



*PROGRAMMA DI SVILUPPO RURALE (PSR) Regione Toscana 2007-2013 - Reg. CE 1698/2005  
Bando multimisura per Progetti Integrati di Filiera (PIF) – Annualità 2012*

*Progetto Integrato di Filiera (PIF)*

*“Il Pane del grano toscano prodotto in accordo al disciplinare proposto per la protezione comunitaria di origine DOP”*

***Misura 124 “Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nei settori agricolo e alimentare e in quello forestale”***

***Progetto “Innova pane (DOP) - Processi innovativi per la produzione del “Pane Toscano a lievitazione naturale (DOP)”***

**Relazione finale**



Comunità Europea  
Fondo Europeo agricolo  
per lo sviluppo rurale (FEASR)  
L'Europa investe nelle zone rurali



Finalità del progetto “INNOVA PANE (DOP) - Processi innovativi per la produzione del “Pane Toscano a lievitazione naturale (DOP)” è stata quella di individuare le informazioni tecnico-scientifiche necessarie a facilitare e a rendere più spedite le fasi di avvio e di consolidamento della produzione del pane prodotto in accordo al disciplinare presentato dal consorzio di tutela del “Pane Toscano a lievitazione naturale” (DOP) per il conseguimento del riconoscimento comunitario.

Con riferimento al par. 5.2 “Fasi di attuazione del progetto” dell’Allegato F del bando PIF fase 2 presentato in sede di domanda iniziale, nella tabella seguente viene riportato l’elenco delle attività previste in fase progettuale e nella relazione tecnica viene riportata la descrizione delle attività svolte e dei principali risultati raggiunti.

<b>Fase progettuale</b>	<b>Azioni previste per le varie fasi progettuali</b>	<b>Partner attuatore</b>
Fase 1 Costituzione ATS e gestione della rete di cooperazione	F1.1 Costituzione ATS	Molino F.Ili Giambastiani Srl
	F.1.2 Gestione della rete di cooperazione	Molino F.Ili Giambastiani Srl
Fase 2 Prove sperimentali sulle risposte produttive da parte delle varietà di maggior interesse per la filiera del “Pane toscano”	F2.1 Individuazione delle varietà	DISPAA - UNIFI
	F2.2 Messa a punto del disegno sperimentale	DISPAA - UNIFI
	F2.3 Allestimento e gestione dei campi sperimentali	Società Agricola F.Ili Bimbi s.s.
	F2.4 Monitoraggio fenologico e produttivo, caratterizzazione pedo-climatica	DISPAA - UNIFI
	F2.5 Valutazione dell’uso di informazioni telerilevate per il monitoraggio della coltura	DISPAA - UNIFI
	F2.6 Analisi delle farine	DISPAA - UNIFI
Fase 3 Messa a punto di un modello per la previsione della qualità del prodotto	F3.1 Sviluppo del modello	DISPAA - UNIFI
	F3.2 Validazione del modello	DISPAA - UNIFI
Fase 4 Isolamento e identificazione delle popolazioni microbiche presenti nella madre acida	F4.1 Isolamento e identificazione delle popolazioni microbiche presenti nella madre acida adottata dal “Consorzio Pane Toscano a Lievitazione Naturale” (CPT)	DiSAAA-a -UNIFI Pisa/micro
Fase 5 Valutazione delle possibili alterazioni indotte sul sistema lievitante (madre	F5.1 Valutazione delle possibili alterazioni indotte sulle caratteristiche chimiche –composizionali degli impasti e del prodotto finito, dalle condizioni ambientali e di lavorazione adottate nelle diverse realtà produttive	DiSAAA-a -UNIFI Pisa/tecalim

