazioni avvenivano senza interruzione. Queste ultime tecnologie rimangono comunque poco diffuse in Italia, mentre trovano maggiore successo nei Paesi Anglosassoni (Pagani, Manzoni, 2007).

I **processi** di panificazione **discontinui** possono essere realizzati adottando un metodo diretto o un metodo indiretto. Nel **metodo diretto** tutti gli ingredienti sono

miscelati contemporaneamente per formare l'impasto, che viene poi lasciato lievitare. La lievitazione deve essere comunque condotta in almeno 2 fasi. La prima fermentazione, denominata "puntata", è generalmente effettuata su masse consistenti di impasto per tempi variabili a seconda del processo. L'obiettivo di questa operazione non è ottenere l'aumento di volume della massa bensì quello di indurre importanti modificazioni delle proprietà reologiche dell'impasto. In particolare la produzione di CO₂, promuovendo l'acidificazione del sistema, rende il glutine più tenace. La lievitazione finale o "appretto" viene condotta sulla massa di impasto della pezzatura finale ed è mantenuta per circa 1 ora in condizioni controllate di temperatura e umidità al fine di raggiungere il massimo sviluppo in volume. Nel **metodo indiretto** gli ingredienti sono aggiunti in più riprese, durante i cosiddetti *rinfreschi* dell'impasto. All'interno di questo gruppo è possibile fare un'ulteriore distinzione tra il metodo con "biga" e il metodo con "madre acida". Il metodo con "biga" prevede la formazione di un impasto preparatorio (detto appunto "biga"), ottenuto miscelando parte del lievito compresso, della farina e dell'acqua prevista dalla formulazione, che si lascia riposare per un periodo di tempo prestabilito (da 10 a 20 ore) in funzione della tipologia di pane che si vuole ottenere; al termine del riposo si uniscono le restanti parti di farina, lievito, acqua ed eventuali altri ingredienti. Durante la lunga sosta, definita "maturazione", il lievito ha la possibilità di adattarsi al sistema impasto che potrà così raggiungere capacità fermentative ottimali nel momento in cui tutti gli ingredienti saranno stati aggiunti. L'impasto finale, generalmente dopo 30-60 minuti di lievitazione, è tagliato, modellato, ancora lasciato lievitare per circa un'ora e mezza ed infine cotto.

Nel caso della panificazione con "madre acida" il pre-impasto è rappresentato da una parte di impasto derivante da una lavorazione precedente ("madre"), opportunamente fermentato e conservato in ambiente refrigerato. Nell'impasto sono presenti, oltre ai *Saccharomyces*, alcuni batteri, prevalentemente lattobacilli omofermentanti ed etero fermentanti. Generalmente si opera per rinfreschi successivi, seguiti ciascuno da una fase di lievitazione dell'impasto. Ognuno di questi rinfreschi consente l'aumento della massa lievitante e delle sue capacità fermentative.

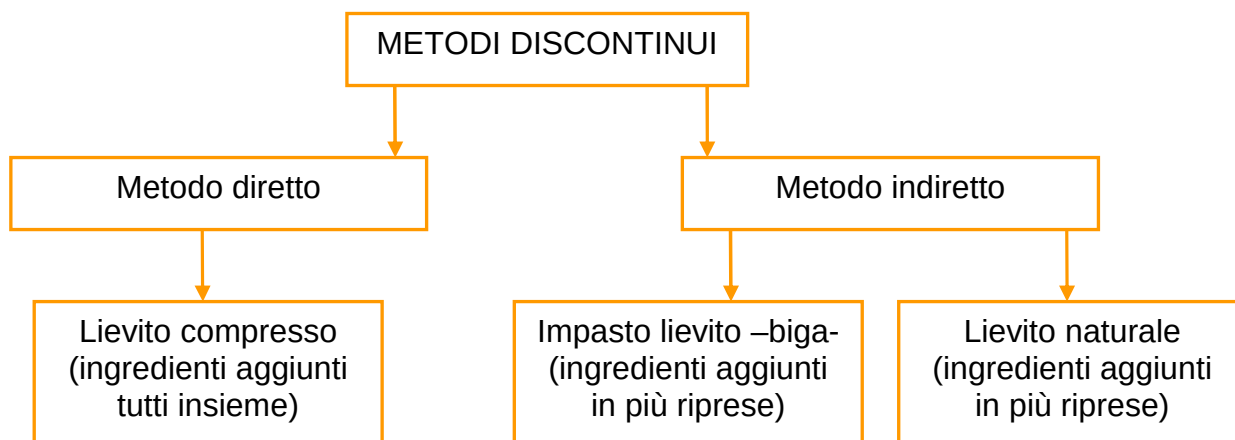


Fig. 1.2 Processi di panificazione: metodi discontinui.

I principali **processi continui** (processi Do-Maker e Amflow) prevedono la preparazione di un prefermento liquido costituito da zucchero, lievito, acqua, materiale nutritivo per i lieviti ed eventualmente una piccola percentuale di farina. Questa fase, durante la quale si ha lo sviluppo del lievito e la produzione degli aromi del pane, è seguita da una seconda fase di impastamento finale. Frequentemente alla lievitazione biologica viene affiancata una lievitazione di tipo fisico (metodo Chorleywood), ottenuta per inglobamento di aria in un impasto fluido, o per forte azione meccanica da parte delle impastatrici o per insufflamento di aria sotto pressione nell'impasto.

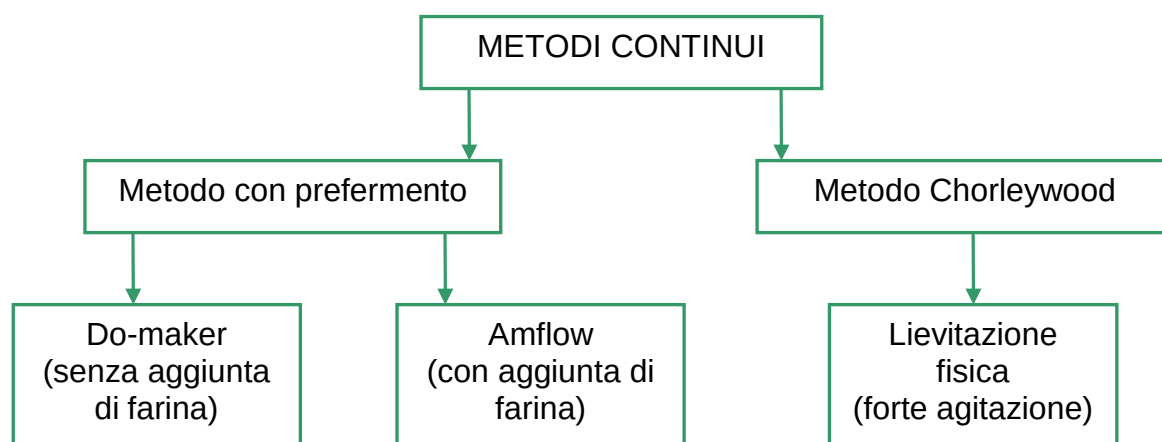


Fig. 1.3 Processi di panificazione: metodi continui.

1.2 INDICE GLICEMICO, DEFINIZIONE E RUOLO METABOLICO

La prevalenza di malattie cronico-degenerative (obesità, diabete, cancro, arteriosclerosi) è in rapido aumento nelle società industrializzate, soprattutto nei soggetti più giovani. Lo stile di vita, ed in particolare le abitudini alimentari, sembrano giocare un ruolo chiave nell'insorgenza di questi stati patologici. Recenti evidenze sperimentali sottolineano che gli stati di iperglicemia, ed i conseguenti stati di iperinsulinemia, possono costituire un fattore di rischio nello sviluppo di queste malattie, e che quindi il controllo del metabolismo glico-lipidico, sia post-prandiale sia a lungo termine, riveste un importante significato in termini preventivi e terapeutici (Ludwig, 2002).

È d'altra parte ormai dimostrato che la risposta glicemica post-prandiale non è solo funzione dei carboidrati presenti in un pasto ma dipende da un elevato numero di fattori in grado di modulare i processi di digestione e di assorbimento dei nutrienti, legati sia all'individuo sia all'alimento stesso (FAO/WHO, 1998).

Tutti i prodotti che contengono amido prevedono, nella loro preparazione, un trattamento termico in condizioni di umidità tali da promuoverne la gelatinizzazione (Holm., 1988), fenomeno che provoca la rottura degli ordini molecolari all'interno del granulo, ne determina il rigonfiamento e l'amido più facilmente attaccabile dall' α -amilasi (Ross., 1987).

La natura dell'amido (origine botanica), il suo grado di gelatinizzazione, il rapporto amilosio:amilopectina, le dimensioni delle particelle, la struttura tissutale e cellulare dell'alimento, la presenza di anti-nutrienti (ad azione inibitoria sugli enzimi digestivi), l'interazione con altri nutrienti sono tutti fattori che concorrono a determinare la risposta glicemica dell'alimento stesso (FAO/WHO, 1998).

È, ad esempio, a causa dell'alta organizzazione a livello strutturale che la pasta induce una modesta escursione glicemica dopo il suo consumo (Granfeldt e Bjork, 1991). Allo stesso modo, l'organizzazione cellulare e tissutale presente nei legumi determina una bassa risposta glicemica (Tovar., 1992), così come i prodotti da forno ottenuti con cereali interi hanno un impatto glicemico più contenuto dei corrispondenti prodotti preparati a partire da sfarinati (Liljberg., 1992).

Molti studi hanno valutato l'influenza di diversi processi tecnologici sulla digeribilità dell'amido: trattamenti quali la fiocatura e l'estrusione a caldo hanno dimostrato di poter incrementare la digeribilità dell'amido *in vitro*, per l'aumentata disgregazione dei granuli (Ross, 1987). Processi di produzione del riso, quali brillatura, istantaneizzazione e soffiatura, utilizzando temperature e pressioni progressivamente più elevate, hanno mostrato di provocare un più alto grado di gelatinizzazione e destrutturazione del chicco, aumentando così la digeribilità dell'amido (Brand., 1987; Wolever., 2003); altri trattamenti applicati al riso, quali parboiling o pilaf (cottura seguita da disidratazione in forno), sono invece risultati efficaci nel limitare la digeribilità dell'amido (Gatti *et al.*, 1987).

Data l'ampia tipologia di risposta glicemica che si osserva *in vivo* in seguito al consumo di svariati prodotti a base di carboidrati, si è cercato un parametro che potesse rendere possibile il confronto tra questi alimenti e la loro classificazione sulla base della "capacità glicemizzante", parametro dunque, indicativo della qualità dei carboidrati contenuti in un alimento. Questo parametro è stato identificato nell'Indice Glicemico (IG). Il concetto di IG è stato introdotto da Jenkins nel 1981 nel tentativo appunto di classificare gli alimenti in base alla risposta glicemica da essi indotta.

L'IG è definito quindi come il rapporto tra l'area incrementale sottesa dalla curva glicemica indotta da un alimento e l'analoga area ottenuta a seguito del consumo, in quantità isoglucidica (50g di carboidrati disponibili), di un alimento Standard (FAO/WHO, 1998), generalmente una soluzione di glucosio in acqua. Le prove vengono effettuate su un *panel* di 10 soggetti, a cui i pasti test e l'alimento Standard, accompagnati da almeno 500 mL di liquidi (acqua, tè o caffè), vengono somministrati in giorni diversi ed in ordine randomizzato, al mattino, dopo almeno 10-12 ore di digiuno. Per la valutazione dei livelli glicemici post-prandiali, ai tempi determinati, viene utilizzato sangue capillare (Wolever, 2003). Oggi è disponibile il valore di Indice Glicemico di numerosissimi alimenti; si parla di alimenti a basso indice glicemico per valori inferiori a 55, di medio IG per valori compresi tra 55 e 70 e di alto IG per valori superiori a 70. Valori di indice glicemico medio bassi sono stati osservati per il fruttosio (32), per i legumi (17-50), per la pasta (40-50), per il riso parboiled (50-70) per alcuni tipi di biscotti (frollini 35-50), per lo yogurt (27) (Foster-

Powell *et al.*, 2002); alti valori invece sono caratteristici della maggior parte dei cereali per la prima colazione (es. riso soffiato=123), del riso brillato (117) delle patate (al forno=121) (www.glycemicindex.com).

Evidenze sperimentali hanno messo in luce che diete a basso IG hanno un potenziale effetto preventivo e terapeutico non soltanto nei soggetti diabetici, in cui determinano prevalentemente un miglioramento della sensibilità all'insulina, con significative riduzioni dei valori di glicemia basale e di emoglobina glicosilata (Brand *et al.*, 1991; Jarvi *et al.*, 1999), ma anche nei soggetti con dislipidemia, e addirittura in quelli sani (Jenkins *et al.*, 1987), riducendo i livelli di colesterolo e trigliceridi ed aumentando la sensibilità all'insulina.

Inoltre recenti studi hanno evidenziato che i livelli insulinemici sono direttamente e significativamente correlati ai livelli plasmatici di proteina C-reattiva, marker dei processi infiammatori alla base dello sviluppo delle malattie cardiovascolari (Mather *et al.*, 2001).

Diete a basso indice glicemico si propongono dunque come un ottimo strumento nel combattere le malattie correlate alla sindrome metabolica, tanto che, recentemente, la FAO/WHO ha raccomandato di incentivare il consumo di alimenti a basso indice glicemico (FAO/WHO, 1998). È da sottolineare comunque che il significato principale di IG rimane quello di essere un indice di classificazione degli alimenti che permette la scelta di quelli in grado di migliorare il controllo glicemico, parametro quindi che sarebbe utile poter inserire nelle comuni tavole di composizione degli alimenti (Ludwig, 2002).

1.3 IL PANE E LA SUA RISPOSTA GLICEMICA

Il pane è un prodotto a media densità energetica, con alto contenuto in carboidrati. È una buona fonte di proteine, minerali, e vitamine del gruppo B. Nella maggior parte dei prodotti convenzionali, l'amido presente è rapidamente digerito ed assorbito, causando pertanto un alto IG (> 70).

Visto l'importante ruolo di diete a basso indice glicemico per il mantenimento dello stato di salute, e considerato il fatto che il pane è un prodotto comune nelle abitudini alimentari dei diversi paesi ed è consumato in quantità discrete all'interno della dieta, risulta evidente l'importanza della messa a punto di formulazioni di pani a basso indice glicemico.

Recentemente sono state pubblicate delle tabelle relative ai valori di IG di diversi prodotti alimentari (Foster-Powell *et al.*, 2002); su un totale di circa 800 IG riportati, circa 100 si riferiscono al prodotto pane con valori molto diversi tra loro e variabili in un intervallo compreso tra 30 e 95. I valori più bassi di IG si riferiscono proprio a formulazioni particolari opportunamente studiate al fine di ridurre questo parametro.

Esistono diverse strategie per abbassare l'indice glicemico del pane tra cui l'utilizzo di cereali interi (*kernel*) e/o farine di cereali diversi dal frumento quali ad esempio la segale, orzo o avena, l'arricchimento in fibra solubile, l'impiego di amido resistente o l'aggiunta di amilosio nella formulazione.

Nello studio di Cavallero (2002), sono state valutate le risposte glicemiche di quattro tipologie di pane preparate con farina di frumento integrata con fibra d'orzo mediante l'impiego di sola farina integrale d'orzo o di frazioni di essa arricchite con β -glucani. La riduzione di IG, rispetto al pane comune di frumento, rilevata per tali prodotti è risultata proporzionale alla diverse quantità di β -glucani presenti nel pane; lo studio ha messo in evidenza che una dose di circa 6 g/100 g di pane è in grado di indurre riduzioni significative di IG.

Alcuni autori (Hoebler *et al.*, 1999) hanno valutato, nella formulazione dei pani, l'effetto dell'impiego di farine arricchite con amilosio, sui conseguenti valori di IG del prodotto. In questa indagine la sostituzione di una parte di farina di frumento con

amido di mais ad alto tenore di amilosio ha comportato significative riduzioni del valore di IG del prodotto test rispetto al pane comune (– 40%).

In un recente lavoro Ostman *et al.* (2006), dimostrano come sia possibile ridurre di circa il 50% l'indice glicemico del pane utilizzando contemporaneamente diversi approcci tecnologici, quali l'impiego di cariossidi intere di segale trattate con vapore, farina di segale tostata, concentrato di fibra di avena (17% β -glucani), nonché la lievitazione mediante impasto acido.

In molti dei pani studiati nei lavori considerati, l'impiego della lievitazione naturale appare come una necessità tecnologica, poiché l'acidificazione dell'impasto è necessaria al fine di rendere panificabili i diversi tipi di sfarinati impiegati.

In alcuni studi tuttavia si suggerisce che l'impatto ipoglicemizzante dei pani ottenuti mediante impasti acidi, rispetto al pane comune, sia attribuibile, almeno in parte, ad un effetto degli acidi organici volatili formatisi durante il processo di lievitazione. Alcune prove sperimentali (Liljeberg *et al.*, 1995, 1996), infatti, suggeriscono che il consumo di pane, preparato a partire da miscele di farina di orzo e frumento, contenente acido lattico (sia prodotto mediante lievitazione naturale, sia aggiunto) è in grado di ridurre significativamente la glicemia e l'insulinemia post-prandiale nei soggetti sani. Altri studi condotti su porridge d'orzo fermentato con batteri lattici o addizionato delle due forme isomeriche di acido lattico a confronto con un pane di riferimento indicano che, indipendentemente dall'isomero considerato, questo acido non sarebbe di per sé in grado di modulare le risposte glicemiche ed insulinemiche post-prandiali. Sulla base di questi risultati, ottenuti in alimenti in cui non è presente una struttura glutinica analoga a quella del pane, gli autori suggeriscono che l'effetto ipoglicemizzante dell'acido lattico nel pane sia conseguente a interazioni tra amido e glutine indotte dall'acido a livello microstrutturale, in grado di ridurre la digeribilità dell'amido. Queste interazioni inoltre verrebbero a stabilirsi solo durante il trattamento termico (cottura) dell'impasto in presenza di acido lattico (Ostman *et al.*, 2002).

Infine, nello studio di Marangoni e Poli (2007), sono state valutate le risposte glicemiche di due tipologie di pane preparate con farina di frumento e con farina di frumento integrata con un mix di fibre. La prova è stata condotta su 15 volontari in

buono stato di salute e non diabetici che hanno mangiato in diversi giorni una porzione equivalente a 75 g di carboidrati disponibili di entrambe le tipologie di pane. Dall'analisi delle curve glicemiche è emerso che il pane ottenuto con farina arricchita di fibre porta ad una riduzione dell'indice glicemico del 21%.

2. SCOPO DEL LAVORO

L'esigenza aziendale di creare un nuovo prodotto con proprietà salutistiche nasce dalla maggiore consapevolezza del legame esistente tra dieta e salute: il pane, alimento consumato in quantità rilevanti all'interno della dieta Italiana, è caratterizzato da alti valori di indice glicemico ($IG > 70$), dovuti alla sua struttura alveolata ed all'elevata digeribilità dell'amido in esso presente. D'altra parte, è stato dimostrato che diete a medio-basso indice glicemico ($IG < 70$) possono determinare effetti positivi per la prevenzione di malattie cronico-degenerative (obesità, diabete, ecc.).

Lo scopo del presente lavoro è quindi quello di studiare e mettere a punto una nuova tipologia di pane, caratterizzata da basso indice glicemico; per la sua realizzazione sarà usata una farina di grano tenero alla quale è stata aggiunta una miscela di fibre di diversa natura, potenzialmente in grado di rallentare l'azione di idrolisi enzimatica a carico dell'amido. La letteratura più recente mostra come questa caratteristica sia tipica della fibra solubile che favorisce la formazione di un sistema molto viscoso in grado di modulare la risposta glicemica. Per ragioni commerciali e di riservatezza, l'Azienda non ha potuto fornire i rapporti percentuali delle diverse frazioni di fibre solubili utilizzate per formare la miscela "Frenata", ma ne dichiara la percentuale complessiva, superiore al 60% sul totale della fibra.

Nel corso del presente lavoro sarà effettuata in primo luogo la caratterizzazione della farina con e senza aggiunta di fibre, attraverso test reologici (alveografo, farinografo, viscoamilografo, reofermentometro) in grado di prevedere il comportamento effettivo in lavorazione, performance che verrà poi controllata e monitorata durante un reale processo produttivo, per valutare la necessità o meno di variare alcuni parametri di processo.

I prodotti finiti verranno quindi confrontati mediante numerosi indici fisici e chimici, sia subito dopo cottura che in conservazione fino a 48 ore. L'impatto glicemico con prove *in vivo* sarà, infine, determinato su un gruppo di 10 volontari sani.

3. MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALI

I pani realizzati nel corso della sperimentazione sono stati prodotti presso un copeker dell'Azienda Panem Italia S.p.A. di Muggiò (MB).

3.1.1 Presentazione dell'Azienda

Cenni storici

L'Azienda nasce il primo giugno 1969 da un'intuizione del sig. Magnani e rimane per due decenni nelle mani della stessa proprietà. Nel 1989, Buralli, Centrale del Pane, Giannotti e Panem, aziende che operavano rispettivamente in Toscana, Piemonte e Lombardia, vengono acquisite dal gruppo Barilla che inizia l'opera di accorpamento delle principali funzioni aziendali. I marchi convivono sino al 1994, anno in cui avviene la fusione societaria e l'unificazione sotto l'unico marchio Panem. Da allora, gli stabilimenti di Muggiò (MB), San Mauro Torinese (TO) e Altopascio (LU) sono stati sottoposti ad una serie di operazioni di ammodernamento, soprattutto per quanto riguarda gli impianti.