acida) e quindi sulle caratteristiche degli impasti e del prodotto finito, dalle condizioni ambientali e di lavorazione	F5.2 Valutazione delle possibili alterazioni microbiologiche indotte sul sistema lievitante dalle condizioni ambientali e di lavorazione adottate nelle diverse realtà produttive	DiSAAA-a -UNIFI Pisa/micro
Fase 6 Individuazione delle condizioni operative ottimali da impiegare nel corso del processo di liofilizzazione della madre acida al fine di indurre le minor alterazioni possibili agli equilibri microbiologici e chimico-composizionali esistenti all'interno della madre acida adottata dal CPT	F6.1 Individuazione delle condizioni operative ottimali da impiegare nel corso del processo di liofilizzazione della madre acida e monitoraggio delle possibili alterazioni chimico-composizionali	DiSAAA-a -UNIFI Pisa/tecalim
	F6.2 Monitoraggio delle possibili alterazioni indotte dal processo di liofilizzazione sugli equilibri che intercorrono tra le popolazioni microbiche presenti nella madre acida	DiSAAA-a -UNIFI Pisa/micro
Fase 7 Valutazione delle caratteristiche microbiologiche e chimico-composizionale degli impasti e delle caratteristiche organolettiche del pane da questi prodotto, al variare della tecnica agronomica di coltivazione della farina adottata.	F7.1 Valutazione delle caratteristiche chimico-composizionale degli impasti e delle caratteristiche organolettiche del pane da questi prodotto, al variare della tecnica agronomica di coltivazione della farina utilizzata	DiSAAA-a -UNIFI Pisa/tecalim
	F7.2 Valutazione delle caratteristiche microbiologiche degli impasti al variare della tecnica agronomica di coltivazione della farina utilizzata	DiSAAA-a -UNIFI Pisa/micro
Fase 8 Costituzione di un archivio dei dati chimico-analitici e sensoriali e di una banca del	F8.1 Costituzione di un archivio dei dati chimico-analitici e sensoriali del "Pane Toscano a lievitazione naturale (DOP)"	DiSAAA-a -UNIFI Pisa/tecalim

germoplasma	F8.2 Costituzione di una banca del germoplasma dei microrganismi della madre acida del “Pane Toscano a lievitazione naturale (DOP)”	DiSAAA-a -UNIFI Pisa/micro
Fase 9 Divulgazione/Trasferimento delle conoscenze	F9.1 Divulgazione/Trasferimento delle conoscenze disponibili in letteratura ed acquisite nel corso delle attività previste dalla misura 124, condotte dal Capofila in collaborazione con i Dipartimenti universitari (DISPAA - UNIFI e DiSAAA-a -UNIFI) coinvolti nel progetto.	Molino F.Ili Giambastiani Srl
Fase 10 Progettazione e sviluppo di un sistema di tracciabilità e rintracciabilità di filiera	F10.1 Progettazione e sviluppo di un sistema informativo per la gestione centralizzata dei dati relativi alle materie prime in entrata e ai prodotti in uscita presso ogni singola realtà produttiva coinvolta nella filiera del “Pane toscano a lievitazione naturale (DOP)”	Molino F.Ili Giambastiani Srl
	F10.2 Identificazione di eventuali identificatori chimico composizionali (markers) in grado di contraddistinguere in modo inequivocabile il prodotto finito	DiSAAA-a -UNIFI Pisa/tecalim

## RELAZIONE TECNICA

### INTRODUZIONE

La variabilità pedo-climatica di un territorio rappresenta un fattore determinante per le condizioni nutrizionali che influenzano le performance produttive di una coltura, anche all'interno dello stesso appezzamento. Lo studio delle dinamiche e delle influenze reciproche tra suolo, clima, genetica e pratiche colturali **risulta** quindi essenziale per mettere a punto sistemi di supporto ai piani di gestione agronomica. L'analisi dei principali rapporti di causa-effetto fra parametri ambientali e colturali è supportato oggi da moderni e innovativi strumenti per il monitoraggio della coltura (stazioni meteorologiche, immagini satellitari, strumentazione diagnostica per la coltura, ecc.) e dalla messa a punto di modelli agrometeorologici per la simulazione dello sviluppo e della crescita delle piante. I modelli di simulazione, applicati in ambito agricolo a partire dagli anni '80, hanno scopi di ricerca, gestionali e di pianificazione in quanto capaci di dare indicazioni sui tempi e modalità degli interventi agronomici e sulle loro possibili conseguenze, fornendo previsioni sullo stato e sui risultati produttivi delle colture. I modelli di simulazione vengono impiegati, in modo particolare, dai Servizi Regionali che operano in agricoltura, anche se il loro utilizzo può estendersi anche a livello di assistenza tecnica o di singola azienda. Il loro uso operativo in agricoltura ad oggi è legato ad applicazioni localizzate, rivolte soprattutto alle colture a maggiore redditività del settore viticolo e orto-frutticolo, mentre l'uso per il supporto alla gestione di coltivazioni estensive e sistemi produttivi organizzati, trova ancora difficoltà e rende questo ambito suscettibile di sviluppi e miglioramenti.