Nell'ottobre 2003 si è costituita la nuova società Panem Italia S.p.A. controllata da Industria e Finanza SGR S.p.A., che detiene il 99,4% del pacchetto azionario.

Recentemente lo stabilimento di San Mauro Torinese (TO) è uscito dalla società.

Oggi Panem Italia S.p.A. è la più importante realtà presente nel mercato italiano del pane fresco industriale e dei sostitutivi del pane.

La struttura dello stabilimento di Muggiò

Lo stabilimento di Muggiò (dove si trova la sede della Società) copre una superficie di 27000 m², di cui 12000 m² sono coperti.

La struttura si compone di due edifici: uno, di più recente costruzione, comprende gli uffici e il reparto di produzione di pizze e focacce; nel secondo edificio si trovano il reparto di produzione di tutte le tipologie di pane fresco e i laboratori di Ricerca e Sviluppo e Assicurazione Qualità; in questo edificio sono inoltre presenti gli uffici di un'azienda esterna che si occupa della distribuzione dei prodotti Panem.

Nell'area esterna sono presenti 16 silos di cui 3 a grano duro e i rimanenti a grano tenero, per una capacità totale di 90 t di semola di grano duro e di circa 400 t di farina di grano tenero.

La capacità produttiva dello stabilimento, che si compone di 7 linee produttive, è di 1200 quintali di pane fresco alla settimana ripartiti in 500 quintali al giorno dalla domenica al mercoledì e 700 quintali al giorno il giovedì e il venerdì.

La forza lavoro, nel complesso, è costituita da circa 200 persone.



Fig. 3.1 Azienda Panem: fotografia relativa allo stabilimento di Muggiò.

La rete di vendita

I clienti di Panem Italia S.p.A. sono la quasi totalità della distribuzione organizzata (DO) e i più grandi gruppi della ristorazione collettiva del Centro-Nord Italia.

Il Sud del Paese è escluso perché la distribuzione di pane fresco non può avvenire a distanze superiori a 300 km dal luogo di produzione (distanza massima percorribile in una notte), pena uno scadimento della qualità del prodotto che andrebbe contro l'interesse dell'azienda e del consumatore.

Panem Italia S.p.A., valendosi di 12 depositi periferici, di 20 autotreni e 250 furgoni per il trasporto, effettua circa 5000 consegne di pane fresco ogni mattina, prima che i clienti aprano i punti vendita, a 18 ore dal ricevimento della conferma dell'ordine.

Dai dati del 2008 emerge che la produzione annuale dei tre stabilimenti è stata di 332 mila quintali suddivisi in:

- 218 mila quintali nello stabilimento di Muggiò;
- 78 mila quintali nello stabilimento di Altopascio;
- 36 mila quintali nello stabilimento di San Mauro Torinese.

I prodotti

Panem Italia S.p.A. produce circa 150 referenze, così suddivise:

- pani di pezzatura medio-grande, superiori a 500 g, (Ciambella di semola, Girasole, Lingua francese, ecc.);
- pani di piccola pezzatura, inferiori a 100 g, (Sfilatino, Francesino, Maggiolino, ecc.);
- pani affettati;
- pizze e focacce fresche;
- mini brioche;
- piadine;
- pani regionali (tipo Pugliese, Siciliano, Toscano, ecc.);
- pani etnici (Arabo).

Nel presente lavoro si è confrontata una tipologia di pane ottenuta da una farina di base tipo 00, denominata farina Standard, con un prodotto formulato con la stessa

tipologia di farina di base ma arricchita con una miscela di fibre di diversa natura (aggiunte dal 10 al 15%) di cui almeno il 60% appartenente alla frazione solubile. Tale farina, denominata farina "Frenata", è stata recentemente brevettata. Le caratteristiche tecnologiche e merceologiche della farina di base sono riportate in Figura 3.2.

SCHEDA TECNICA

"FARINA DI GRANO TENERO
TIPO 00 PER PANIFICAZIONE "

DESCRIZIONE

Prodotto ottenuto dalla macinazione e dall'abburattamento di una miscela di grani teneri liberati dalle sostanze estranee dalle impurità e conforme alla legge 580 del 04.07.67 e successive modifiche. La miscela può contenere al massimo il 20% di grano tenero raccolto da meno di due mesi. L'imballo è conforme al D.L. 21.03.73 e successivi. Il mulino adotta il sistema di autocontrollo (metodo HACCP) come previsto dal D.Legge 155 del 26.06.97 in attuazione delle direttive 93/43 CEE sull'igiene dei prodotti alimentari ed è certificata da DNV secondo la Norma UNI EN ISO 9001-2000.
Il prodotto contiene l'allergene "glutine".

CARATTERISTICHE CHIMICHE

Umidità %	Ceneri % SS	Proteine % SS	FN
NIR	UNI ISO 2171/B	NIR	ISO 3093
15,10	0,58	11,20	280 sec. min

CARATTERISTICHE ALVEOGRAFICHE
ISO 5530 - 4

W	P/L
207,00	0,58

CARATTERISTICHE FARINOGRAFICHE
ISO 5530 - 1

Assorbimento %	Stabilità
55,70	6'

FILTH TEST
(RICERCA DI FRAMMENTINI INSETTI E DI CORPI ESTRANEI)
dm. 23.07.94
Frammenti di insetti in 50 gr. farina max. 25

CARICA BATTERICA TOTALE	< 100000	U.F.C./G.	UNI ISO 4833/88
MUFFE E LIEVITI	< 2000	U.F.C./G.	ISO 7698/90
COLIFORMI TOTALI	< 500	U.F.C./G.	AOAC 988 19/95

RESIDUI DI ANTIPARASSITARI
Nei limiti di legge (D.M. 27.08.004 e successive modifiche)

AFLATOSSINE B1,B2,G1,G2	< 4 ppb
AFLATOSSINA B1	< 2 ppb
OCRATOSSINA A	< 3 ppb
DON	< 750 ppb
CD	< 0,1 ppm
PB	< 0,2 ppm

Fig. 3.2 Caratteristiche tecnologiche e merceologiche della farina di base.

Gli ingredienti impiegati per la produzione dei pani e le quantità utilizzate sono riportate in Tabella 3.1.

Tabella 3.1 Formulazioni utilizzate per la produzione dei pani. Le quantità sono espresse in chilogrammi (kg) e in percentuale rispetto allo sfarinato (%).

ingredienti	pane prodotto con farina Standard		pane prodotto con farina "Frenata"	
	(kg)	(%)	(kg)	(%)
farina Standard	25	100	-	-
farina "Frenata"	-	-	25	100
acqua	15	60	17	68
lievito	1	4	1	4
sale	0,5	2	0,5	2
miglioratore*	0,25	1	0,25	1

* il miglioratore è composto da alfa amilasi, acido ascorbico e farina di cereali maltati.

Tutti gli ingredienti sono stati aggiunti contemporaneamente come previsto nel metodo di panificazione diretto e secondo il flow-sheet riportato in Figura 3.3, in tale figura sono inoltre riportate le condizioni operative utilizzate per la produzione dei pani.

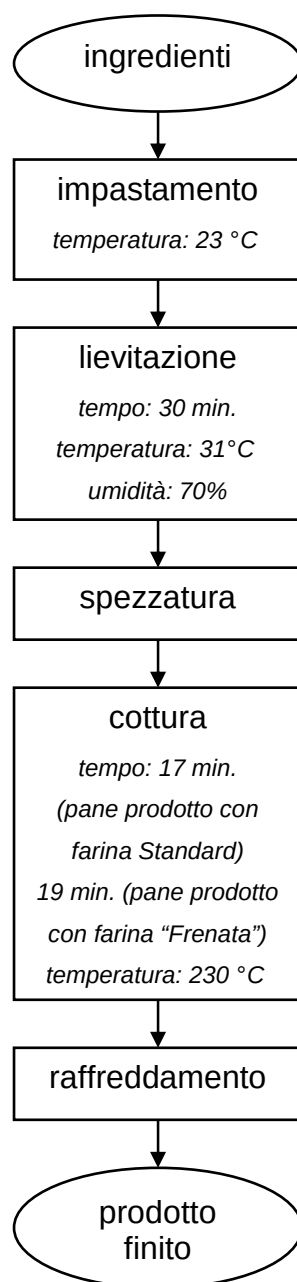


Fig. 3.3 Processo di panificazione e condizioni operative relative alla produzione delle due tipologie di pani: pane prodotto con farina Standard e pane prodotto con farina "Frenata".

Le fasi di impastamento sono caratterizzate da una prima fase nella quale le materie prime sono poste nella vasca impastatrice e miscelate a bassa velocità per un

tempo sufficiente per incorporare gli ingredienti. Durante la seconda fase, la velocità di impastamento viene aumentata e mantenuta per il tempo necessario allo sviluppo di un impasto omogeneo, solido e viscoelastico.

A fine impastamento gli impasti sono recuperati dalla vasca e sono spezzati mediante una macchina spezza-ciabatta in modo da ottenere panini cotti tipo bocconcino. I “bocconcini” vengono quindi messi a lievitare in cella di lievitazione (31° C, 70% di umidità) per un tempo pari a 30 minuti. Al termine della fase di lievitazione, i pani sono messi in forno per la cottura, che avviene a circa 330° C per un tempo variabile a seconda della tipologia di farina usata (19 minuti per il pane prodotto con farina Standard e 17 minuti per il pane prodotto con farina “Frenata”).

A fine cottura i pani sono stati lasciati raffreddare a temperatura ambiente ed infine sono stati portati in laboratorio dove sono state effettuate le analisi fisiche quali peso e volume specifico. Altri pani invece, dopo il raffreddamento, sono stati congelati in freezer (T= -18° C), e mantenuti in sacchetti di plastica chiusi.

In dipendenza del tipo di analisi, alcuni pani, sono stati scongelati (1 notte a 4° C) e omogeneizzati, altri campioni di pane invece, destinati al consumo nelle prove *in vivo*, sono stati scongelati (1 notte in cella a 4° C), porzionati, ed infine riscaldati (in stufa, 100° C per qualche minuto) per ripristinare la fragranza e la palatabilità, aspetti fondamentali per simulare al meglio le reali situazioni di consumo.

Le valutazioni fisiche quali il test di compressione e l'analisi dell'immagine per le misurazioni dell'alveolatura sono state invece condotte su campioni di pane scongelati e mantenuti a 23° C per tutta la durata dei test.

3.2 METODI

3.2.1 Analisi sulla farina

Sui campioni di farina sono state effettuate le seguenti analisi:

- umidità;
- ceneri;
- proteine;
- amido totale;
- amido danneggiato;
- fibra solubile e insolubile;
- misure di light scattering e separazione in SE-HPLC;
- analisi farinografica;
- analisi alveografica;
- analisi viscoamilografica;
- analisi reofermentografica;
- consistometro Bostwick;
- colore.

Analisi chimiche

Umidità

Il contenuto di umidità della farina è stato determinato mediante l'impiego di una Termobilancia Sartorius, modello MA 100C, nelle condizioni proposte dal metodo ISO 712 (1993).

Per la prova si pesano 3 grammi di farina in un piattino metallico, si lasciano essiccare nella Termobilancia per 5 minuti a 150° C fino a raggiungere il peso costante. La percentuale di umidità viene direttamente letta sullo schermo dell'apparecchio.

Ceneri

Il contenuto in ceneri è stato determinato per differenza di peso dopo una notte di incenerimento in muffola a 550° C, seguendo le condizioni proposte dal Metodo Ufficiale (D.M.21/07/1967).

Proteine

La determinazione del contenuto complessivo di azoto proteico è stata fatta seguendo il metodo Kjeldahl (AOAC n° 925.31, 1995), utilizzando il fattore 5.7 per conversione azoto/proteine

Amido totale

La determinazione del contenuto in amido totale dei campioni è stata condotta secondo il metodo proposto da McCleary, Gibson e Solah (1994), utilizzando il kit enzimatico distribuito dalla Megazyme International Ireland Ltd. (Bray Business Park, Bray, Co Wicklow, Ireland), in conformità alle metodiche ufficiali AOAC n° 996.11 e AACC n° 76-13.

Il metodo si basa sulla proprietà dell'amido ad essere facilmente idrolizzato a glucosio per azione dell'amiloglucosidasi, dopo aver subito una completa solubilizzazione per effetto di un trattamento a 100° C in presenza di α -amilasi termostabile.

Si pesano con precisione e accuratezza 100 mg di campione in provette di vetro da 10 mL e si aggiungono 0.2 mL di una soluzione acquosa di etanolo (80% v/v) per consentire una migliore dispersione del campione. Si aggiungono 2 mL di dimetilsolfossido (DMSO) per favorire la gelatinizzazione dell'amido, quindi le provette vengono agitate su vortex e mantenute ad ebollizione per 5 minuti. Ai campioni così pretrattati, vengono aggiunti 3 mL di una soluzione di α -amilasi (3000 U/mL) termostabile. Dopo vigorosa agitazione, le provette vengono incubate per 6 minuti a 100° C, avendo cura di agitarle dopo 2 e 4 minuti al fine di evitare la formazione di filamenti gelatinosi. Trascorso tale tempo, i campioni vengono addizionati di 4 mL di tampone sodio acetato (200 mM, pH 4.5) e quindi trasferiti in bagno termostato a 50° C. Si procede all'aggiunta di 0.1 mL di amiloglucosidasi

(200 U/mL) e si lascia incubare a 50° C per 30 minuti. Al termine dell'incubazione, il contenuto delle provette è trasferito quantitativamente in matracci da 100 mL e portato a volume con acqua distillata. Dopo aver miscelato, si prelevano 10 mL di questa soluzione e si centrifugano a 3000 rpm (1000 g) per 10 minuti. Successivamente 0.1 mL di surnatante, in doppio, vengono prelevati e trasferiti in provette da 5 mL, dove vengono addizionati 3 mL di una soluzione contenente glucosio ossidasi (12000 U/mL) e perossidasi (650 U/mL) (GOPOD). Dopo agitazione, le provette vengono incubate a 50° C per 20 minuti; nelle stesse condizioni vengono incubati anche il bianco, preparato con 0.1 mL di acqua distillata e 3 mL di GOPOD, e una soluzione Standard costituita da 3 mL di GOPOD e 0.1 mL di una soluzione Standard di glucosio (1 mg/mL).

Al termine dell'incubazione, le provette si fanno raffreddare e si procede poi alla valutazione dell'assorbanza a 510 nm (UV/VIS Spectrometer-PERKINELMER) dei campioni, del bianco e dello Standard.

La percentuale di amido totale è ricavata mediante la seguente formula:

$$\text{Amido totale (\%)} = \Delta A \times F \times 1000 \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} = \Delta A \times \frac{F}{W} \times 90$$

dove:

$$\Delta A = A_{\text{campione}} - A_{\text{bianco}}$$

$$F = 100 \text{ (}\mu\text{g glucosio)/}A \text{ (di } 100 \mu\text{g di glucosio)} = 100 \mu\text{g glucosio} / (A_{\text{Standard}} - A_{\text{bianco}})$$

$$\frac{1}{1000} = \text{fattore di conversione da } \mu\text{g a mg}$$

$$\frac{100}{W} = \text{fattore per esprimere l'amido come percentuale sul peso della farina}$$

$$W = \text{peso del campione tal quale (mg)}$$

$$162 = \text{PM del glucosio nel polimero amido}$$

$$180 = \text{PM del glucosio libero.}$$

Amido danneggiato

Il tenore di amido danneggiato è stato determinato secondo la procedura proposta da Gibson (1992), utilizzando il kit enzimatico distribuito dalla Megazyme International Ireland Ltd. (Bray Business Park, Bray, Co Wicklow, Ireland), che si basa sulle metodiche ufficiali ICC n°164 e AACC n°76-31.

La tecnica sfrutta una caratteristica tipica dei granuli d'amido danneggiati, ossia l'aumentata suscettibilità all'idrolisi e quindi al rapido rilascio di maltosaccaridi e α -destrine. Tale idrolisi avviene in condizioni controllate, con α -amilasi fungina purificata; in queste condizioni l'enzima non è in grado di modificare i granuli di amido integri.

Gli oligosaccaridi formati dai granuli danneggiati sono trattati poi con amiloglucosidasi purificata, la quale permette di ottenere una completa degradazione delle destrine in glucosio, il cui dosaggio è effettuato con l'uso di enzimi ossidativi ad elevato grado di purezza.

Si pesano con precisione e accuratezza 100 mg di campione, in doppio, in provette di vetro da 10 mL che poi vengono poste in bagno termostato a 40°C per 5 minuti; si aggiunge 1 mL di una soluzione di α -amilasi fungina (50 U/mL) in tampone sodio acetato (100 mM, pH 5.0), anch'essa pre-equilibrata a 40°C per 5 minuti. Dopo agitazione con vortex si lascia incubare per 10 minuti esatti dall'aggiunta dell'enzima. Al termine di questo tempo si aggiungono 5 mL di acido solforico (0.2% v/v) e si filtra il contenuto della provetta su filtro in carta di vetro Whatman GF/A in provette da 10 mL.

Aliquote di 100 μ L di filtrato vengono trasferite, in doppio, in provette da 5 mL ed addizionate di 100 μ L di una soluzione di amiloglucosidasi (20 U/mL) in tampone sodio acetato (100 mM, pH 5.0); il tutto viene incubato per altri 10 minuti a 40°C. Allo scadere di tale tempo si aggiungono 4 mL di una soluzione contenente glucosio ossidasi (12000 U/mL) e perossidasi (650 U/mL) (GOPOD), si agita e si fa proseguire l'incubazione per altri 20 minuti, sempre a 40°C.

Al termine dell'incubazione, si fanno raffreddare le provette e si valuta l'assorbanza, per via spettrofotometrica a 510 nm (UV/VIS Spectrometer-PERKINELMER) dei campioni, del bianco, ottenuto aggiungendo 4 mL di GOPOD a 0.2 mL di tampone

acetato (100 mM pH 5.0), e dello Standard, ottenuto aggiungendo a 0.1 mL di soluzione Standard di glucosio (150 µg/0.1 mL in acido benzoico 0.2%) e 0.1 mL di tampone acetato, 4 mL di GOPOD.

La percentuale di amido danneggiato viene ricavata mediante la seguente formula:

$$\text{Amido danneggiato (\%)} = \frac{\Delta A \times F \times 60 \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180}}$$

dove:

$$\Delta A = A_{\text{campione}} - A_{\text{bianco}}$$

$$F = 150 \text{ (}\mu\text{g glucosio)} / A \text{ (di 150 } \mu\text{g di glucosio)} = 150 \text{ } \mu\text{g glucosio} / (A_{\text{Standard}} - A_{\text{bianco}})$$

60 = fattore di diluizione

$$\frac{1}{1000} = \text{conversione da } \mu\text{g a mg}$$

$$\frac{100}{W} = \text{fattore per esprimere l'amido come percentuale sul peso della farina}$$

W = peso del campione (mg)

162 = PM del glucosio nel polimero amido

180 = PM del glucosio libero.

Fibra solubile e insolubile

La determinazione della fibra solubile e insolubile è stata fatta seguendo la metodica di Prosky *et al.*, 1998.

Misure di light scattering e separazione in SE-HPLC

La caratterizzazione della frazione solubile è stata effettuata tramite un sistema in serie composto da una colonna cromatografica di gel permeazione (Ultrahydrogel™ Linear 7.8 x 300 mm Column - Waters Co., Milford Massachusetts), un detector ad assorbanza (Dual absorbance detector 2487, Waters Co.), un Multi Angle Light

Scattering (DAWN HELEOS, Wyatt Co.) ed un detector a indice di rifrazione (Differential Refrattometer Model 201, Waters Co.).

Il tampone di corsa (sodio acetato 50 mM, NaCl 100 mM, pH 4.5) è stato filtrato attraverso membrane dotate di pori di 0.22 μm di diametro e degasato ed il flusso è stato mantenuto a 0,4 ml/min mediante pompa HPLC (515 HPLC pump, Waters Co.). Circa esattamente 0.5 g di campione sono stati sottoposti ad estrazione con 5 ml di tampone di corsa. Le sospensioni sono state mantenute sotto agitazione per 2,5 ore e per 24 ore a 4°C per vedere se c'era una variazione del profilo di eluizione dovuto all'azione di enzimi endogeni. Un'aliquota dei campioni è stata quindi centrifugata a 13000 rpm per 13 minuti. Il surnatante è stato filtrato con membrane da 0.22 μm di diametro e 200 μl sono stati iniettati nel sistema. Gli standard sono stati preparati sciogliendo circa 3 mg/ml nel tampone di corsa, centrifugati e filtrati.

Per ogni analisi sono stati raccolti gli output relativi al Light Scattering e al rifrattometro per tutta la durata della corsa cromatografica (generalmente 1h) tramite software ASTRA V 5.1.9.1 (Wyatt technology Co., 2004). Tramite lo stesso software si è proceduto all'analisi dei cromatogrammi calcolando il peso molecolare dei picchi d'interesse.