L'uso di modelli colturali, adeguatamente calibrati e validati, permette di simulare, con un certo margine di accuratezza e affidabilità, le potenzialità produttive delle colture soprattutto se alimentati con informazioni pedo-climatiche e gestionali di una determinata area. In tal senso il modello costituisce uno strumento efficace per valutare l'importanza o l'utilità di determinanti interventi colturali (come ad esempio le concimazioni) al fine di contenere i costi di produzione mantenendo una determinata produttività. L'impiego della modellistica a livello previsionale può inoltre risultare molto utile per rimodulare e tarare il piano delle operazioni colturali (es. concimazioni correttive, interventi fitosanitari, ecc.) nella fase terminale del ciclo produttivo: nella coltivazione del frumento tenero tale prospettiva risulta particolarmente interessante poiché la qualità e quantità delle produzioni è strettamente influenzata dalle ultime fasi fenologiche del ciclo produttivo legate al riempimento e maturazione della granella.

Dato che l'efficacia delle operazioni colturali risulta fortemente influenzata dall'evoluzione meteorologica, è fondamentale, avvalendosi del supporto fornito dalla modellistica, riuscire a ottimizzare le scelte agronomiche in modo da massimizzare gli effetti positivi sulla produzione e ridurre gli sprechi. Nell'ambito degli interventi che l'agricoltore può programmare su queste basi, sicuramente vi sono le fertilizzazioni azotate, di particolar rilievo in relazione al loro potere di influenzare le dinamiche di crescita della pianta e quindi le tendenze dei raccolti: sia la quantità che la qualità delle produzioni risultano infatti strettamente dipendenti dalle disponibilità di azoto nel terreno.

In tale contesto, un modello colturale è stato applicato per la valutazione delle potenzialità produttive dell'area oggetto di studio in funzione delle caratteristiche climatiche e pedologiche della zona. L'analisi è stata condotta tramite la costruzione di curve della resa quanti-qualitativa potenziale, delle varietà di frumento tenero analizzate, in risposta a dosi crescenti di concimazione azotata.

La prima parte del progetto, finalizzata all'ottenimento di grano tenero di qualità, si è sostanziata nella messa a punto e calibrazione di un modello previsionale di carattere semiempirico, utile come supporto decisionale per i piani di fertilizzazione al fine di standardizzare la qualità del prodotto finale.

La modellistica si è focalizzata sino ad oggi sulla stima delle rese e del contenuto di proteine nel prodotto, piuttosto che su parametri specifici (es. concentrazione e composizione del glutine, forza, tenacia, elasticità, ecc.) che concorrono alla determinazione della panificabilità delle farine, e quindi della qualità dei prodotti derivati. In tale contesto, il modello proposto sarà in grado di fornire indicazioni per l'ottimizzazione dei piani di concimazione, al fine di stabilizzare proprio quest'ultimi parametri specifici e quindi mantenere costanti gli standard qualitativi del pane derivato. Sia il modello che il sistema di produzione agronomica che esso supporta coinvolgono aspetti innovativi che concorrono al superamento dei limiti esistenti all'affermazione della filiera del 'Pane Toscano DOP a lievitazione naturale'.