Analisi reologiche

Analisi farinografica

Il test farinografico è stato condotto utilizzando il Farinografo Brabender, nelle condizioni proposte dal metodo ISO 5530- 1. Il farinografo è un dinamometro in grado di misurare, e riprodurre in forma grafica, la resistenza che l'impasto oppone ad una sollecitazione meccanica costante condotta in condizioni operative Standard. Il farinografo tradizionale (Figura 3.4) è formato da un'impastatrice (1), in cui sono presenti due pale che ruotano in senso opposto e a velocità differenti, da un motore a dinamo (2) collegato ad una libera sospensione (3), in modo che la maggiore o minore resistenza dell'impasto si trasmetta dall'impastatrice alla dinamo, e da un sistema di leve (4) attraverso il quale i movimenti, ammortizzati dall'olio contenuto nel cilindro (5), si trasmettono all'indice di una bilancia (6) ad a un registratore (7) ad

esso collegato, che traccia la resistenza dell'impasto alla sollecitazione. L'olio, il cilindro e l'impastatrice sono termoregolati da un termostato (8), attraverso un sistema a circolazione d'acqua (9).

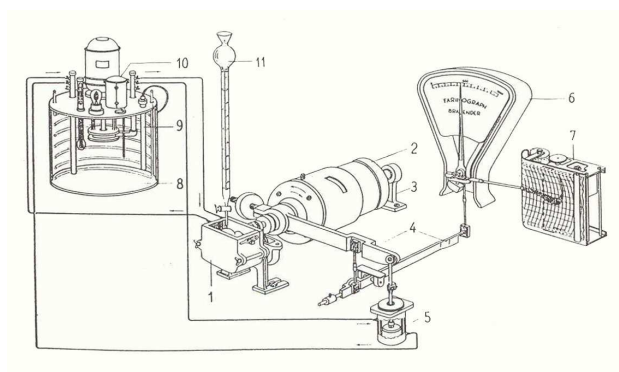


Fig. 3.4 Rappresentazione schematica di un farinografo tradizionale

Il test tradizionale viene condotto su una massa di campione pari a 300 g di farina al 14% di umidità; la temperatura dell'impastatrice e dell'acqua distillata deve essere di 30° C; la velocità di rotazione della pala più lenta deve essere di 63 giri/min e quella della pala più veloce di 92 giri/min; il tempo di smorzamento, misurato nel campo da 1000 a 100 Unità Brabender (UB) e con il dinamometro in funzione, deve essere di un secondo.

Il test farinografico Standard consiste di due prove: la prova di assorbimento (o "titolazione" della farina) e la registrazione del farinogramma vero e proprio.

Per la prima prova (Figura 3.5 A), si portano 300 g di farina nell'impastatrice. Si avvia lo strumento e, mediante un'apposita buretta (11) si aggiunge acqua (velocemente fino al 45% e poi goccia a goccia) fino a che si ottiene un impasto con consistenza ottimale, pari a 500 Unità Brabender (UB). La quantità di acqua utilizzata si esprime in percentuale e rappresenta il primo risultato del test: la capacità di assorbimento d'acqua (%) della farina, proprietà correlata positivamente alla quantità di proteine e negativamente all'amido danneggiato in essa presenti. Tale parametro è in grado di fornire indicazioni sulla "resa in impasto" della farina: la maggiore percentuale d'acqua

assorbita significa una maggiore resa d'impasto e, quindi, un maggior valore commerciale della farina in questione.

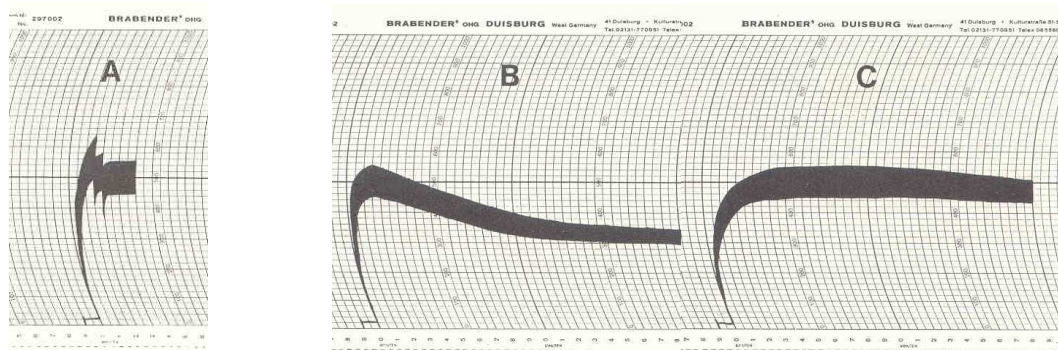


Fig. 3.5 (A) Fase di titolazione di un impasto; (B) Tracciato farinografico di una farina di frumento debole; (C) Tracciato farinografico di una farina di frumento forte.

Per la seconda parte del test, la registrazione del tracciato, si pongono 300 g di farina nell'impastatrice e, dopo aver avviato lo strumento, si aggiunge in una sola volta il quantitativo d'acqua determinato con la prova di assorbimento. L'impasto viene quindi lavorato per un tempo prefissato di 20 minuti e si ottiene un tracciato, detto farinogramma (Figura 3.5 B e C), che riporta in ascisse il tempo espresso in minuti e in ordinate, in una scala variabile da 0 a 1000 UB, la consistenza dell'impasto.

Da tale tracciato si ricavano importanti parametri utili a definire la "forza" della farina:

- **Tempo di sviluppo (min):** è il tempo necessario all'impasto per raggiungere la consistenza di 500 UB (il grafico deve essere centrato sulle 500 UB in corrispondenza del picco massimo della curva); cioè, il tempo necessario affinché la farina possa assorbire l'acqua e formare un impasto ben strutturato e dalla consistenza prefissata;
- **Stabilità (min):** è indicata dall'intervallo di tempo in cui la parte superiore della banda rimane sopra le 500 UB (dato dall'intersezione della curva in ascesa e in discesa con la linea delle 500 UB); cioè, il periodo di tempo in cui l'impasto, dopo aver raggiunto la consistenza ottimale, sebbene continuamente lavorato, mantiene

tale condizione. È la resistenza offerta dall'impasto alla continua sollecitazione meccanica. Tempi lunghi corrispondono a caratteristiche di forza della maglia proteica che assicura all'impasto un'elevata resistenza alla lavorazione;

- Grado di rammollimento o Caduta (UB): è dato dalla distanza tra il centro della curva e la linea della 500 UB dopo un certo intervallo di tempo (dopo 10 minuti dall'inizio del test o dopo 12 minuti dal massimo sviluppo della curva); esprime la perdita di consistenza dell'impasto dopo un intervallo di tempo prefissato: tale indice risulta tanto più contenuto quanto più forte è la farina;
- Elasticità (mm): è data dall'ampiezza della banda del tracciato al massimo dello sviluppo. Quanto più larga è la banda, tanto maggiore è l'elasticità dell'impasto.

Analisi alveografica

Il test alveografico viene condotto nelle condizioni proposte dal metodo ISO 5530- 4, utilizzando l'Alveografo Chopin (Figura 3.6).

Con questo test viene valutata la resistenza che un impasto oppone ad una sollecitazione costante (rigonfiamento) esercitata da un circuito pneumatico.

La prova viene condotta su 250 g di farina, posta nell'impastatrice termoregolata a 22°C, alla quale viene aggiunta una soluzione al 2,5% di cloruro di sodio in quantità proporzionale all'umidità della farina, in modo che l'impasto ottenuto abbia un'umidità costante del 48%.

Si procede quindi all'esecuzione della prova: si impasta per un minuto, si arresta la macchina e si recuperano le particelle rimaste aderenti alle pareti della vasca impastatrice, si riavvia la macchina e si impasta per altri 6 minuti. L'impasto viene quindi estruso e se ne ricavano cinque dischi posti in una camera di riposo per 20 minuti. Si preleva quindi il primo disco e lo si posiziona su un supporto meccanico che prima schiaccia il disco e poi lo tiene in posizione per il rigonfiamento, quindi si insuffla aria fino a provocare la rottura della bolla che si viene a formare. Si procede nello stesso modo anche con gli altri cilindri d'impasto ottenendo cinque tracciati (Figura 3.7) dai quali si ricavano i seguenti valori medi:

- P (mm): altezza massima della curva; rappresenta la tenacità dell'impasto e quindi la resistenza massima opposta alla deformazione;

- L (mm): lunghezza della curva; rappresenta l'estensibilità dell'impasto;
- P/L: rappresenta l'equilibrio dell'impasto ed è dato dal rapporto tra tenacità ed estensibilità
- W (10^{-4} joule): rappresenta la forza della farina, cioè la resistenza opposta dall'impasto alla deformazione.



Fig. 3.6 Alveografo Chopin

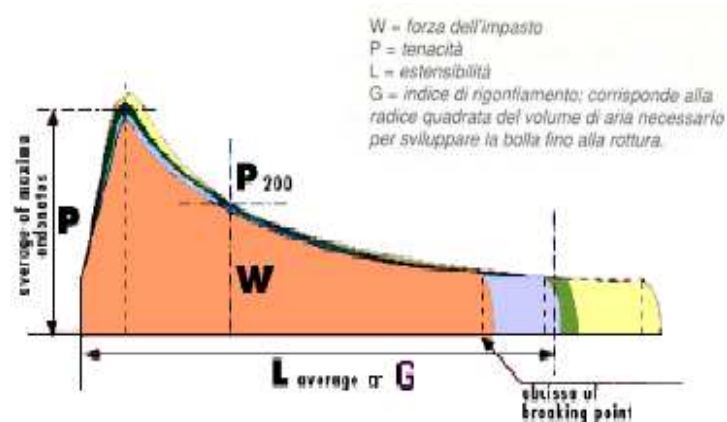


Fig 3.7 Esempio di alveogramma

Analisi viscoamilografica

Il test viscoamilografico è stato condotto mediante il Micro Visco-Amylo-Graph (Brabender OHG, Duisburg, Germania), collegato ad un personal computer per il controllo dell'analisi mediante un software specifico (Viscograph program for Microsoft Windows; Brabender OHG, Duisburg, Germania).

Il viscoamilografo (Figura 3.8) è uno strumento che consente di valutare le variazioni della viscosità di campioni miscelati con acqua distillata nel corso di processi di riscaldamento e raffreddamento. Serve pertanto a valutare le proprietà di gelatinizzazione e retrogradazione dell'amido.

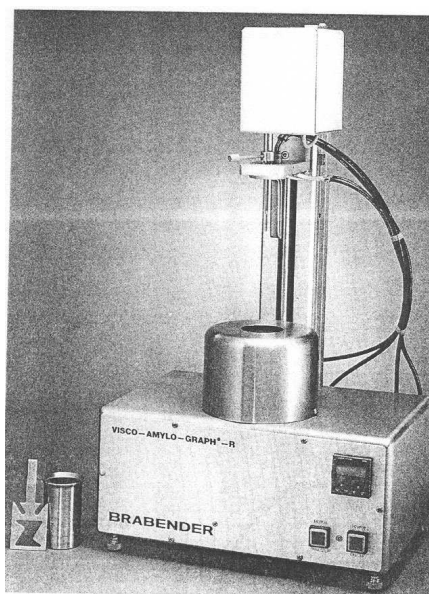


Fig. 3.8 Microviscoamilografo Brabender

Le prove sono state condotte su un campione di 15 g di farina e 100ml di acqua corretti al 14% di umidità. Alla sospensione viene quindi applicato un profilo termico definito e riportato nella Tabella 3.2.

Tabella 3.2 Profilo termico applicato durante le prove condotte al microviscoametro.

Tempo (min)	Gradiente di T (°C/min)	Temperatura (°C)	Sosta (min)
00:00:00		30	
00:21:40	3	95	00:30:00
00:15:00	-3	50	00:30:00
00:06:40	-3	30	00:01:00

La Figura 3.9 mostra un tipico tracciato nel quale sono riportati in ascisse il tempo (espresso in minuti) e in ordinate la viscosità (espressa in Unità Brabender, UB) e la temperatura del sistema (espressa in °C).

Dalla curva si possono ricavare i seguenti indici:

- temperatura di inizio gelatinizzazione (°C): temperatura in cui la viscosità inizia ad aumentare rapidamente;
- picco di viscosità (UB): massima viscosità sviluppata durante o subito dopo il riscaldamento a 95°C;
- tempo al picco (min): tempo necessario per sviluppare il picco di viscosità;
- temperatura al picco (°C): temperatura alla quale si ha il picco di viscosità;
- viscosità minima (UB): minimo valore di viscosità raggiunto dopo il picco, normalmente vicino all'inizio del periodo di raffreddamento;
- *breakdown* (UB): differenza fra la viscosità al picco e la viscosità all'inizio del raffreddamento (viscosità minima);
- *setback* (UB): differenza tra la viscosità alla fine del raffreddamento e la viscosità all'inizio del raffreddamento (viscosità minima);
- viscosità finale (UB): viscosità registrata alla fine del test;

- *setback* totale (UB): differenza tra la viscosità finale e la viscosità all'inizio del raffreddamento (viscosità minima).

In aggiunta a questi indici vengono misurati i valori delle viscosità all'inizio e alla fine degli intervalli di tempo in cui la temperatura viene mantenuta costante.

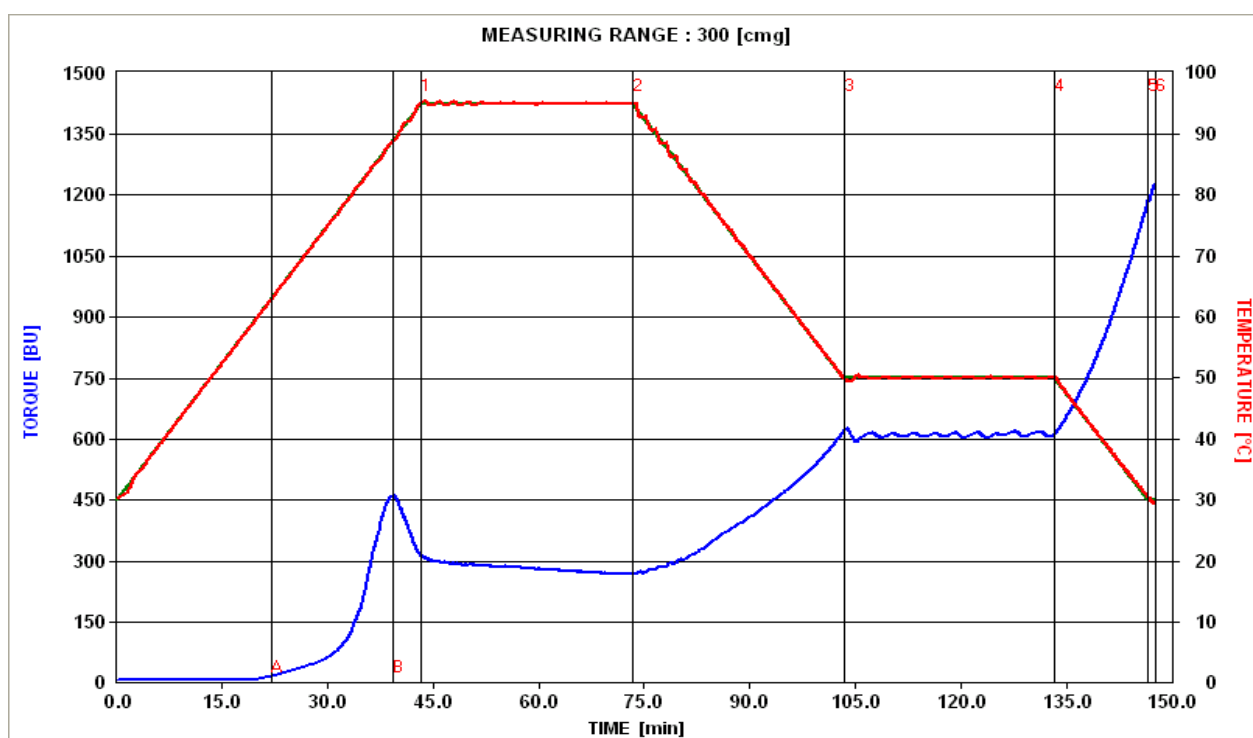


Fig. 3.9 Esempio di tracciato microviscoamilografico di uno sfarinato

Analisi reofermentografica

L'analisi reofermentografica è stata condotta mediante il Reofermentometro F3 Chopin (Chopin SA, Villeneuve-La-Garenne, France) (Figura 3.10). Tale strumento permette di studiare l'evoluzione della fase di lievitazione di un impasto posizionato in un cestello di fermentazione (Figura 3.11) e sottoposto alle condizioni (temperatura, tempo, stress) imposte dal protocollo prescelto. Il pistone è

direttamente collegato ad un sensore di spostamento (inserito nel coperchio della vasca di fermentazione) che consente di misurare lo sviluppo progressivo in altezza dell'impasto, mentre un circuito pneumatico rileva la produzione ed il rilascio di gas (CO_2) nel corso della lievitazione.

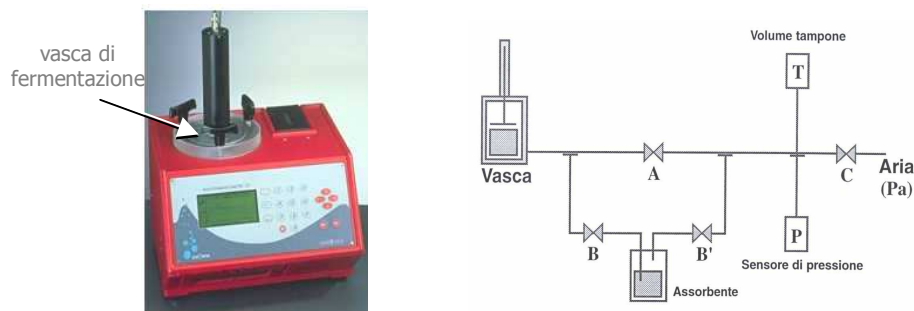


Fig. 3.10 Reofermentometro Chopin e principio di funzionamento

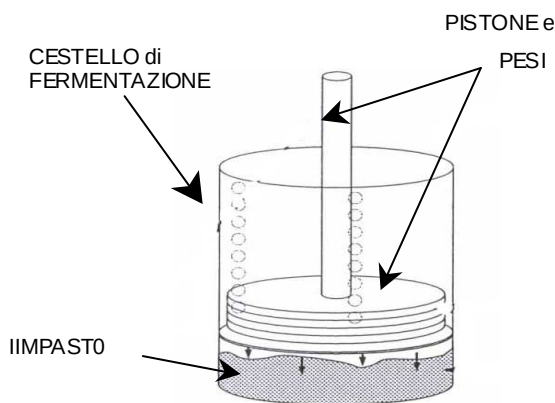


Fig. 3.11 Vasca di lievitazione

Il risultato del test è dunque formato da due tracciati: la curva di sviluppo dell'impasto e la curva di rilascio del gas.

La curva di sviluppo dell'impasto (Figura 3.12) viene ottenuta mediante misure effettuate regolarmente dal sensore di spostamento.

Dall'analisi di tale curva è possibile ricavare i seguenti parametri:

- T_1 (ore)= tempo corrispondente al punto di sviluppo massimo dell'impasto;
- H_m (mm)= sviluppo massimo in altezza dell'impasto;
- T_2 e $T'2$ (ore)= tempi di relativa stabilizzazione dell'impasto al punto massimo, situato a un'altezza di $0.88 H_m$ senza essere inferiore a $H_m - 6\text{mm}$;
- ΔT_2 (ore)= $T_2 - T'2$ = tolleranza dell'impasto;
- h (mm)= sviluppo in altezza dell'impasto alla fine del test;
- $(H_m - h) / H_m$ (%)= percentuale di diminuzione dello sviluppo dell'impasto a fine test (es: dopo 3 ore nel caso del protocollo Chopin) rispetto allo sviluppo massimo registrato.

Da questi parametri e dalle loro combinazioni si ricavano indicazioni utili per la valutazione della qualità dell'impasto. Gli indici T_1 e $(H_m - h) / H_m$, ad esempio, indicano i momenti ottimali per la lavorazione dell'impasto, mentre l'altezza H_m può essere messa in relazione al volume del pane.

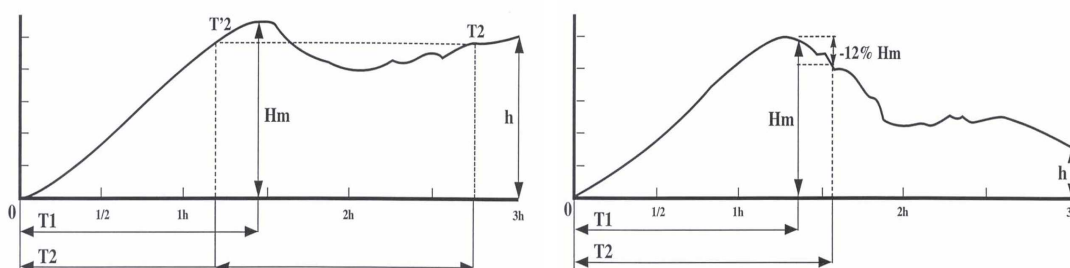


Fig. 3.12 Esempi di curve di sviluppo in altezza di impasti ottenuti da farine di diversa forza

Per definire la curva di rilascio del gas (Figura 3.13), il circuito pneumatico del reofermentometro effettua dei cicli di misurazione di pressione. Queste misure sono convertite in portata da un microprocessore, tenendo conto del tempo di presa di pressione. Il principio dei cicli prevede la misura totale dell'anidride carbonica prodotta e la misura della produzione gassosa senza la quantità di CO_2 rilasciata e imprigionata nella cartuccia di calce sodata (vedi il principio di funzionamento

riportato in Figura 3.10). La differenza tra le curve di produzione e di ritenzione della CO_2 fornisce la quantità di anidride carbonica che è stata rilasciata durante il test.

La curva di rilascio del gas permette di valutare i seguenti parametri:

- $H'm$ (mm)= altezza massima della curva;
- $T1$ (ore)= tempo necessario per ottenere $H'm$;
- Tx (ore)= tempo di apparizione della porosità dell'impasto (momento in cui la pasta non è più in grado di trattenere la CO_2 prodotta e comincia a rilasciarla);
- CO_2 totale (mL)= volume totale di gas prodotto ($A1+A2$ della curva);
- CO_2 rilasciata (mL)= volume di gas che l'impasto ha rilasciato durante la fermentazione ($A2$);
- CO_2 trattenuta (mL)= volume di gas ancora presente nell'impasto alla fine del test ($A1$).

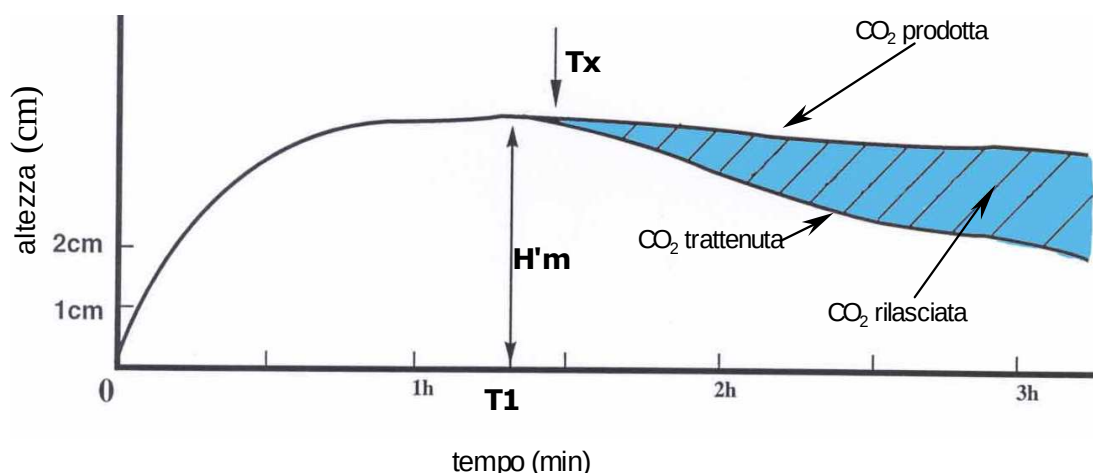


Fig. 3.13 Esempio di curva di produzione e rilascio del gas

La curva di rilascio del gas permette di determinare il coefficiente di ritenzione R (%). Esso viene definito come il rapporto percentuale tra il volume di gas trattenuto nell'impasto ed il volume totale di gas prodotto durante il test. R è molto vicino a 100 con le farine estratte dall'endosperma, mentre può scendere fino a 50/60 per farine provenienti dagli strati più esterni dell'endosperma, o per farine estratte da chicchi avariati o mal conservati.

Per ciò che riguarda i parametri di conduzione del test, la casa produttrice dello strumento propone l'uso del "*protocollo Standard*", secondo il quale la miscelazione degli ingredienti e la formazione dell'impasto deve avvenire nella vasca impastatrice dell'Alveografo Chopin, seguendo le regole di idratazione proprie del test alveografico; tale metodo, inoltre, prevede l'apposizione di un disco del peso di 2 kg sul pistone collegato al rilevatore di spostamento. Le condizioni di analisi possono essere modificate in modo da operare seguendo protocolli di nuova creazione, secondo necessità. A questo proposito, sono riportate nella Tabella 3.3, oltre alle condizioni del *protocollo Standard*, le condizioni di un nuovo protocollo più idoneo ai fini di questo lavoro e messo a punto in laboratorio, denominato "*protocollo Standard modificato*", che prevede l'uso dell' impastatrice del Farinografo Brabender e non fa uso di pesi sul pistone.

Per la preparazione dell'impasto si deve utilizzare un'impastatrice dotata di un sistema di controllo della temperatura. È fondamentale che l'impasto risultante sia omogeneo.

Le modalità operative sono le seguenti:

- la farina opportunamente pesata viene posta nella vasca impastatrice del farinografo e viene miscelata per 1 minuto;
- al termine del minuto di miscelazione a secco, si aggiunge (entro un minuto di tempo) la soluzione di lievito fresco, preparata utilizzando un'aliquota dell'acqua di idratazione, e la rimanente acqua di idratazione;
- allo scadere del minuto di impastamento, si ferma l'apparecchio e si recupera con una spatola la farina adesa al coperchio e alle pareti dell'impastatrice, in modo che tutte le particelle vengano idratate e partecipino alla formazione dell'impasto;
- si aggiunge il sale e si riavvia l'apparecchio, impastando per altri 6 minuti;
- al termine dei 6 minuti, si ferma l'apparecchio e si preleva l'impasto dalla vasca dell'impastatrice; se ne pesano 315 g nel cestello in dotazione al Reofermentometro, si posiziona il cestello nello strumento e si avvia il test reofermentografico.

Tabella 3.3 Condizioni di lavoro per la valutazione reofermentografica di impasti.

Parametro	Protocollo Standard	Protocollo Standard modificato
TEMPERATURA del TEST	28.5°C	30.0°C
FORMULAZIONE dell'IMPASTO	250 g di farina 7 g di lievito 5 g di sale	300 g di farina (14%Hu) 8,40 g di lievito fresco 6 g di sale
IDRATAZIONE dell'IMPASTO	Secondo le indicazioni del test alveografico	Fino all'ottenimento di una consistenza dell'impasto pari a 500 UB
QUANTITÀ di IMPASTO	315 g	315 g
PESO da APPLICARE sul PISTONE	2 kg	Nessuno
DURATA del TEST	3 ore	3 ore

Consistometro Bostwick

L'analisi permette di determinare l'assorbimento dell'acqua mediante consistometro Bostwick (Figura 3.14).

Per effettuare l'analisi, lo strumento viene appoggiato su un piano stabile facendo attenzione che la bolla all'estremità inferiore dello strumento sia centrata all'interno del disco. Per il dosaggio si pesano 60 g di farina e 105 g di acqua sulla bilancia. Le modalità operative sono le seguenti:

- versare in un becher di vetro un po' d'acqua, poi tutta la farina ed il rimanente liquido;
- mescolare per un minuto con un cucchiaino facendo attenzione che tutta la farina si disciolga bene e che non vi siano grumi;

- una volta mescolato il tutto, lasciare riposare la miscela per 5 minuti senza mescolare ulteriormente;
- abbassare la ghigliottina dello strumento e bloccarla con la leva di bloccaggio;
- rimescolare la miscela per 15 secondi prima di versarla;
- riempire completamente la cella con la miscela facendo attenzione che il campione riempi la cella fino all'orlo;
- livellare il volume della cella riempiuta eliminando il prodotto trasbordante;
- abbassare la leva di bloccaggio e contemporaneamente cronometrare 60 secondi al termine dei quali il percorso compiuto dal campione sarà letto direttamente sulla scala graduata e rappresenterà la misura dell'assorbimento di acqua.



Fig. 3.14 Consistometro Bostwick.

Analisi fisiche

Colore

La misura del colore è stata effettuata con il colorimetro tristimolo Minolta Chroma Meter R-210, correlato di lampada pulsante allo xeno a luce riflessa. Lo strumento, opportunamente tarato, esprime con coordinate numeriche il colore riflesso dalla superficie degli oggetti. Le coordinate fornite dallo strumento sono riferite allo spazio CIE- $L^*a^*b^*$, definito dalla Commission International de l'Eclairage nel 1976 (Figura 3.15).

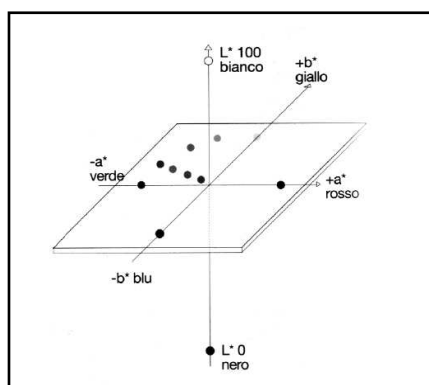


Fig. 3.15 Spazio CIE $L^*a^*b^*$

Nello spazio CIE- $L^*a^*b^*$, la luminosità, L^* , è riportata sull'asse delle ordinate, dove lo zero coincide con il nero e l'estremo superiore (100) con il bianco. Le coordinate a^* e b^* sono perpendicolari l'una all'altra e all'asse L^* e si riferiscono, rispettivamente, al grado di rosso-verde e a quello di giallo-blu.

Lo strumento viene dapprima calibrato con la piastrella di riferimento con cromaticità nota fornita dal costruttore. Al termine della calibrazione, si procede alla determinazione del colore, posizionando il campione all'interno di una piastra Petri, in modo da avere uno strato uniforme e continuo. Durante la lettura, il campione viene illuminato omogeneamente e lo spettro della radiazione luminosa riflessa viene analizzato dallo strumento. Gli indici di colore sono ottenuti dalla media di 4 determinazioni per ogni campione, avendo l'accortezza di rimuovere ogni volta il campione, in modo che lo strato superficiale venga rinnovato ad ogni lettura.

3.2.1 Analisi sul prodotto finito

Sui campioni di pane sono state effettuate le seguenti analisi:

- umidità;
- ceneri;
- proteine;
- lipidi;
- fibra totale;
- zuccheri solubili;
- amido totale (TS) e amido resistente (RS);
- attività dell'acqua (aw);
- peso;
- volume;
- volume specifico;
- colore;
- alveolatura (tramite analisi dell'immagine);
- shelf- life (tramite test di compressione e determinazione umidità);
- indice glicemico (tramite prove *in vivo*).

Analisi chimiche

Umidità

L'umidità è stata determinata per differenza di peso, dopo essiccamento, di un'aliquota di campione (circa 5 g) in stufa a 130° C per 90 minuti, sulla base di quanto descritto dal metodo ufficiale italiano (G.U. n°145, 1985).

Inoltre, per lo studio della shelf-life, l'analisi dell'umidità è stata eseguita sulla mollica, prelevata da tre fette per ogni campione tramite un carotatore, al tempo 0 e dopo 3, 6, 24, 30 e 48 ore di conservazione a 23° C .

Ceneri

Il contenuto in ceneri è stato determinato secondo la metodica descritta nel paragrafo dell'analisi delle materie prime.

Proteine

La determinazione del contenuto complessivo di azoto proteico è stata fatta seguendo il metodo Kjeldahl (AOAC n° 925.31, 1995) come descritto nel paragrafo riguardante le analisi delle materie prime.

Lipidi

La determinazione del contenuto in grasso è stata effettuata per via ponderale dopo estrazione con solventi organici mediante metodica Soxhlet, (AOAC 31.04.02 n° 963.15, 1973).

Fibra totale

La determinazione della fibra alimentare è stata eseguita seguendo il metodo enzimatico-gravimetrico Prosky, secondo cui il valore della fibra viene calcolato come somma dei valori della fibra solubile e della fibra insolubile (AOAC n° 991.43, 1995).

Zuccheri solubili

La determinazione degli zuccheri solubili è stata eseguita mediante estrazione in acqua a caldo e successiva analisi per HPLC secondo la metodica descritta da Brighenti *et al.* (1987).

Amido totale (TS) ed amido resistente (RS)

Il metodo per la valutazione dell'amido resistente (RS) si basa sulla determinazione dell'amido residuo dopo estensiva idrolisi con α -amilasi pancreatica (Champ, 1992). Questa frazione di amido viene purificata mediante una serie di lavaggi con etanolo assoluto, etanolo 90% ed acetone. L'amido residuo è dissolto in alcali e completamente idrolizzato per azione di amiloglucosidasi fungina; viene valutato

quindi il glucosio liberato dall'idrolisi mediante un analizzatore clinico semiautomatico di glucosio (modello STAT 2300 YSI, Yellow Spring Ind., USA).

Analisi chimico-fisiche

Attività dell'acqua (a_w)

Il valore di attività dell'acqua è stato misurato con analizzatore Lab-Master, prodotto da Novasina. La determinazione è stata effettuata in doppio a 25°C sulla mollica dei campioni prelevata e messa all'interno di apposite cellette. Il valore è stato rilevato in condizioni di equilibrio termico e dopo 5 minuti di stabilità del valore di a_w .

Analisi fisiche

Peso

Il peso dei campioni è stato determinato con una bilancia tecnica della Mettler modello PG 3001.

I panini vengono pesati interi (10 repliche per ogni tipologia) ed il loro peso viene letto direttamente sullo schermo della bilancia.

Volume

Il volume dei panini è stato determinato, su 10 campioni per ogni tipologia, con un misuratore volumetrico della Chopin modello VPP.

Questo strumento funziona come una clessidra, è costituito da due camere: una destinata a contenere il panino da analizzare e l'altra contenente semi di miglio; le due camere sono collegate mediante un tubo trasparente sul quale è riportata una scala graduata. All'inizio dell'analisi la camera dove viene collocato il panino è posizionata superiormente rispetto all'altra in modo che i semi di miglio rimangano all'interno della camera inferiore, all'avvio della prova, la camera contenente il panino viene chiusa e lo strumento viene capovolto di 180° in modo da effettuare un ribaltamento delle due camere, a questo punto i semi di miglio cadono per gravità nella camera contenente il panino ed andranno ad occupare tutti gli spazi vuoti

proseguendo la loro corsa nel tubo trasparente. Quando tutti i semi sono caduti si legge il volume in cm³ direttamente sulla scala graduata. Il valore finale sarà dato dalla media di tre misurazioni.

Volume specifico

Una volta determinato il volume ed il peso dei panini, il volume specifico viene calcolato come rapporto tra i due dati.

Colore

La misura del colore è stata effettuata con il colorimetro tristimolo Minolta Chroma Meter R-210 come descritto nel paragrafo delle materie prime. Per ogni tipologia di pane è stato determinato il colore sia della crosta e che della mollica. Gli indici di colore ottenuti sono la media di 6 misurazioni per ogni campione.

Analisi dell'immagine

Le tecniche di analisi dell'immagine (Image Analysis) hanno come obiettivo la quantificazione di caratteristiche geometriche e densitometriche di immagini, acquisite in forma tale da presentare elementi "significativi" (a livello macro o microscopico).

In questa ricerca l'analisi dell'immagine è stata applicata al pane per studiarne l'alveolatura.

Per l'acquisizione delle immagini è stato utilizzato uno scanner piano a riflessione (Epson Perfection 3120 Photo, Epson Italia, Milano), direttamente interfacciato con un personal computer.

Per Standardizzare ed elaborare le immagini è stato impiegato un software dedicato (Image Pro-Plus versione 4.5.1.29, Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA).

Le immagini sono state acquisite posizionando direttamente sul piano dello scanner 8 fette dello spessore di 2,5 cm, per ogni tipo di pane, e ponendo un opportuno sfondo nero per minimizzare le interferenze cromatiche; le immagini finali sono state quindi ottenute ad una risoluzione di 300 dpi (118.2 pixel/cm) e ad una profondità di

colore pari a 24 bit per pixel (16.8 milioni di colori), memorizzando poi il risultato in formato tiff.

L'elaborazione è avvenuta applicando la conversione dell'immagine in scala di grigi a 8 bit, usando, filtri opportuni per aumentare il contrasto e ottenere così immagini più definite. Tramite il software sono state impostate tre diverse classi dimensionali attraverso cui discriminare gli oggetti (alveoli) in base alla loro area:

- classe 1: alveoli aventi area compresa tra 0,05 e 0,5 mm²;
- classe 2: alveoli di area compresa tra 0,5 e 3 mm²;
- classe 3: alveoli di area compresa tra 3 e 100 mm².

Sono stati quindi selezionati alcuni parametri utili per la caratterizzazione delle fette: il numero e l'area degli oggetti totali (alveoli), rapporto tra area degli alveoli e area della fetta (superficie alveolata).

Test di compressione

Per la determinazione della sofficietà dei panini è stato eseguito il test di compressione con l'apparecchio TA-HD Plus, Stable MicroSystem, secondo il metodo ufficiale AACC (74-09). Tale test ha permesso di valutare la variazione della consistenza dei panini nel tempo.

Per l'esecuzione del test si è scelto un pistone del diametro di 27,2 mm e di raggio 13,6 mm.

Ogni campione analizzato è stato tagliato in fette dello spessore di 2,5 cm e ne è stata misurata la forza opposta dalla mollica in seguito ad una deformazione del 25%.

Per ogni campione sono state effettuate almeno 8 repliche a tempi prefissati, al tempo 0 e dopo 3, 6, 24, 30 e 48 ore di conservazione a 23°C, per un totale di sei tempi.

Prove *in vivo*

La valutazione dell'Indice Glicemico (IG) è stata effettuata secondo la procedura Standardizzata FAO/WHO 1998.

Sono stati arruolati 10 soggetti adulti sani, 5 femmine e 5 maschi, di età compresa tra i 20 e i 25 anni. Ciascun soggetto ha consumato, in ordine randomizzato, 5 pasti test (2 pani + 3 ripetizioni di glucosio di riferimento (50g in 500 ml di acqua naturale).

Le porzioni di alimento test sono state calcolate in modo da somministrare ai soggetti 50 g di carboidrati disponibili (pane prodotto con farina Standard =100 g; pane prodotto con farina "Frenata" =120g) ed accompagnate da 500 ml di acqua naturale.

Il giorno prestabilito per la sperimentazione, i volontari, a digiuno da almeno 8 ore, sono stati sottoposti a prelievi di sangue capillare, prima e dopo il consumo del pasto test (tempi 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minuti), con appositi dispositivi (GLUCOLET, Bayer Diagnostics). I campioni di sangue sono stati raccolti in apposite provette (MICROVETTE CB-300, SARSTEDT, Germany) e conservati a -18° C fino al momento della determinazione del glucosio, effettuata per via enzimatica, mediante un analizzatore clinico semiautomatico di glucosio (modello STAT 2300 YSI). Per l'intera durata della sperimentazione (circa due ore ogni seduta) è stato chiesto ai volontari di non fumare e di non assumere cibi o bevande, eccezione fatta per l'acqua.

Al momento del test, ai soggetti è stato consegnato un questionario su cui annotare età, peso, altezza, la composizione del pasto assunto la sera prima della prova, i cambiamenti rispetto alla routine quotidiana e l'eventuale assunzione di farmaci e/o di integratori alimentari.

Per ciascun soggetto e per ciascun pasto sono state calcolate le aree incrementali (IAUC) sottese alle curve glicemiche postprandiali (figura 3.15). L'Indice Glicemico è stato calcolato come:

$$IG = \frac{IAUC_{test}}{IAUC_{st}} \times 100$$

Dove:

$IAUC_{test}$ = area glicemica incrementale dell'alimento da testare

$IAUC_{st}$ = media delle aree glicemiche incrementali dei due test effettuati utilizzando la soluzione acquosa di glucosio come Standard di riferimento

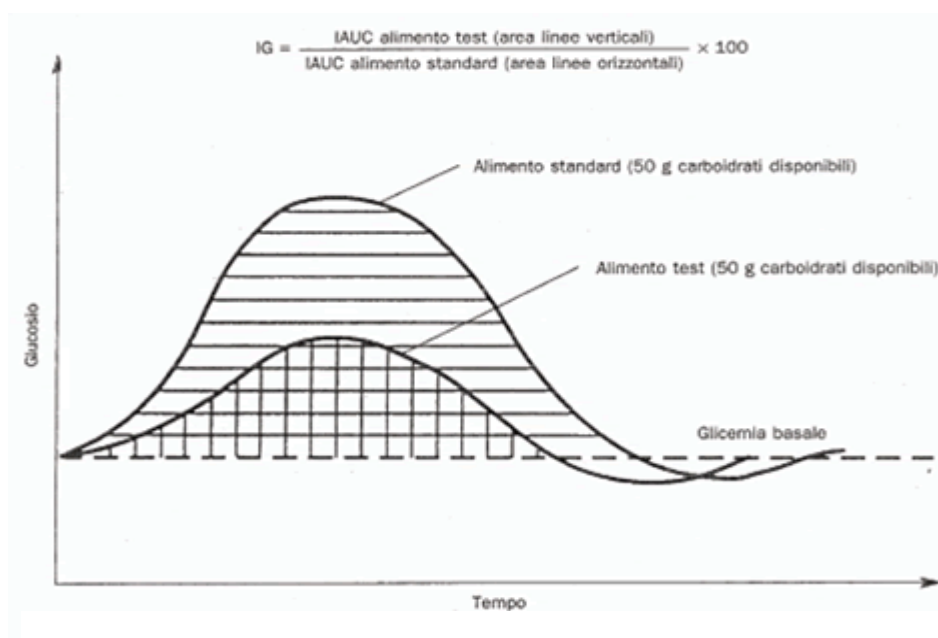


Fig. 3.14 Determinazione dell'Indice Glicemico, a partire dalle aree sottese alle curve incrementali.

Analisi statistica dei risultati

I dati sono stati espressi come media $\pm$ ES, eccetto quando diversamente specificato. Tutti i risultati delle prove in vivo sono stati sottoposti ad analisi della varianza per misure ripetute (RM-ANOVA), al fine di identificare differenze di effetto dovute ai diversi pasti. Si è quindi utilizzato il test LSD, applicato post hoc, per confrontare l'effetto tra i pasti. Tutti i calcoli statistici sono stati effettuati con l'utilizzato del software Statistica della Statsoft Inc.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 TIPOLOGIA SFARINATI

La preparazione della miscela di farina e fibre da panificare su scala semi-industriale (200 kg/ora) è stata effettuata dalla Società Panem Italia S.p.A. La formulazione così ottenuta, denominata farina “Frenata”, ha previsto l’aggiunta di una miscela di fibre commerciali, sia solubili che insolubili, ad una farina “Standard” di tipo 00 e media qualità panificatoria secondo la classificazione di Aldovrandi e Vitali (1995).