L'industria panificatoria, infatti, consegue materie prime con idonee proprietà, atte alla trasformazione in un prodotto dalle caratteristiche costanti nel tempo, attraverso la realizzazione di miscele tra farine aventi diversi attributi ma che concorrono nel loro complesso a creare un substrato di partenza definito ed omogeneo rispondente a determinati requisiti qualitativi. Ad oggi tali miscele vengono realizzate acquistando sul mercato le materie prime necessarie alla correzione della qualità delle farine prodotte localmente, nelle annate in cui la combinazione tra i

fattori gestionali e ambientali non consente il raggiungimento degli standard. Nel caso della produzione di pane DOP invece, l'approvvigionamento delle materie prime deve avvenire esclusivamente a livello locale. Pertanto emerge una nuova esigenza rispetto al passato, quella di mettere a punto strumenti atti a guidare le scelte agronomiche, al fine di correggere le tendenze previste per la qualità del raccolto e mantenere alti e costanti i livelli qualitativi.

I caratteri innovativi del modello proposto consistono nell'uso integrato di più fonti dati, che vanno dalle informazioni sullo stato della coltura ottenute da immagini satellitari, a dati di stazioni meteorologiche che restituiscono le misure on-line in tempo reale, a terra. I modelli ad oggi disponibili per il frumento consentono di simulare o descrivere i principali parametri di crescita, sviluppo e produzione della coltura con una buona copertura temporale ma scarsa risoluzione spaziale. In tale contesto l'implementazione di dati telerilevati nel modello rappresenta sicuramente un valore aggiunto in grado di rendere operativa una realtà fino ad oggi confinata in ambito scientifico. Inoltre, parallelamente, l'utilizzo di indici climatici e previsioni stagionali consente di proiettare avanti nel tempo la risposta vegeto produttiva della pianta ed applicare un modello di simulazione in ambito previsionale.

L'integrazione tra modellistica agro-meteorologica con indici vegetazionali telerilevati e le altre fonti dati descritte, rappresenta un aspetto innovativo, consentendo di estendere la validità del modello dal semplice ambito dell'intorno del punto su cui si è fatta la simulazione, all'intero territorio telerilevato. Questo può rendere l'innovazione di processo, supportata dal modello stesso, trasferibile sull'intero areale produttivo. Il modello infatti fornirà non soltanto informazioni sulle produzioni a livello aggregato, per la pianificazione di settore, ma soprattutto sarà in grado di guidare le scelte in-itinere degli agricoltori andando incontro alle esigenze operative di un distretto rurale e delle singole aziende che lo compongono.

Inoltre la gran parte degli studi realizzati in questo campo si concentrano sulla validazione di dati telerilevati con strumentazioni ottiche di misura a terra, mentre il sistema innovativo per la produzione di frumento tenero si baserà sull'impiego di dati da satellite, tenendo conto del gran valore applicativo di tale opzione. L'uso di informazioni provenienti da piattaforme satellitari, infatti, consente di fare a meno dei monitoraggi in campo e quindi di inserire le informazioni da remote sensing in un sistema automatizzato per il processamento delle immagini, l'elaborazione di indici e la loro implementazione nel modello integrato. Lo strumento di supporto così proposto rende l'output fruibile nel lungo periodo e va incontro alle esigenze della realtà pratica, poiché

esente dai costi onerosi, per infrastrutture e personale, necessari a mantenere una rete di monitoraggio a terra efficiente nel tempo e nello spazio.

Il modello integrato potrà favorire l'attuazione di un sistema di produzione innovativo per il frumento tenero che prevede, in epoca di antesi (fra la prima e la seconda decade di maggio), la distribuzione di concimi fogliari azotato-solforici allo scopo di correggere la qualità del raccolto. Questa rappresenta una pratica di intervento agronomico non convenzionale che permette all'agricoltore di 'aggiustare il tiro', in particolar modo nelle annate per le quali sono previste elevate rese e quindi un effetto di diluizione del glutine nella cariosside. Lo strumento sviluppato nell'ambito del progetto, essendo in grado di fornire preziose indicazioni sullo stato vegetazionale della coltura e prevederne le performance produttive, con un discreto grado di copertura spaziale, potrà supportare l'ottimizzazione dei piani di fertilizzazione e la calibrazione delle dosi per la concimazione tardiva. Tali aspetti sono particolarmente interessanti sia per una zona come quella della Val d'Elsa nella quale le aspettative di raccolto sono tendenzialmente basse e la promozione della qualità dei prodotti riveste un ruolo chiave, sia per le aree limitrofe (es. Val di Chiana) soggette alla direttiva nitrati.