L’Azienda ha dichiarato che le fibre sono state addizionate in quantità compresa tra il 10 e il 15% in peso della farina, ma ha chiesto di poter mantenere riservata la natura dei polisaccaridi non amido (NSP) utilizzati per produrre la farina “Frenata”.

4.2 CARATTERIZZAZIONE DELLA MATERIA PRIMA

La sperimentazione ha previsto, in primo luogo, la caratterizzazione delle due tipologie di farina attraverso la determinazione di indici fisici (colore), chimici (umidità, ceneri, proteine, amido totale, amido danneggiato) e test reologici (alveografo, farinografo, viscoamilografo, reofermentometro). Questi ultimi, come noto, permettono di prevedere l’attitudine alla trasformazione di una materia prima, consentendo di valutare se il suo impiego possa richiedere la variazione di alcuni parametri di processo. Il controllo effettivo della performance deve essere tuttavia monitorato nel reale processo produttivo.

4.2.1 Aspetto delle farine

Come si può osservare dalla Tabella 4.1, non ci sono sostanziali e significative differenze nel colore delle due farine. L'elevato valore di L^* e i gradi di rossezza e giallezza del tutto simili dimostrano che la presenza di fibra nella nuova formulazione non porta a imbrunimenti o comparse di colorazioni grigie poco gradite.

Tabella 4.1 Caratteristiche di colore delle farine.

Campione	L^* (luminosità)	$100-L^*$ (grado di bruno)	a^* (grado di rossezza)	b^* (grado di giallezza)	a^*/b^* (tinta)
Farina Standard	$96,17 \pm 0,30$	$3,83 \pm 0,30$	$-0,21 \pm 0,01$	$+9,21 \pm 0,14$	$-0,02 \pm 0,002$
Farina "Frenata"	$95,88 \pm 0,50$	$4,12 \pm 0,50$	$-0,22 \pm 0,02$	$+9,30 \pm 0,11$	$-0,02 \pm 0,002$

4.2.2 Caratteristiche compositive

Le caratteristiche chimiche sono riassunte nella Tabella 4.2.

I valori di umidità delle due materie prime sono molto simili e sempre al di sotto del 14,5%, limite imposto dalla nostra legislazione (DPR 9 febbraio 2001, n.187). Come atteso, l'aggiunta di fibra promuove nella farina "Frenata" un più alto tenore in ceneri e una sensibile riduzione del contenuto in proteine, amido totale e, di conseguenza, di amido danneggiato. Va tuttavia segnalato che la farina arricchita in fibra presenta una composizione tale per cui non soddisfa né i requisiti della farina di tipo "0" o "00", né, tantomeno, quelli della farina integrale (Tabella 4.2). Una possibile soluzione potrebbe consistere nella scelta da parte dell'Azienda di una farina base di tipo 00 di più elevato standard tecnologico (es. farina "Panificabile superiore" nella già citata classificazione di Aldovrandi e Vitali) e con un contenuto proteico più elevato (min. 12% s.s.). Un'altra soluzione praticabile è la commercializzazione della farina arricchita con la definizione di "semi-lavorato", scelta che, tuttavia, porterebbe a non poter più utilizzare la denominazione di "Pane" per il prodotto finale.

Tabella 4.2 Caratteristiche chimiche delle farine. In corsivo sono riportati i limiti di Legge.

Campione	Umidità (%)	Ceneri (% s.s.)	Proteine (% s.s.)	Amido totale (% s.s.)	Amido danneggiato (% s.s.)
Farina Standard	10,45 ± 0,04	0,50 ± 0,09	9,73 ± 0,04	82,47 ± 2,30	6,70 ± 0,08
Farina "Frenata"	10,01 ± 0,08	0,60 ± 0,20	8,83 ± 0,07	70,86 ± 2,70	5,72 ± 0,24
<i>Farina tipo 00</i>	<i>14,50</i>	<i>0,55 max</i>	<i>9,00 min.</i>	—	—
<i>Farina tipo 0</i>	<i>14,50</i>	<i>0,65 max</i>	<i>11,00 min.</i>	—	—
<i>Farina integrale</i>	<i>14,50</i>	<i>1,30 – 1,70</i>	<i>12,00 min.</i>	—	—

4.2.3 Caratteristiche reologiche

Per quanto riguarda le performance tecnologiche (Tabella 4.3), l'aggiunta di fibra non sembra comportare un peggioramento dei parametri reologici della farina "Frenata": la stabilità farinografica (4 minuti per entrambe le tipologie) e l'indice alveografico W (valori prossimi a $200 \cdot 10^{-4}$ J per entrambi i campioni), infatti, risultano simili e confermano il mantenimento di proprietà tecnologiche di media forza anche per la nuova formulazione. L'aggiunta della miscela di fibre non è associata a peggioramenti delle caratteristiche di forza della farina, probabilmente per la capacità della frazione solubile di aumentare la viscosità del sistema, garantendo la formazione di un gel che "stabilizza" l'impasto con meccanismi diversi dall'interazione proteina-proteina tipica del glutine.

Il risultato complessivo è, dunque, un'organizzazione macromolecolare capace di offrire una buona resistenza alla deformazione. Inoltre, come evidente dall'indice farinografico di caduta, la viscosità assicurata dalle fibre solubili porta la farina "Frenata" ad avere un indice di caduta addirittura inferiore rispetto alla farina Standard. Come atteso, l'aggiunta di fibra promuove un maggior assorbimento di acqua, in accordo con numerosi lavori di letteratura che riportano come questo indice

aumenti all'aumentare del contenuto in fibra della farina (Sudha *et al.*, 2005). La presenza di numerosi gruppi idrossilici nella struttura della fibra, infatti, permette maggiori interazioni con l'acqua attraverso legami idrogeno.

L'aumento sensibile del rapporto P/L alveografico conferma la formazione di un gel tenace nella nuova formulazione. Infatti, studi di letteratura (Gomez *et al.*, 2003), hanno dimostrato che l'aggiunta di fibra alimentare agli impasti provoca un aumento di tenacità (P) ed una riduzione dell'estensibilità (L); l'incremento di questo indice è probabilmente dovuto all'interazione che si instaura tra le fibre e le proteine della farina secondo quanto riportato dagli stessi autori.

Tabella 4.3 Caratteristiche alveografiche e farinografiche delle farine.

Campione	Caratteristiche alveografiche		Caratteristiche farinografiche		
	W ($\cdot 10^{-4}$ J)	P/L	Assorbimento (%)	Stabilità (minuti)	C ₁₀ (UB)
Farina Standard	198	0,56	60,5	4	75
Farina "Frenata"	209,5	2,72	64,7	4	50

Per quanto attiene alle proprietà reologiche associabili alla frazione amilacea, queste sono state indagate mediante il test viscoamilografico, i cui tracciati sono riportati nella Figura 4.1. Il test è in grado di valutare la capacità dell'amido di rigonfiare a seguito dell'aumento di temperatura in presenza di acqua, fornendo informazioni sia sulla consistenza che il pane può raggiungere durante la cottura, sia sulla sua capacità di mantenere la morbidezza durante l'invecchiamento (Pagani e Manzoni, 2007).

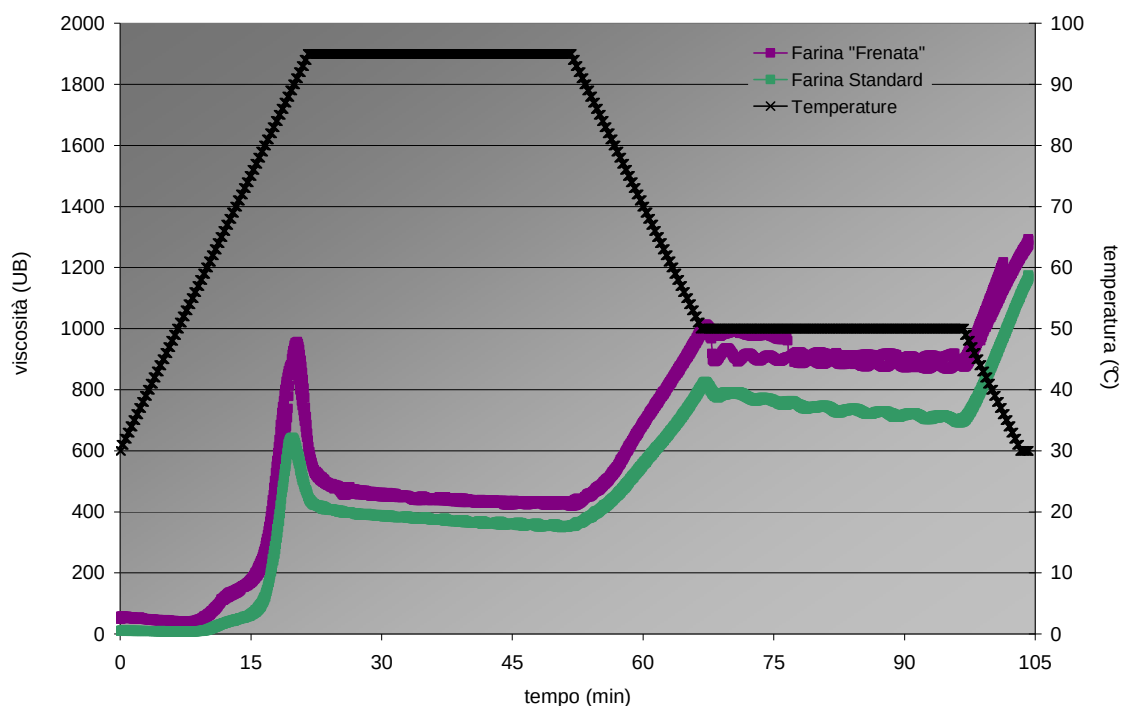


Figura 4.1 Tracciato viscoamilografico relativo alla farina “Frenata” (curva viola) e alla farina Standard (curva verde).

Tabella 4.4 Dati relativi al test viscoamilografico

Campione	T inizio gelatinizzazione (°C)	T al picco (°C)	Viscosità massima (UB)	Break-down	Setback
Farina Standard	61,4	89,1	640	287	453
Farina “Frenata”	58,4	90,8	951	518	564

Come si può osservare, la farina “Frenata” è caratterizzata da un aumento di viscosità che appare a temperature di tre gradi inferiori rispetto alla farina Standard (Tabella 4.4). Quando la temperatura supera i 60° C, la viscosità delle miscele inizia ad aumentare rapidamente. La viscosità massima raggiunta dalla sospensione farina-acqua è pari a 951 UB per la farina “Frenata” e 640 UB per la farina Standard, con una temperatura al picco rispettivamente di 90° C e 89° C. Le fibre presenti nella farina “Frenata” sembrano dunque in grado di agire in maniera sinergica con il

rigonfiamento dei granuli d'amido: infatti, secondo quanto emerso da studi recenti, alcuni idrocolloidi, come la gomma guar, sarebbero in grado di assicurare a sistemi alimentari viscosità anche a caldo (Ashwini *et al.*, 2009).

In entrambe le sospensioni, comunque, si osserva il fenomeno del “*break-down*”, vale a dire alla perdita di viscosità a seguito di uno stress meccanico della sospensione contenente amido gelatinizzato. La viscosità minima risulta, infatti, di 433 UB per la farina di nuova formulazione e di 353 UB per la farina Standard, con valori di “*break-down*” di 518 UB per la farina “Frenata” e di 287 UB per la farina Standard.

Riassumendo, per quanto osservato durante il riscaldamento, nonostante il minor contenuto in amido, la farina “Frenata” assicura una maggiore viscosità a caldo, imputabile alle proprietà viscosizzanti delle fibre aggiunte nella formulazione, in accordo con altri autori, Rosell *et al.* (2009).

Il raffreddamento a 50° C di un sistema contenente amido gelatinizzato, promuove, come noto, un incremento generale della viscosità, a causa del fenomeno della retrogradazione dell'amido causato soprattutto dalla forte tendenza delle molecole di amilosio ad associarsi alle altre molecole di amilosio adiacenti mediante legami idrogeno. Al raggiungimento di 50° C, la farina “Frenata” ha una viscosità di 997 UB e la farina Standard di 806 UB, con un valore di *setback* (differenza tra la viscosità al termine dei 30 minuti a 50° C e la viscosità minima) di 564 UB e 453 UB rispettivamente. La viscosità dei due campioni rimane differente anche nei tempi successivi del test: infatti, al termine del trattamento di 30 minuti alla temperatura costante di 50° C, la farina “Frenata” ha una viscosità di 900 UB contro le 695 UB della farina Standard, mentre a fine test, dopo l'ulteriore raffreddamento a 30° C, la viscosità è rispettivamente 1293 UB e 1170 UB, con un *setback* totale (differenza tra la viscosità finale e la viscosità minima) di 863 UB per la farina di nuova formulazione e di 817 UB per la farina Standard. Le fibre addizionate non sembrano, dunque, in grado, almeno a livello teorico, di contrastare efficacemente il fenomeno della retrogradazione dell'amido e, dunque, di rallentare il raffermamento del pane.

L'unico test reologico in grado di valutare la capacità dell'impasto di trattenere CO₂ durante la lievitazione è il test reofermentografico.

Le Figure 4.2 e 4.3 riportano rispettivamente le curve di sviluppo in altezza e di produzione e rilascio gassoso degli impasti ottenute mediante questo approccio. Come descritto nel Capitolo 3, da queste curve è possibile ricavare informazioni relative alla capacità lievitante degli impasti.

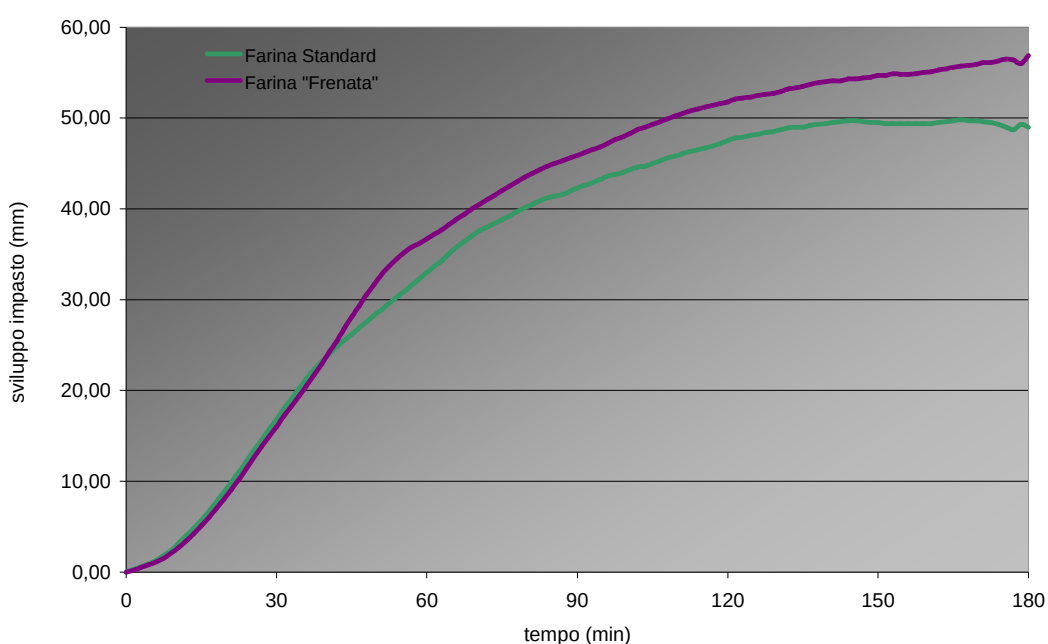


Figura 4.2 Curve di sviluppo in altezza degli impasti.

Tabella 4.5 Dati relativi allo sviluppo degli impasti.

Campione	Hm (mm)	h (mm)	(Hm/h)/Hm (%)	T1 (ore)
Farina Standard	49,8	49	1,6	2.46.30
Farina "Frenata"	56,9	56,9	0	3.00.00

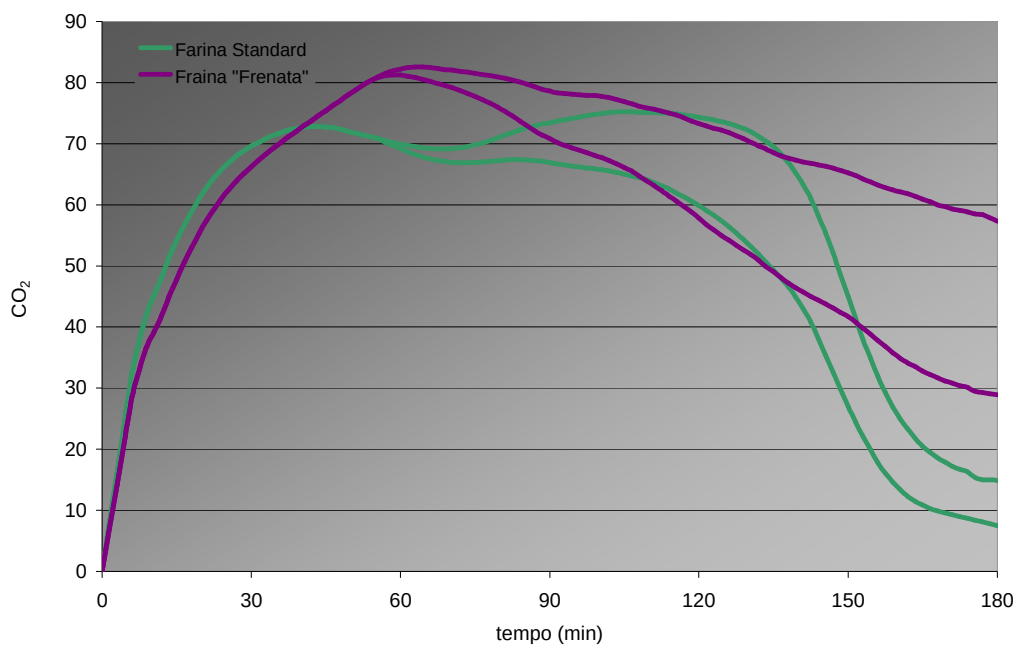


Figura 4.3 Curve di produzione e rilascio gassoso.

Tabella 4.6 Dati di produzione e rilascio gassoso degli impasti.

Campione	Hm (mm)	T1 (ore)	Tx (ore)	CO ₂ totale (ml)	CO ₂ rilasciata (ml)	CO ₂ trattenuta (ml)	Coefficiente di ritenzione (%)
Farina Standard	75,2	1.43.30	0.57.00	1659	204	1455	87,7
Farina "Frenata"	82,5	1.03.00	0.55.30	1905	299	1606	84,3

Come si può osservare dai tracciati delle Figure 4.2 e 4.3 e dai dati dalle Tabelle 4.5 e 4.6, l'impasto ottenuto a partire dalla farina "Frenata" ha uno sviluppo in altezza maggiore: l'altezza massima, osservata alla fine del test (3 ore), è pari a circa 57mm e non si rilevano inversioni di tendenza. La farina Standard, invece, raggiunge

l'altezza massima di 49,8 mm dopo 2 ore e 46 minuti. Dunque, l'impasto ottenuto da farina Standard raggiunge il volume massimo entro i tempi prefissati d'analisi mentre quello ottenuto dalla farina "Frenata" sembra essere caratterizzato da una maggiore e più prolungata stabilità. Questi dati sono in accordo con quanto visto mediante gli altri test: la presenza di fibre solubili, anziché provocare un peggioramento delle caratteristiche tecnologiche, come ci si sarebbe potuto aspettare, è risultato, al contrario, associato ad un maggior sviluppo dell'impasto, proprietà attribuibile alla presenza di polisaccaridi non amido in grado di reagire positivamente alle deformazioni fisiche cui è sottoposta la massa durante la fase di lievitazione, come evidenziato anche dal test farinografico.

Per quanto riguarda la seconda parte del test, la curva di produzione e rilascio gassoso (Figura 4.3) relativa all'impasto preparato con farina "Frenata" ha un'altezza massima superiore a quella della farina Standard (82,5 mm contro 75,2 mm) facendo ipotizzare una capacità di espansione superiore del 10% circa durante la panificazione. Le due diverse materie prime non sembrano, inoltre, caratterizzate da forti differenze per quanto riguarda il tempo di apparizione della porosità della pasta (T_x), ossia il momento in cui la pasta non è più in grado di trattenere la CO_2 prodotta dai lieviti e comincia a rilasciarla nell'ambiente: questo tempo, infatti, è pari a circa 56 minuti per entrambe le tipologie di farina. Di conseguenza l'impasto ottenuto da farina "Frenata" è in grado di raggiungere un volume totale pari a poco più di 1900 ml (Tabella 4.6) e di riuscire a trattenerne circa 1600 ml, con un coefficiente di ritenzione pari a 84,3%. Il gas prodotto dall'impasto ottenuto da farina Standard ha invece un volume totale pari a 1660 ml, di cui circa 200 ml sono rilasciati durante il tempo dell'analisi, per un coefficiente di ritenzione di 87,7%. Si può dunque concludere che, nonostante il maggior volume di gas rilasciato dall'impasto ottenuto da farina "Frenata", la quantità di CO_2 globalmente trattenuta è comunque superiore, facendo supporre un buon sviluppo anche in un reale processo di panificazione.

A conclusione della caratterizzazione reologica degli impasti, è stata verificata la consistenza ottenuta a seguito di aggiunta di acqua alla farina in ugual quantità; la consistenza è stata quindi valutata mediante un approccio di semplice esecuzione,

applicabile anche in realtà industriali dove non sempre sono disponibili strumentazioni costose e personale addestrato.

Le analisi effettuate utilizzando il consistometro Bostwick hanno confermato come l'introduzione di fibra promuova un aumento della consistenza dell'impasto, a parità di acqua aggiunta (105 ml/60g), modalità con cui convenzionalmente si effettua il test. Per la farina "Frenata", infatti, si osserva una forte diminuzione della velocità di scorrimento, pari a 4,3 cm/min contro i 19,6 cm/min misurati per la farina Standard (Tabella 4.7). La miscela di fibre aggiunta nella nuova formulazione aumenta notevolmente la viscosità del sistema, in accordo con recenti studi (Brennan *et al.*, 2008) che rilevano una maggior viscosità (densità) in sospensioni di farina addizionate di gomma guar e crusca di frumento.

Tabella 4.7 Prove di consistenza con Bostwick.

Campione	Media (cm/min) $\pm$ Dev. Std.
Farina Standard	19,6 $\pm$ 0,72
Farina "Frenata"	4,3 $\pm$ 0,13

4.2.4 Caratterizzazione della frazione "fibra"

L'insieme dei risultati delle analisi reologiche ha messo in risalto le peculiarità della componente fibra presente nella farina "Frenata" che, a differenza della crusca di frumento degli sfarinati integrali, consente di mantenere una performance tecnologica analoga a quella della farina raffinata. A causa delle scarse informazioni avute dall'Azienda, si è dunque cercato di meglio caratterizzare tale componente, sia da un punto di vista quantitativo che qualitativo. Per il primo aspetto, le due tipologie di farina (Standard e "Frenata") sono state analizzate nelle condizioni proposte da Prosky *et al.* (1988).

La quantità di fibra solubile (Tabella 4.8) è risultata pari a 4,57 %, valore inferiore a quello riferito dall'Azienda per la preparazione della miscela farina "Frenata". Tale

dato è sicuramente ascrivibile all'impossibilità di rilevare l'inulina attraverso la metodica ufficiale, in quanto questo composto non viene recuperato quantitativamente nella fase di precipitazione con etanolo (Megazyme). E' apparso perciò interessante indagare con maggior attenzione la natura di questa frazione attraverso un approccio cromatografico. Per tale caratterizzazione qualitativa è stata dapprima effettuata la solubilizzazione dei componenti della fibra in tampone acetato, sia per 2,5 che per 24 ore; queste ultime condizioni, come meglio descritto in seguito, sono apparse correlate ad una miglior risoluzione della frazione solubile. Il materiale è stato quindi separato in SE-HPLC, approccio che permette una separazione dei costituenti sulla base del loro peso molecolare, e analizzato mediante misure di light-scattering al fine di calcolare indicativamente il peso molecolare stesso.

I cromatogrammi della Figura 4.4 (A) e (B) si riferiscono alla farina Standard e alla farina "Frenata", rispettivamente.

Nella farina Standard è riconoscibile un picco con tempo di eluizione pari a 25,5 minuti, la cui intensità aumenta all'aumentare del tempo di estrazione della miscela farina-tampone. Sulla base di esperienze precedenti, questo fenomeno è ascrivibile a zuccheri di basso peso molecolare (quali maltosio e saccarosio) la cui concentrazione aumenta progressivamente a causa di attività enzimatiche (endogene della farina) non completamente bloccate anche al pH del tampone acetato (pH=4,5). Il tracciato della farina Standard è caratterizzato anche da un altro picco al tempo di eluizione di circa 21,5 minuti. Questa frazione aumenta d'intensità prolungando il tempo di estrazione, risultato correlabile anch'esso al progressivo accumulo di destrine d'origine enzimatica con grado di polimerizzazione (DP) superiore a 2.

La farina "Frenata" presenta un tracciato ben diverso (Figura 4.4 B), in cui è riconoscibile, sempre nella zona a bassi pesi molecolari, un picco a 24 minuti circa di eluizione, oltre alla componente rilevabile nella zona dei bassi pesi molecolari, e un largo picco con tempo di eluizione compreso tra 15 e 20 minuti.

Per cercare di meglio definire la natura della frazione fibra solubile, le stesse condizioni d'analisi sono state applicate per la valutazione di alcune fibre commerciali, utilizzate in altri lavori (Marangoni e Poli, 2008) al fine di ridurre l'indice

glicemico di prodotti da forno. In particolare, sono state impiegate, come standard di riferimento, soluzioni 3 mg/ml di FOS, inulina, pectina, glucomannano, guar e beta-glucano. Il tracciato relativo è riportato in Figura 4.4 C. Come si può osservare, l'inulina presenta un tempo d'eluizione di circa 24 minuti, comparabile a quello rilevato nella farina "Frenata". Per quanto riguarda il picco a tempi d'eluizione inferiori, potrebbe essere attribuito a fibre solubili di pesi molecolari superiori, quali glucomannano, guar e beta-glucano. Tuttavia, non è possibile un'attribuzione certa in quanto le fibre commerciali usate come standard non sono le medesime usate nella formulazione della farina "Frenata": di conseguenza, è possibile che presentino un differente grado di polimerizzazione.

Tabella 4.8 Caratteristiche della componente fibra delle due farine.

Campione	Fibra solubile (% s.s.)	Fibra insolubile (% s.s.)
Farina Standard	2,23	3,47
Farina "Frenata"	4,57	8,07

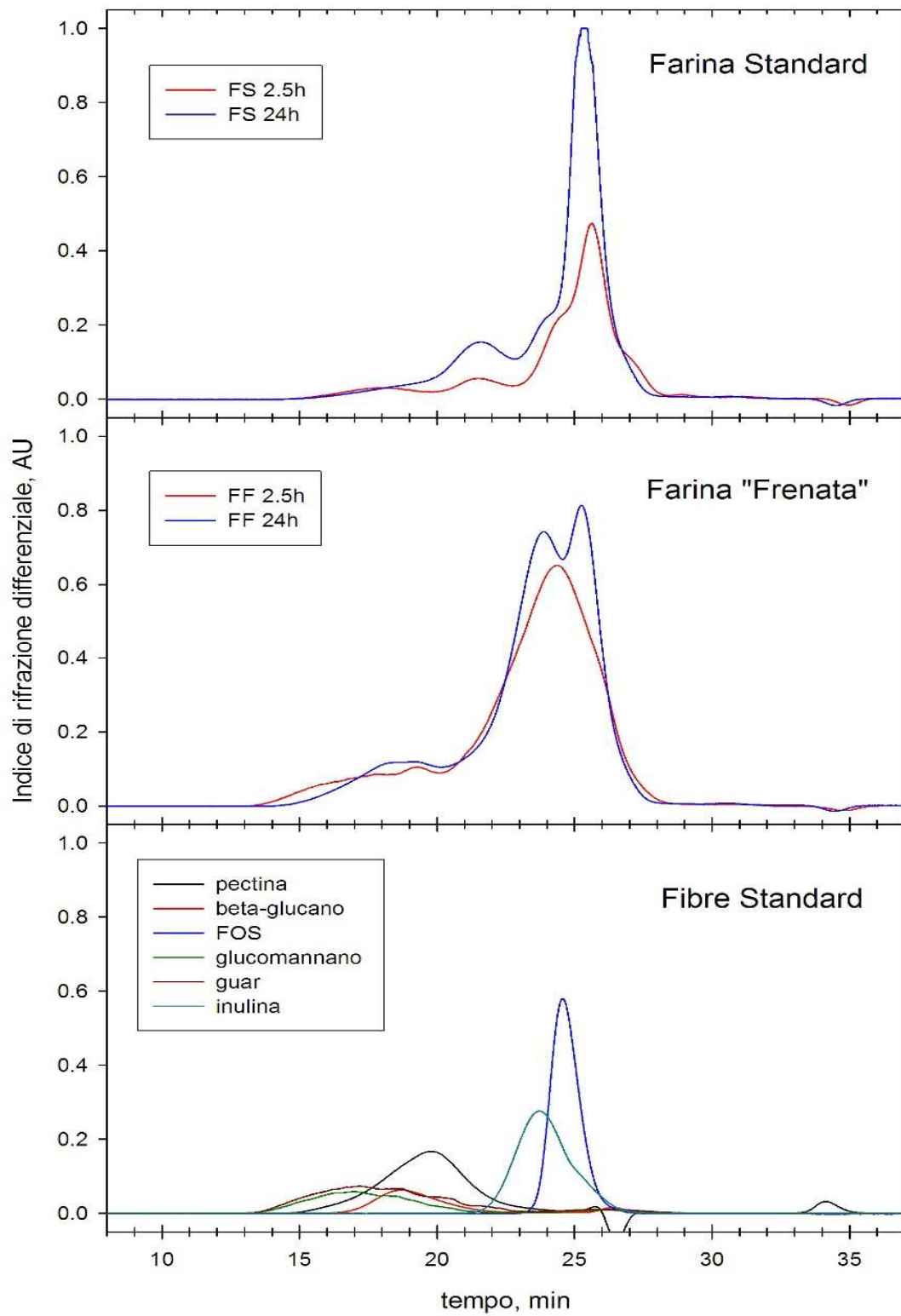


Figura 4.4 Cromatogramma della farina Standard (A), della farina "Frenata" (B) e degli standard di fibre (C).

4.3 OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI DEL PROCESSO DI PANIFICAZIONE IN FUNZIONE DELLE CARATTERISTICHE DELLA MATERIA PRIMA

A causa della rilevante affinità per l'acqua mostrata dalla miscela di fibre presenti nella cosiddetta farina "Frenata", la produzione di pane a partire da questa materia prima ha richiesto l'ottimizzazione di alcune condizioni di processo, riguardanti in particolare la quantità d'acqua prevista dalla ricetta ed il tempo di cottura. L'ultima fase del processo di panificazione, infatti, è strategica non solo per lo sviluppo in volume del prodotto finito, ma anche per la sua umidità, parametro che per la nostra legislazione deve rispettare valori massimi in funzione della pezzatura. Nel caso specifico della sperimentazione, per panini di 60 g, l'umidità massima non deve superare il 30%.

Per la produzione del pane di riferimento, sono state aggiunte 60 parti di acqua su 100 parti di farina, ottenendo un impasto con il 44% di umidità; per la formulazione arricchita in fibra, è stato necessario aggiungere 68 parti di acqua, valore giustificato dal maggior assorbimento farinografico, ottenendo un impasto con il 46,4% di umidità. Relativamente al tempo di cottura, si è invece dovuto aumentare tale fase da 17 a 19 minuti. Tutti gli altri parametri di processo sono invece rimasti invariati: la lievitazione si è protratta per 30 minuti alla temperatura di 31° C con un tenore di umidità ambientale del 70%; infine, la temperatura del forno era di 230° C.

Accanto a questa tipologia di prodotto arricchito in fibra, si è inoltre cercato di sviluppare altre due referenze: una mini-brioche prodotta sempre con farina "Frenata" ed un pane in cassetta prodotto invece con semola rimacinata di grano duro alla quale è stata aggiunta la stessa miscela di fibre. Nel primo caso, sebbene siano state fatte numerose prove sperimentali condotte presso un copeker di Panem Italia S.p.A., non si è riusciti ad ottenere il prodotto voluto per problemi legati ad un insufficiente sviluppo, probabilmente a causa dell'elevato quantitativo d'acqua presente nell'impasto. Nel caso del pane in cassetta, invece, sono ancora in corso prove di panificazione a seguito dei primi risultati incoraggianti.

4.4 CARATTERIZZAZIONE DEI PRODOTTI FINITI

4.4.1 Proprietà fisiche del pane

La figura 4.5 mette in risalto l'aspetto delle due tipologie di pane. Il colore della crosta (Tabella 4.9) è risultato del tutto simile, come atteso sulla base di quanto osservato per le farine (Tabella 4.1). Il colore della mollica, invece, ha mostrato delle differenze tra i due campioni, sia per quanto riguarda il grado di bruno ($100-L^*$) che per il grado di giallezza (b^*). L'aggiunta di fibra in quantità rilevanti è infatti responsabile di un leggero inscurimento ($>$ indice di bruno) e di una "diluizione" dei carotenoidi, già presenti in bassa percentuale nella farina.



Figura 4.5 Nella foto si mostrano le due tipologie di pane: a sinistra il pane ottenuto con farina "Frenata" e a destra il pane ottenuto con farina Standard.

Tabella 4.9 Caratteristiche di colore delle due tipologie di pane.

		L* (luminosità)	100 – L* (grado di bruno)	a* (grado di rossezza)	b* (grado di giallezza)	a*/b* (tinta)
CROSTA	Pane prodotto con farina Standard	58,11 ± 3,47	41,89 ± 3,48	15,81 ± 1,32	31,33 ± 2,05	0,51 ± 0,05
	Pane prodotto con farina “Frenata”	57,07 ± 2,29	42,94 ± 2,3	15,75 ± 0,99	32,69 ± 1,94	0,48 ± 0,04
MOLLICA	Pane prodotto con farina Standard	80,95 ± 1,47	19,05 ± 1,48	- 1,57 ± 0,13	25,95 ± 0,46	- 0,06 ± 0,01
	Pane prodotto con farina “Frenata”	77,76 ± 0,73	22,24 ± 0,73	- 0,20 ± 0,13	17,29 ± 0,22	- 0,01 ± 0,01

Per quanto riguarda le caratteristiche correlate allo sviluppo in volume del pane, queste sono riassunte nella Tabella 4.10.

A parità di massa di impasto, il pane prodotto con farina “Frenata” è risultato caratterizzato da un volume specifico maggiore rispetto a quello dei pani prodotti con farina Standard (Tabella 4.9), risultato correlato sia al maggior sviluppo in volume (in accordo con quanto visto in precedenza con i risultati del test reofermentografico, Tabelle 4.5 e 4.6), che alla minor umidità riscontrata nella nuova tipologia.

Tabella 4.10 Peso, volume e volume specifico dei panini.

Campioni	Peso (g)	Volume (cm ³)	Volume specifico (cm ³ /g)
Pane prodotto con farina Standard	62,7 ± 3,18	272 ± 7	4,3 ± 0,2
Pane prodotto con farina “Frenata”	59,4 ± 5,28	312 ± 25	5,7 ± 0,4

Le tecniche di Analisi dell'Immagine utilizzate per la valutazione dell'alveolatura (Tabella 4.11) hanno infatti rilevato un'area media delle fette tendenzialmente superiore nel pane arricchito in fibra solubile, la percentuale ascrivibile all'area alveolata non ha presentato tuttavia sostanziali differenze tra i due prodotti: la superficie porosa rappresenta, infatti, il 37% circa di tutta la superficie della fetta in entrambe le tipologie. Anche il numero totale degli alveoli e la relativa area non evidenziano differenze tra le due tipologie di pane.

Tabella 4.11 Caratteristiche relative all'alveolatura del pane.

		Pane prodotto con farina Standard	Pane prodotto con farina "Frenata"
Numero totale alveoli		664 ± 126	633 ± 182
Area totale alveoli (mm ²)		1013,2 ± 107,9	1103,7 ± 171,4
Area media fette (mm ²)		2768,4 ± 309,3	3006,7 ± 450,6
Area alveolata (%)		36,7	36,8
Numero alveoli	piccoli	415 ± 69	354 ± 103
	medi	166 ± 51	178 ± 65
	grandi	85 ± 15	102 ± 20
Area media alveoli (mm ²)	piccoli	76,1 ± 14,8	67,9 ± 19,1
	medi	209,5 ± 66,5	234,9 ± 86,9
	grandi	727,7 ± 36,5	800,8 ± 121,5

Simile è apparsa anche la ripartizione dimensionale degli alveoli nelle tre classi dimensionali: fini (0,05 – 0,5 mm²), medi (0,5 – 3 mm²) e grossi (> 3 mm²) (Figura 4.6). In entrambe le tipologie di pane prevalgono, infatti, gli alveoli di grosse dimensioni che rappresentano più del 70% della superficie totale alveolata, seguiti dagli alveoli medi (più del 20%) e da quelli piccoli (circa il 7%). Sebbene la distribuzione percentuale non mostri differenze, queste sono presenti in valore assoluto: le immagini delle sezioni di pani (Figura 4.7) mostrano infatti come il pane arricchito in fibra abbia una maggior tendenza alla formazione di alveoli particolarmente grossi. Tale andamento, che giustifica il maggior volume osservato per questi prodotti, è con ogni probabilità dovuto alla presenza di fibra che sembra

favorire la fusione di alveoli di piccole/medie dimensioni, fenomeno riferito da altri autori (Wang *et al.*, 2002).

L'insieme dei risultati, che confermano quanto rilevato nei test reologici, assume particolare significato tecnologico in quanto la presenza di fibra solubile in quantità rilevanti non sembra influenzare l'attività fermentativa dei lieviti né provocare un sensibile peggioramento delle proprietà viscoelastiche del glutine e, dunque, dello sviluppo finale del prodotto.

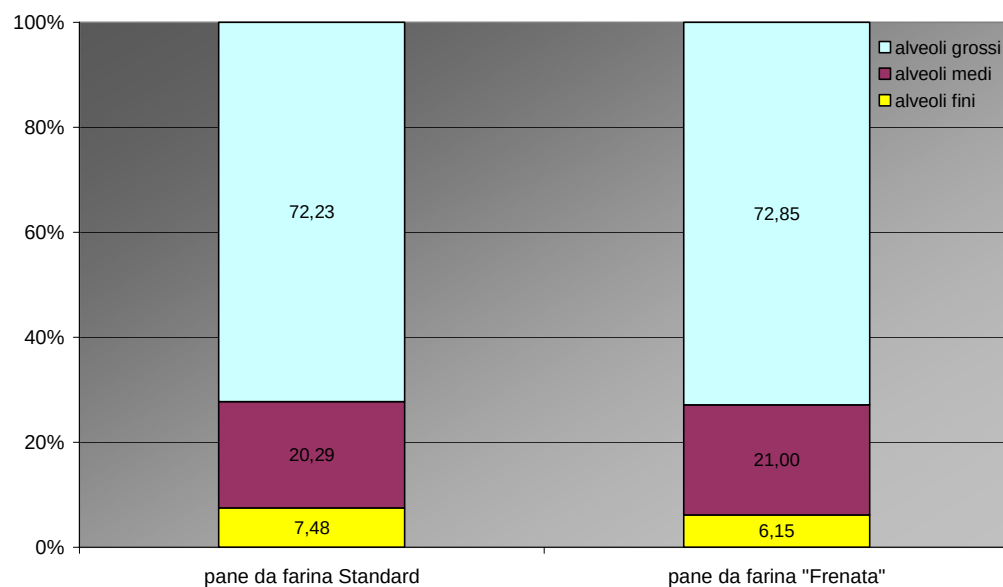


Figura 4.6 Ripartizione degli alveoli nelle categorie: fini (0,05 - 0,5 mm²), medi (0,5 - 3 mm²), grossi (> 3 mm²).

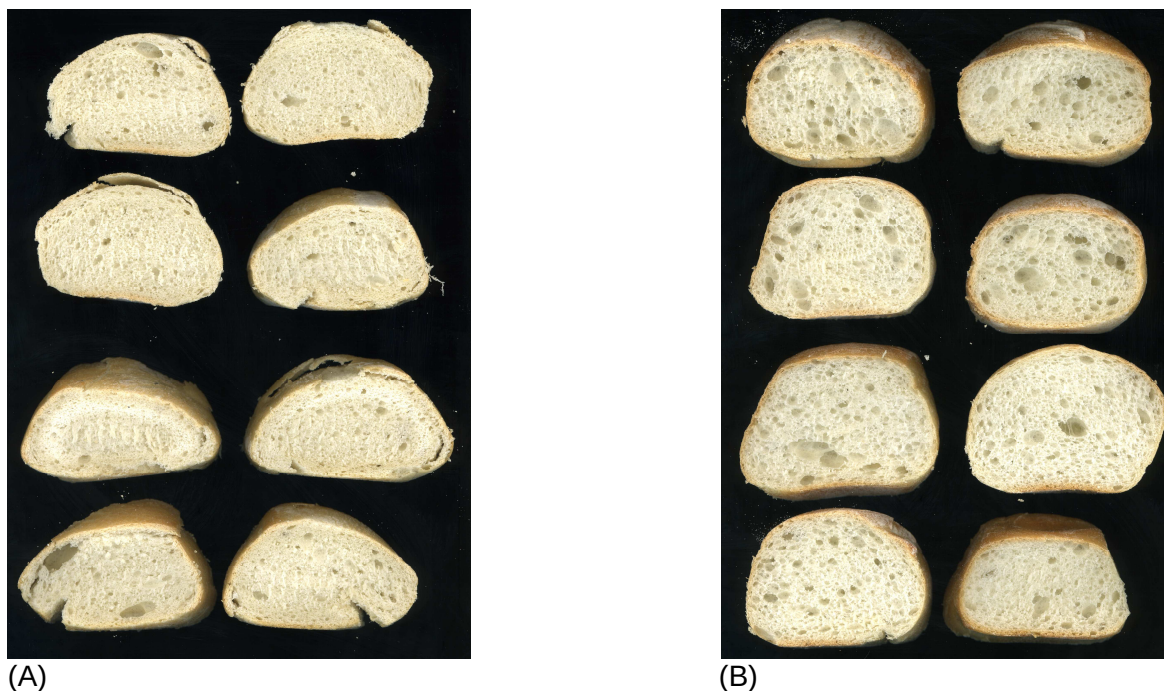


Figura 4.7 Immagini delle fette: (A) pane prodotto con farina Standard, (B) pane prodotto con farina “Frenata”.