Parallelamente alle attività portate avanti dal DISPAA-UNIFI con la soc. agr. F.lli Bimbi s.s. sono state condotte attività di sviluppo e sperimentazione da parte dei ricercatori del DiSAAA-a -UNIFI in collaborazione con il Molino F.lli Giambastiani e alcuni forni aderenti al CPT e firmatari dell'Accordo di filiera.

Poiché la madre acida costituisce un chiarissimo esempio della stretta interazione che intercorre negli alimenti fermentati, tra la tecnologia di produzione adottata, l'evoluzione delle popolazioni microbiche coinvolte in questa preparazione e le caratteristiche organolettiche assunte dal prodotto finito, particolare attenzione è stata dedicata agli effetti indotti dalle diverse variabili operative: sull'equilibrio che intercorre tra lieviti e batteri all'interno della madre acida del CPT; sull'evoluzione dell'accumulo nel tempo dei principali metaboliti (alcool etilico, acido D/L,  $\alpha$ -lattico, acido acetico) all'interno degli impasti; sulle caratteristiche organolettiche e chimico-composizionali del pane prodotto. In particolare, è stato monitorato l'effetto indotto: dalle diverse condizioni ambientali e dalle differenti tecniche di lavorazione adottate nei forni aderenti al CPT, che sono diffusi sull'intero territorio regionale; dall'utilizzo di farine prodotte in accordo al disciplinare proposto dal CPT, adottando diverse tecniche agronomiche; dalle diverse condizioni operative adottate nel corso della liofilizzazione della madre acida del CPT al fine di prolungarne la conservazione nel tempo presso il CPT o unità da questo individuate, senza dover ricorrere alla

tecnica del rinfresco giornaliero. Si tratta di un approccio innovativo che mette in stretta correlazione l'evoluzione microbiologica del sistema lievitante analizzato, con le variabili tecnologiche connesse al processo considerato al fine di individuare le eventuali ricadute indotte sulle caratteristiche organolettiche e chimiche-composizionali del prodotto finito e quindi sulla sua qualità. Poiché da sempre il pane è uno degli "alimenti simbolo" della cultura gastronomica italiana nel mondo la disponibilità di un prodotto dalle elevate qualità composizionali, sensoriali e nutrizionali e contraddistinto da una maggiore serbevolezza può rappresentare un elemento di successo sui mercati internazionali (particolarmente quelli del Nord-Europa, da sempre attenti alle esigenze del consumatore) e contribuire alla valorizzazione del territorio. Altro elemento innovativo della sperimentazione è stato l'impiego di un panel addestrato di soggetti in grado di verificare l'esistenza delle peculiari caratteristiche sensoriali dei pani ottenuti adottando le materie prime e la tecnologia di lavorazione proposta, verificando l'esistenza di quegli elementi di riconoscibilità che li rendano prodotti difficili da imitare e quindi realmente tutelabili.

## **DESCRIZIONE FASI PROGETTUALI**

### ***1) Costituzione ATS e gestione della rete di cooperazione***

#### *1.1 Costituzione ATS (Molino F.Ili Giambastiani)*

In data 26 febbraio 2013 è stato stipulato l'Atto Costitutivo dell'Associazione Temporanea di Scopo (ATS) dinanzi al Notaio Loria Luca di Lucca.

La società Advance Consulting Srl, incaricata dal capofila Molino F.Ili Giambastiani, ha svolto attività di consulenza e assistenza in fase di costituzione dell'Associazione Temporanea di Scopo (ATS) e nella gestione dei rapporti tra i partner dell'ATS.