4.4.2 Shelf-life del pane

Lo studio delle caratteristiche fisiche dei panini è stato completato mediante la valutazione della texture del prodotto a tempi di conservazione prefissati, come descritto nel Capitolo 3. Particolare attenzione è stata rivolta alla consistenza della mollica, valutata mediante test di compressione e descritta attraverso il modulo di Young, indice correlato al comportamento del prodotto a piccole deformazioni (Figura 4.8). E' stata, inoltre, valutata la forza mostrata dal campione al 25% di deformazione (Figura 4.9), condizione che simula maggiormente quanto percepito dal consumatore durante la masticazione (elevate deformazioni).

Il pane prodotto con farina “Frenata” presenta un modulo di Young statisticamente inferiore, e quindi una minore consistenza, già al tempo 0 (Figura 4.8); la mollica oppone anche una minore forza al 25% di deformazione (1,95 N rispetto a 3,98 N). Il pane ottenuto dalla farina di nuova formulazione appare, dunque, più soffice già all'uscita dal forno, proprietà probabilmente attribuibile al suo maggior volume specifico (vedi Tabella 4.10).

Nel corso della conservazione, come si può osservare dalle Figure 4.7 e 4.8, le curve relative ai due prodotti evidenziano una cinetica confrontabile fino a 6 ore di mantenimento a 23° C. Nelle prime ore di conservazione il fenomeno di raffermaimento, dunque, procede per entrambi i prodotti alla stessa velocità. Il pane di nuova formulazione rimane, comunque, caratterizzato da una consistenza inferiore rispetto a quello di riferimento, sia a piccole che grandi deformazioni.

La situazione cambia drasticamente per tempi più lunghi di conservazione: dopo 1 e 2 giorni, infatti, il pane prodotto con farina “Frenata” ha un modulo di Young e una forza al 25% di deformazione della mollica sensibilmente inferiori a quelli del campione Standard che, al contrario, è interessato ad un rapido raffermaimento. Questi dati sono in accordo con quanto riportato in letteratura (Gomez *et al.*, 2003): le caratteristiche di texture di campioni di pane arricchiti in fibra sono tali da assicurare un incremento della shelf-life del prodotto rispetto al pane ottenuto dalla sola farina bianca.

Come evidenziato nella Tabella 4.12, il raffermaimento più rapido dei panini prodotti con farina Standard è giustificato anche dalla più veloce perdita di umidità. Al termine delle 48 ore di conservazione, i panini prodotti con farina “Frenata” hanno un’umidità pari al 42,80% contro il 36,55% dei panini prodotti con farina normale. La migrazione di acqua dalla mollica verso la crosta e la successiva evaporazione è, infatti, ritenuta un fattore “chiave” nell’invecchiamento del pane in quanto contribuisce a formare una struttura più compatta per irrigidimento tra i siti in grado di formare legami idrogeno (Le-Bail *et al.* 2009).

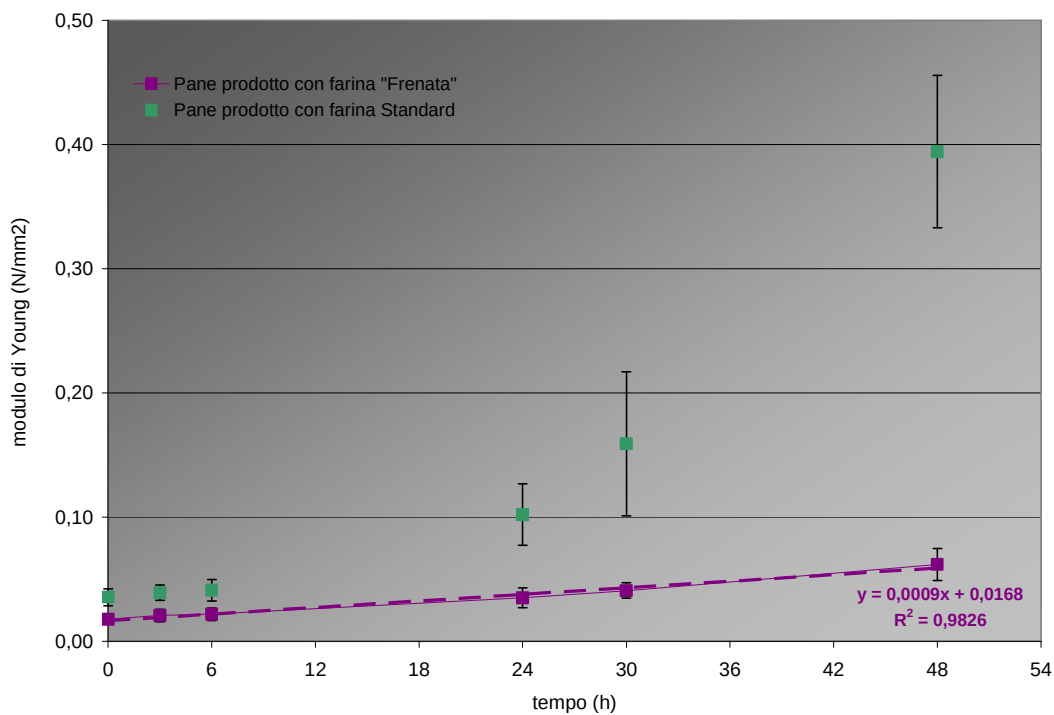


Figura 4.8 Variazione del modulo di Young della mollica durante la conservazione del pane.

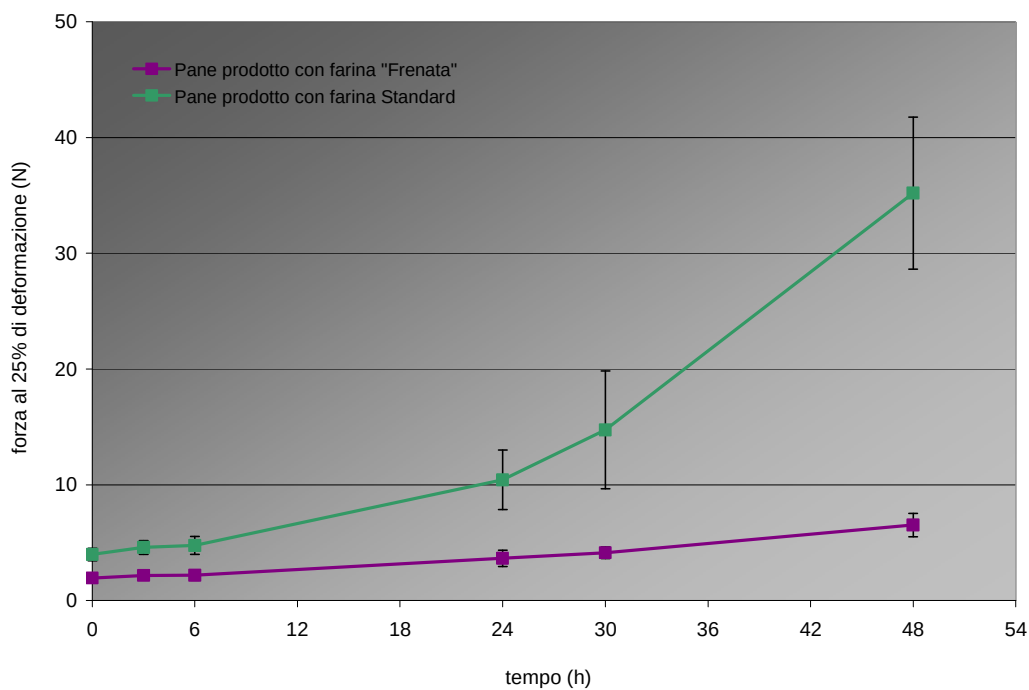


Figura 4.9 Variazione della forza al 25% di deformazione durante la conservazione del pane.

Tabella 4.12 Variazione dell'umidità della mollica dei campioni di pane durante la conservazione fino a 48 ore.

Conservazione (h)	Panini prodotti con farina Standard	Panini prodotti con farina "Frenata"
t 0	45,3 $\pm$ 0,12	46,4 $\pm$ 0,19
t 3	44,6 $\pm$ 0,94	46,4 $\pm$ 0,33
t 6	42,3 $\pm$ 4,69	46,7 $\pm$ 0,19
t 24	43,5 $\pm$ 0,88	45,7 $\pm$ 0,37
t 30	41,5 $\pm$ 2,44	43,4 $\pm$ 1,02
t 48	36,6 $\pm$ 0,60	42,8 $\pm$ 0,12

4.4.3 Caratteristiche chimiche del pane

La Tabella 4.13 riporta la composizione sommaria delle due tipologie di pane e il valore di attività dell'acqua (a_w).

Si può osservare che il contenuto in fibra solubile, che rappresenta almeno il 60% della fibra alimentare totale della nuova farina, è responsabile del maggior contenuto in acqua nel prodotto finito pari al 32,4% contro il 29,8% del pane di riferimento. L'umidità risulta perciò compresa nei limiti di Legge solo per il prodotto ottenuto da farina Standard: la nostra legislazione impone infatti un contenuto di umidità massima del 30% per i pani di pezzatura inferiore ai 70 g (Legge n. 580). Per la commercializzazione di questa nuova tipologia di pane si dovrà, quindi, prevedere una nuova ricetta (es. aumento della quota percentuale di fibra insolubile). Nonostante il più elevato contenuto di umidità, si può però osservare che i valori di attività dell'acqua sono identici in entrambi i campioni e si allineano con quelli generalmente riscontrati per questa tipologia di prodotto. Come atteso, vi è una sostanziale differenza del contenuto in fibra (Tabella 4.14); in particolare nel prodotto ottenuto da farina "Frenata", il contenuto in fibra totale è dell'8,9% sul tal quale, mentre nel prodotto convenzionale il contenuto è solo dell'1,6%. Questo risultato è giustificato dalla percentuale, compresa tra il 10 e il 15%, di fibra alimentare nella farina "Frenata".

Il tenore in amido del pane ottenuto da farina "Frenata" (Tabella 4.13), come atteso, è sensibilmente inferiore a quello del pane prodotto con farina Standard; questo dato è giustificabile dalla presenza di polisaccaridi non amido nella farina di nuova formulazione. Anche il contenuto in amido resistente (RS) risulta inferiore per il pane di nuova formulazione ma il quantitativo in amido disponibile rimane comunque nettamente più basso (36,76% contro 45,39%), dato di rilevante importanza per la riduzione dell'indice glicemico.

Il contenuto totale di zuccheri solubili non mostra sostanziale differenza tra i due prodotti ma, come si può osservare dalla Figura 4.10, cambia la ripartizione tra le varie frazioni di zuccheri. In particolare, il fruttosio è presente in quantitativi

nettamente superiori nel pane di nuova formulazione (0,98% contro 0,24%) mentre il maltosio è superiore nel pane prodotto con farina Standard.

Per quanto riguarda gli altri costituenti non si sono riscontrate importanti differenze se le quantità sono riferite alla sostanza secca.

Tabella 4.13 Proprietà chimico-fisiche e composizione sommaria delle due tipologie di pane.

Campione	Umidità (%)	aw	Ceneri		Proteine		Grassi	
			% t.q.	% s.s.	% t.q.	% s.s.	% t.q.	% s.s.
Pane prodotto con farina Standard	29,8 ± 0,01	0,96 ± 0,00	2,04 ± 0,01	2,91 ± 0,00	10,25 ± 0,12	14,60 ± 0,00	1,26 ± 0,10	1,80 ± 0,00
Pane prodotto con farina "Frenata"	32,4 ± 0,03	0,96 ± 0,00	1,62 ± 0,00	2,39 ± 0,00	9,91 ± 0,35	14,66 ± 0,01	1,02 ± 0,15	1,51 ± 0,00

Tabella 4.14 Caratteristiche della frazione glucidica delle due tipologie di pane.

Campione	Amido totale (TS)		Amido resistente (RS)		Amido disponibile		Zuccheri		Fibra totale	
	% t.q.	% s.s.	% t.q.	% s.s.	% t.q.	% s.s.	% t.q.	% s.s.	% t.q.	% s.s.
Pane prodotto con farina Standard	49,45 ± 1,72	70,44 ± 2,45	4,06 ± 0,35	5,78 ± 0,50	45,39 ± 1,67	64,66 ± 2,37	2,91 ± 0,03	4,14 ± 0,05	1,60 ± 0,40	2,30 ± 0,00
Pane prodotto con farina "Frenata"	40,12 ± 1,15	59,36 ± 1,70	3,36 ± 0,00	4,98 ± 0,00	36,76 ± 0,39	54,38 ± 0,58	3,11 ± 0,13	4,60 ± 0,19	8,90 ± 0,50	13,17 ± 0,01

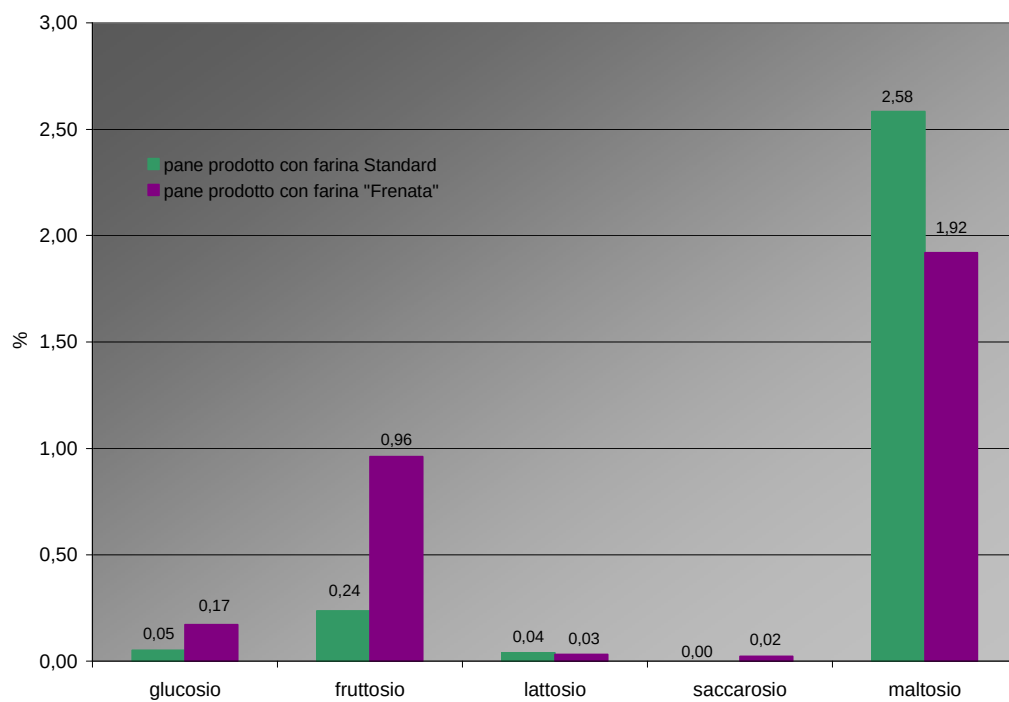


Figura 4.10 Ripartizione percentuale degli zuccheri (valori espressi sul tal quale).

4.5 PROVE *IN VIVO*

In seguito alla determinazione della composizione centesimale dei pani e delle caratteristiche fisiche degli stessi, si è passati alla valutazione degli effetti del consumo dei prodotti *in vivo* determinando l'Indice Glicemico dei pani oggetto della sperimentazione, al fine di verificare se la farina di nuova formulazione arricchita di fibre potesse modificare l'IG del pane, rispetto al pane ottenuto dalla farina Standard.

4.5.1 Soggetti e protocollo sperimentale

Lo studio è stato condotto su 10 soggetti sani (5 femmine e 5 maschi): in Tabella 4.15 sono riportati i dati antropometrici, l'età e i valori di glicemia basali dei volontari coinvolti nello studio.

Il gruppo di volontari coinvolti presenta valori medi di BMI nella norma; i valori di glicemia basali rilevati nei soggetti rientrano anch'essi nella norma.

Nei calcoli per la determinazione dell'IG dei pani, un soggetto è stato escluso in quanto la sua risposta glicemica in seguito al consumo di entrambe le tipologie di pani si presentava nettamente superiore rispetto a quella degli altri soggetti coinvolti nello studio.

Tabella 4.15 Dati relativi ai volontari che hanno preso parte alle prove *in vivo*.

n = 10 (5 femmine + 5 maschi)	Media $\pm$ Dev. Std.	Range
Età (anni)	22,2 $\pm$ 1,5	20 – 25
Altezza (m)	1,68 $\pm$ 0,07	1,59 – 1,80
Peso (kg)	62,7 $\pm$ 8,1	50 – 76
BMI (kg/m ²)	22,15 $\pm$ 1,5	19,53 – 24,22
Glicemie basali (mmol/ l)	4,16 $\pm$ 0,2	3,91 – 4,52

4.5.2 Determinazione del glucosio

Ciascun soggetto ha consumato, in ordine randomizzato con una frequenza di 2 volte alla settimana, i 5 “pasti test” (2 pani + 3 soluzioni di glucosio), contenenti ciascuno 50 g di carboidrati disponibili.

Le curve glicemiche post-prandiali indotte dal consumo dei diversi pasti test sono riportate in Figura 4.11. L’andamento della curva glicemica post-prandiale relativa al consumo di glucosio, mostra, come atteso, un netto picco a 30 minuti ed un ripristino dei valori basali entro 2 ore dall’inizio del test.

La curva glicemica ottenuta in seguito al consumo del pane di riferimento rileva valori in assoluto più contenuti rispetto al glucosio, ma con un picco a 45 minuti, accompagnato da un ritorno meno repentino ai valori basali dopo le due ore dall’inizio del test. Il profilo glicemico indotto dal consumo di pane ottenuto da farina “Frenata” mostra invece valori decisamente inferiori rispetto a quello rilevato per l’altro pane e con un picco sempre a 45 minuti.

I risultati ottenuti attestano quindi una riduzione della risposta glicemica post-prandiale, sicuramente attribuibile al contenuto in fibra del prodotto di nuova formulazione arricchito in fibra. Come riportato in letteratura da studi effettuati su impasti acidi, questi dati sono di rilevante importanza in quanto aiutano nel prevenire malattie, quali l’obesità ed il diabete di tipo 2, che sono in continua crescita nella popolazione (Katina *et al.*, 2005).

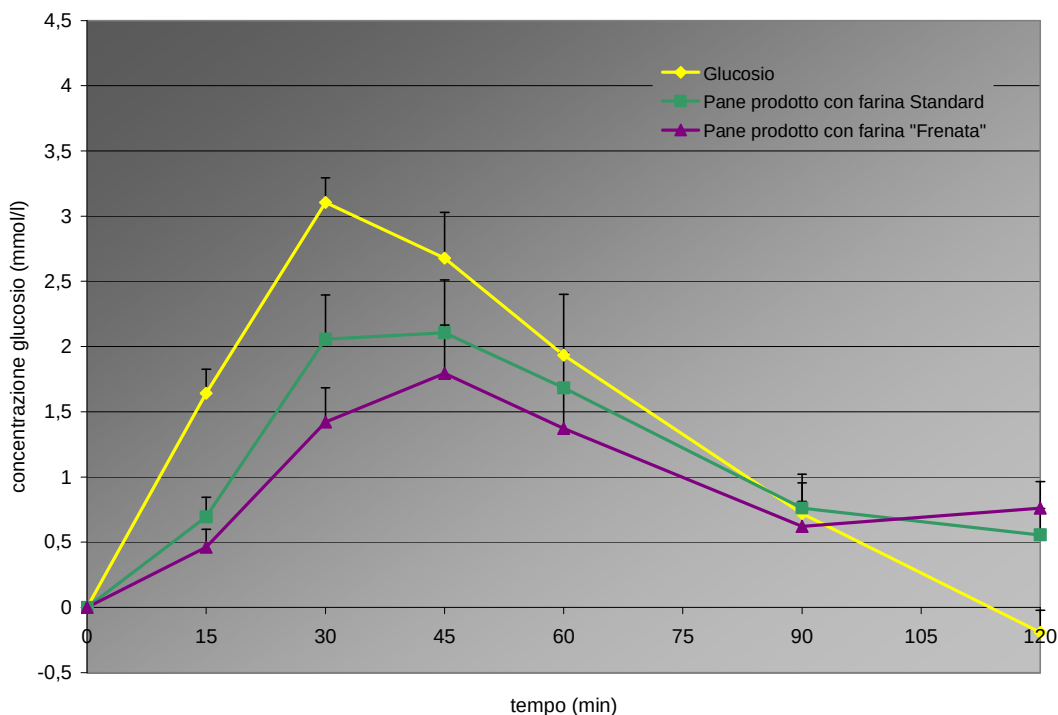


Figura 4.11 Curve glicemiche incremental valutate dopo consumo di glucosio e dei due pani.

L'analisi statistica RM-ANOVA condotta sulle medesime curve rivela che il tipo di pasto influenza in maniera significativa ($p < 0.05$) la glicemia post-prandiale. In particolare sono emerse differenze significative ($p < 0.05$) dal confronto statistico mediante test LSD tra i livelli glicemici valutati al tempo 30 minuti per le due tipologie di pane, tempo in cui i livelli glicemici del pane con farina "Frenata" risultano significativamente minori di quelli rilevati per il pane Standard. Dalle curve glicemiche ottenute sono state quindi calcolate le aree incrementali ad esse sottese derivando quindi i valori di IG dei prodotti testati.

Nella Figura 4.12 sono riportati i valori di IG delle due tipologie di pane. Come atteso il pane prodotto da farina "Frenata" formulato a partire da una farina arricchita di fibre (tra il 10 e il 15%) di cui non meno del 60% appartenenti alla frazione "solubile", mostra il valore di IG più basso (IG, 58,7) che risulta significativamente diverso ($p < 0,05$) da quello del riferimento (IG, 70,5). Questo risultato è in accordo con i dati riportati in letteratura ottenuti in formulazioni di pane contenenti diverse tipologie di

fibra solubile (Marangoni e Poli, 2007). Si è potuta quindi attestare una significativa riduzione, pari al 17% circa, dei valori di IG, attribuibile, verosimilmente, all'aggiunta di fibra solubile nella formulazione del prodotto.

Va comunque sottolineato che, nonostante i risultati incoraggianti relativi alla riduzione significativa dell'indice glicemico, il prodotto di nuova formulazione non potrebbe essere commercializzato come prodotto a basso IG, in quanto tale valore dovrebbe essere inferiore 55, mentre il pane oggetto di questo studio ha un IG pari a 58,7.

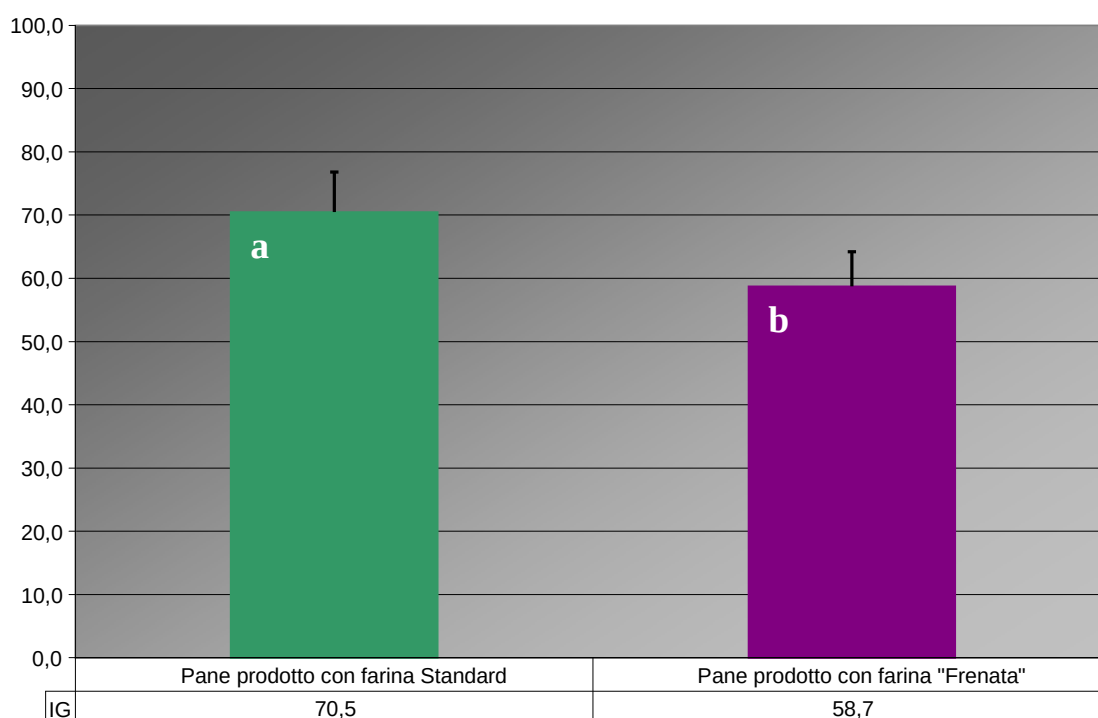


Figura 4.12 Indice Glicemico delle due tipologie di pane.
Le lettere diverse stanno ad indicare differenze significative ($p < 0,05$) per il test LSD.

5. CONCLUSIONI

La fase di caratterizzazione delle materie prime considerate in questo lavoro, ed in particolare i risultati ottenuti per gli indici reologici degli impasti da pane, hanno permesso di evidenziare che l'aggiunta di fibre promuove un maggior assorbimento di acqua senza compromettere la lavorabilità dell'impasto stesso.

Tuttavia, la grande affinità per l'acqua ha richiesto l'ottimizzazione di alcune fasi del processo di panificazione condotto su scala semi-industriale, sia per quanto concerne la quantità d'acqua prevista nella ricetta che il tempo di cottura.

Dall'analisi chimico-fisica dei prodotti finiti è emerso che l'aggiunta di fibre alla farina non comporta un peggioramento delle caratteristiche morfologiche dei pani, al contrario promuove un aumento del volume specifico; questo risultato, in accordo con i dati reologici, assume particolare significato tecnologico in quanto la presenza di fibra in quantità rilevanti non sembra influenzare l'attività fermentativa dei lieviti né provocare un sensibile peggioramento delle proprietà viscoelastiche del glutine e, dunque, del volume finale del prodotto. Inoltre, mediante il test di compressione e il monitoraggio dell'umidità durante 48 ore di conservazione, si è potuto osservare che, come atteso, l'aggiunta di fibre promuove un netto rallentamento del fenomeno di raffermaimento.

Infine, dai risultati ottenuti dalle prove *in vivo* si è riscontrato che l'impiego di farina "Frenata" nella produzione di pane è in grado di ridurre l'IG in modo significativo.

I risultati incoraggianti ottenuti da questo primo studio suggeriscono quindi di estendere la sperimentazione anche ad altre tipologie di pane, diverse per formulazione (semola, miscele di sfarinati, ecc.), pezzatura e modalità di formatura. Tuttavia, per poter commercializzare il prodotto, rimangono da rivedere un paio di parametri, sia per quanto riguarda l'umidità che il ridotto contenuto di indice glicemico. Nel primo caso sarà necessario modificare la ricetta per poter ridurre il quantitativo di acqua nel prodotto finito o rivedere alcuni parametri di processo per fare in modo che il prodotto rientri nei limiti imposti dalla nostra Legislazione. Per quanto riguarda l'Indice Glicemico si può dire che, pur avendo una minore quantità di carboidrati disponibili, tale prodotto non può ancora essere commercializzato con la

dicitura “a basso indice glicemico”, in quanto, per fregiarsi di questa dicitura il prodotto deve avere un IG < 55.

6. RIASSUNTO

La maggiore consapevolezza del legame esistente tra dieta e salute giustifica l'attuale interesse verso la formulazione di alimenti con proprietà funzionali, in grado di potenziare lo stato di salute dell'individuo e/o di prevenire alcune patologie. Le attuali linee guida per un'alimentazione sana e corretta propongono di aumentare il consumo di alimenti di origine vegetale ricchi in polisaccaridi e in fibra (soprattutto nella frazione solubile) e sostengono il ruolo positivo di alimenti a medio-basso indice glicemico, IG <70.

Tra gli alimenti a base di cereali, il pane comune è caratterizzato da alti valori di IG, attribuibili alla struttura alveolata ed all'elevata digeribilità dell'amido gelatinizzato in esso presente. L'esigenza di creare un pane a basso indice glicemico è giustificata dal fatto che questo è un alimento di base, consumato in quantità importanti in molti Paesi, anche al di fuori delle regioni dove è praticata la cosiddetta "Dieta Mediterranea".

Lo scopo del presente lavoro di tesi, condotto in collaborazione con la Società Panem Italia S.p.A. che produce pane fresco e sostitutivi del pane, è stato quello di confrontare la risposta glicemica data da un pane ottenuto da una farina di base, tipo 00, con un prodotto formulato con la stessa tipologia di farina ma arricchita con una miscela di fibre. Tale materia prima, recentemente brevettata con il nome di farina "Frenata"[®], contiene una quantità di fibra alimentare compresa tra il 10 e il 15%, di cui non meno del 60% è rappresentato da fibra "solubile". Le due tipologie di farina sono state messe a confronto, sia per quanto riguarda le caratteristiche compositive che le proprietà reologiche, valutate mediante i test empirici più comunemente utilizzati nel settore (test alveografico, test farinografico, test viscoamilografico e test reofermentografico). In particolare, l'aggiunta in fibra promuove un maggiore assorbimento di acqua nella formazione dell'impasto, ma non sembra influenzarne in maniera significativa la stabilità e la lavorabilità.

La produzione di pane (formato bocconcino da 55 g circa) mediante processo diretto condotto su scala semi-industriale (200 kg/ora) ha richiesto, nel caso dell'impiego di

farina “Frenata”, l’ottimizzazione di alcune condizioni di processo, riguardanti la quantità d’acqua aggiunta nella ricetta e il tempo di cottura.

Le due tipologie di pane sono state dapprima caratterizzate mediante indici fisici, in grado di descrivere lo sviluppo in volume e le caratteristiche di sofficità della mollica. Particolare attenzione è stata rivolta alla consistenza della mollica, valutata mediante test di compressione con l’apparecchio TA-HD Plus, Stable MicroSystem. Le variazioni di consistenza assieme a quelle dell’umidità, sono state monitorate per 48 ore dall’uscita dal forno su 30 panini conservati a 23° C per ogni tipologia, al fine di controllare se l’intensità del fenomeno di rafferimento fosse inferiore nella formulazione arricchita in fibra.

I pani prodotti con farina “Frenata” sono risultati caratterizzati da un volume specifico maggiore rispetto a quello dei pani prodotti con farina Standard (5,7 cm³/g contro 4,3 cm³/g), proprietà che giustifica la minor consistenza della mollica al tempo 0 (modulo di Young pari a 0,0178 N/mm² rispetto a 0,0357 N/mm²). Tuttavia, dall’analisi dell’alveolatura, non sono emerse sostanziali differenze tra i due prodotti: l’area alveolata rappresenta, infatti, il 37% circa di tutta la superficie della fetta in entrambe le tipologie, e del tutto simile è apparsa anche la ripartizione dimensionale degli alveoli nelle categorie fini (0,05 - 0,5 mm²), medi (0,5 - 3 mm²) e grossi (3 - 100 mm²). Questo risultato, in accordo con i dati reologici, assume particolare significato tecnologico in quanto la presenza di fibra in quantità rilevanti non sembra influenzare l’attività fermentativa dei lieviti né provocare un sensibile peggioramento delle proprietà viscoelastiche del glutine e, dunque, del volume finale del prodotto.

Per quanto riguarda i fenomeni di indurimento della mollica, le curve dei due prodotti evidenziano una cinetica simile fino a 6 ore di conservazione; trascorso tale tempo, il pane prodotto da farina Standard è interessato ad un rapido rafferimento rispetto a quello ottenuto da farina “Frenata”: la consistenza del primo prodotto è più elevata di circa 2 volte dopo 24 ore e di circa 5 volte dopo 48 ore.

L’arricchimento in fibra della farina giustifica le differenze compositive osservate tra le due tipologie di pane. In particolare, il contenuto in fibra totale è risultato pari all’1,6% nel campione di riferimento ed è salito all’8,9% nel campione da farina “Frenata”; il fruttosio è presente in maggior quantità nella nuova tipologia (0,96% contro 0,24%),

mentre il contenuto in amido totale ed amido resistente al tempo 0 sono sensibilmente inferiori (40,1% e 3,4% rispettivamente) rispetto al riferimento (49,4% e 4,1% rispettivamente).

I profili glicemici post-prandiali (rilevati su 10 assaggiatori in buono stato di salute) in seguito al consumo delle differenti tipologie di pane sono risultati nettamente diversi. Dalle curve glicemiche incrementali è stato quindi calcolato l'IG dei pani; tali valori sono risultati significativamente diversi, con un valore di IG di 70,5 per il pane "Normale" (valore analogo a quelli riportati in letteratura per questo alimento) e di 58,7 per il pane da farina "Frenata". Si è potuta quindi attestare una significativa riduzione, pari del 17% circa, dei valori di IG, attribuibile, verosimilmente, all'aggiunta di fibra solubile nella formulazione del prodotto.

I risultati incoraggianti ottenuti da questo primo studio suggeriscono di estendere la sperimentazione anche ad altre tipologie di pane, diverse per formulazione (semola, miscele di sfarinati, ecc.) e/o pezzatura.

7. BIBLIOGRAFIA

- Ashwini A., Jyotsna R., Indrani D. *Effect of hydrocolloids and emulsifiers on the rheological, microstructural and quality characteristics of eggless cake (abstract)*. Food Hydrocolloids 23 (3): 700-707, 2009.
- Brand J.C., Colagiuri S., Crossman S., Allen A., Roberts A., Truswell A.S. *Low glycemic index foods improve long-term glycemic control in NIDDM*. Diabetes care, 14:95-101, 1991.
- Brand J.C., Nicholson P.L., Thorburn A.W., Truswell A.S. *Food processing and the glycemic index*. Am J Clin Nutr, 42:1192-1196, 1987.
- Brennan M.A., Merts I., Monro J., Woolnough J., Brennan C.S. *Impact of guar gum and wheat bran on the physical and nutritional quality of extruded breakfast cereals*. Sarch-starke 60 (5): 248-256, 2008.
- Casiraghi E., Pagani M.A. - Dispense del corso di *Micro e macro struttura degli alimenti*, 2008.
- Cavallero A., Empilli S., Brighenti F., Stanca A.M. *High (1 → 3, 1 → 4) – β glucan barley fractions in bread making and their effects on human glycemic response*. J Cereal Sci, 36:59-66, 2002.
- Decreto Legge 9 febbraio 2001, n.187.
- FAO/WHO, *Report of the joint FAO/WHO Expert Consultation on Carbohydrates in human nutrition*. FAO Food and Nutrition Paper 66:1-140, 1998.
- Foster-Powell K., Holt K., Brand Miller J.C. *International table of glycemic index and glycemic load values*. Am J Clin Nutr, 76:5-56, 2002.
- Gatti E., Testolin G., Brighenti F., Buzzetti G.P., Porrini M., Sirtori C.R. *Plasma glucose and insulin response to carbohydrate food (rice) with different thermal processing*. Ann Nutr Metab, 31:296-303, 1987.
- Gomez M., Ronda F., Blanco C.A., Caballero P.A., Apesteguia, A. *Effect of dietary fibre on dough rheology and bread quality*. European food research and technology 216 (1): 51-56, 2003.

- Granfeld Y; Bjorck I. *Glycemic response to starch in pasta: a study of mechanism of limited enzyme availability*. J Cereal Sci, 14:47-61, 1991.
- Hoebler C., Karinthe A., Chiron H., Champ M., Barry J.L. *Bioavailability of starch in bread rich in amylose: metabolic responses in healthy subjects and starch structure*. Eur J Clin Nutr, 53:360-366, 1999.
- Holm J., Bjorck I. *Effect of thermal processing of wheat on starch: enzymatic availability*. J Cereal Sci, 8:105-112, 1988.
- Jarvi A.E., Karlton B.E., Granfeld Y.E., Bjorck I.E. *Improved glycemic control and lipid profile normalized fibrinolytic activity on a low – glycemic index diet in type 2 diabetic patients*. Diabetes care, 22:10-18, 1999.
- Jenkins D.J.A., Wolever T.M., Collier G.R., Ocana A., Rao A.V., Buckley G., Lam Y., Mayer A., Thompson L.U. *Metabolic effects of a low glycemic diet*. Am J Clin Nutr, 46:968-975, 1987.
- Katina K., Arendt E., Liukkonen K.H., Autio K., Flander L., Poutanen K. *Potential of sourdough for healthier cereal products*. Food science & technology 104-112, 2005.
- Le-Bail A., Boumali K., Jury V., Ben-Aissa F., Zuniga R. *Impact of the baking kinetics on staling rate and mechanical properties of bread crumb and degassed bread crumb*. Journal of Cereal Science 235-240, 2009.
- Legge n. 580 (4 luglio 1967) - DPR n. 502 (30 novembre 1998).
- Liljeberg H., Bjorck I.M.E. *Delayed gastric emptying rate as a potential mechanism for lowered glycemia after eating sourdough breads: studies in humans and rats using test products with added organic acids or an organic salt*. Am J Clin Nutr 64:886-93, 1996.
- Liljeberg H., Granfeldt Y., Bjorck I. *Metabolic responses to starch in bread containing intact kernel versus milled flour*. Eur J Clin Nutr 46:561-575, 1992.
- Liljeberg H., Lonner C., Bjorck I.M.E. *Sourdough fermentation or addition of organic acids or corresponding salts to bread improves nutritional properties of starch in healthy humans*. J Nutr, 125:1504-1511, 1995.

- Lucisano M. - Dispense del corso di *Processi delle tecnologie dei prodotti alimentari*, 2005.
- Ludwing DS. *The glycemic index. Physiological Mechanism relating to obesità, diabetes and cardiovasculad disease*. JAMA, 287:2414-2423, 2002.
- Marangoni F., Poli A. *The glycemic index of bread and biscuits is markedly reduced by the addition of a proprietary fiber mixture to the ingredients*. - In: *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 2008.
- Mather K., Anderson T.J., Verma S. *Insulin action in the vasculature: physiology and pathophysiology*. J Vasc Res, 38:415-422, 2001.
- Ostman E.M., Frid A.H., Groop L.C., Bjorck I.M.E. *A dietary exchange of common bread for tailored bread of low glycaemic index and rich in dietary fibre improved insulin economy in young women with impaired glucose tolerance*. Eur J Clin Nutr, 60:334-341, 2006.
- Ostman EM; Nilsson M; Liljeberg H; Molin G; Bjorck IME. *On the effect of lactic acid on blood glucose and insulin responses to cereal products: mechanistic studies in healthy subjects and in vitro*. J Cereal Sci, 36:339-346, 2002.
- Pagani M.A. - Dispense del corso di *Tecnologie dei cereali e derivati*, 2007.
- Pagani M.A., Manzoni M. *Prodotti da forno*. - In: *Biotechnologie Alimenatri*; C. Gigliotti, R. Verga. - Padova: Piccin, 2007 - p. 85-110.
- Prosky L., Asp N. G., Schweizer T., De Vries J. W., Furda I. *Determinotion of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study*. J Assoc Off Anal Chem, 1989.
- Rosell C.M., Santos E., Collar C. *Physico-chemical properties of commercial fibres from different sources: A comparative approach*. Food research international 42 (1): 176-184, 2009.
- Ross S., Brand JC., Thorburn AW., Trustwell AS. *Glycemic index of processed wheat products*. Am J Clin Nutr, 46:631-635, 1987.
- Sudha M.L., Vetrmani R., Leelavathi K. *Influence of fibre from different cereals on the rheological characteristics of wheat flour dough and on biscuit quality*. Food Chemistry, 2007.

- Tovar J., Bjork I., Asp N.G. *Digestibility of starch and legumes using the rat*. Eur J Clin Nutr, 46:S141-S142, 1992.
- Wang J.S., Rosell C.M. *Effect of the addition of different fibres on wheat dough performance and bread quality*. Food Chemistry, 79 (2): 221-226, 2002.
- Wolever T.M.S., Vorster H.H., Bjorck J. *Determination of the glycemic index of foods: interlaboratory study*. Eur J Clin Nutr, 57:475-82, 2003.
- www.coldiretti.it
- www.glycemicindex.com/main.htm
- www.pianetapane.it

8. APPENDICE

Di seguito si presentano le schede ed il questionario proposti ai soggetti ad ogni seduta.

DATA	PROVA N°	CODICE VOLONTARIO	
NOME		COGNOME	
ETÀ	ALTEZZA (CM)	PESO (KG)	
CARICO ORALE DI	COD ALIM.	TIPO	

Tempi di prelievo (0' = inizio consumo pasto)

0'	15'	30'	45'	60'	90'	120'	180'

Tempi di consumo del pasto: _____

Palatabilità

Molto sgradevole							Molto gradevole
-3	-2	-1	0	1	2	3	

Fig. 8.1 Scheda per segnare i tempi di prelievo e i propri dati personali.

QUESTIONARIO

- Ha assunto farmaci e/o integratori alimentari (vitamine, fibra, ecc.) nelle 24 h precedenti il test ?

Sì	No
----	----

Se sì, quali ?

(indicare il nome commerciale e la quantità assunta)

- Avvenimenti o circostanze inusuali nelle 24 h prima del test ?
- Stati di malessere prima del test (es. nausea, capogiri) ?
- Attività fisica svolta nelle 24 h prima del test (tipo e durata) ?
- Vi siete coricati alle ore ? _____ Totale ore di sonno ? _____

Tipo di sonno:

normale	agitato	insonne
---------	---------	---------

- Alimenti assunti la sera precedente il test:

indicare la quantità di cibi secondo il memorandum allegato, la quantità degli alimenti dovrà essere misurata con una bilancia, in assenza esprimere la quantità in misure casalinghe: es. un cucchiaino di pasta, 1 bicchiere di vino, 1 tazza di latte, 1 piatto fondo di minestra...

inizio _____ fine della cena _____

Fig. 8.2 Questionario circa le attività realizzate le 24 ore prima di effettuare il test.

COMPOSIZIONE DEL PASTO		
	TIPO	QUANTITÀ
Bevande (acqua con o senza gas, vino, birra, ecc.)		
Antipasti		
Pane o surrogati		
Primo piatto		
Condimento usato		
Secondo piatto		
Condimento usato		
Contorno		
Condimento usato		
Formaggio		
Frutta		
Dessert		
Caffè o tè		
Zucchero o altro dolcificante		
Liquori		
Spuntino dopo cena		
Inizio spuntino	Fine spuntino	
Alimenti	Bevande	

Fig. 8.3 Scheda riguardante la composizione del pasto della sera precedente al test.