#### *1.2 Gestione della rete di cooperazione (Molino F.Ili Giambastiani)*

Il Molino F.Ili Giambastiani, in qualità di Capofila dell'ATS, si è occupato della gestione della rete di cooperazione e dell'espletamento di tutti gli adempimenti richiesti per il buon esito finale del progetto. A tal fine il Molino si è avvalso del supporto tecnico e organizzativo offerto da Advance Consulting Srl, società di consulenza con esperienza nella gestione finanziaria di progetti di investimento e di ricerca e sviluppo sperimentale.

Le attività svolte nell'ambito dell'azione 1.2 hanno riguardato:

- Gestione dei rapporti tra i partner dell'ATS e interfacciamento con gli Enti istituzionali nel corso della realizzazione del progetto;
- Supporto tecnico per la predisposizione e l'inoltro delle domande di aiuto;
- Organizzazione e animazione delle riunioni di coordinamento del Gruppo di lavoro del progetto;
- Gestione della comunicazione all'interno della rete di cooperazione e condivisione delle informazioni relative al progetto;
- Predisposizione delle relazioni di monitoraggio sullo stato di avanzamento delle attività del progetto;
- Assistenza e consulenza in fase di rendicontazione finale dei costi del progetto;
- Raccolta della documentazione tecnica e predisposizione della relazione finale di progetto;
- Assistenza e supporto tecnico per la predisposizione e l'inoltro delle domande di pagamento.

## ***2) Prove sperimentali sulle risposte produttive da parte delle varietà di maggior interesse per la filiera del "Pane toscano"***

### *2.1. Individuazione delle varietà (DISPAA - UNIFI)*

In base alle varietà presenti nel disciplinare di produzione della D.O.P. "Pane Toscano", sono state individuate tre varietà di grano tenero, che differiscono sostanzialmente per peculiarità qualitative. In particolare, le varietà utilizzate per la presente sperimentazione sono: Bolero, Pandas e Palesio. Si tratta di grani teneri aristati, la cui coltivazione è diffusa nel centro Italia. La prima varietà ha cariosside bianca, mentre le var. Pandas e Palesio presentano cariossidi di colore rosso. Le tre varietà sono rappresentative della gamma di categorie distinte per la forza della farina: Pandas è un grano panificabile superiore o di forza (molto dipende anche da dove il frumento è coltivato), Palesio è un grano a panificabilità superiore, mentre Bolero è un grano tenero panificabile, talvolta utilizzato nell'industria biscottiera. Se lo scopo della sperimentazione è l'identificazione di un congruo sistema colturale che permetta di arrivare ai parametri della farina delineati dal disciplinare, la scelta di queste tre varietà significa indagare quale tra esse può dare risposte più interessanti, rispetto agli interventi programmati, in termini di resa e qualità della farina.

### *2.2. Messa a punto del disegno sperimentale (DISPAA - UNIFI)*

Il disegno sperimentale impiegato nel corso del progetto scaturisce dalla razionale ripartizione della superficie a disposizione per la sperimentazione e prende in considerazione da un lato i trattamenti che si vogliono effettuare, dall'altro la pendenza, l'esposizione e le disomogeneità talora presenti, nel terreno.

Tenendo conto delle esigenze tecniche in fase di semina e delle caratteristiche dell'appezzamento, il disegno sperimentale utilizzato per la sperimentazione è quello definito Split Plot, in cui i Main Plot sono rappresentati dalle varietà di grano. All'interno di essi si hanno i Sub Plot ovvero i diversi trattamenti azotati e, a loro volta, entro i diversi livelli di concimazione azotata sono presenti le parcelle con fertilizzazione sulfurea.

### *2.3. Allestimento e gestione dei campi sperimentali (Società Agricola F.lli Bimbi s.s.)*

L'azienda agricola Bimbi ha gestito i campi sperimentali per i due anni di prova, realizzando le parcelle sperimentali con differenti varietà e differenti livelli di fertilizzazione azotata.

Le attività realizzate sono:

#### *a) Allestimento delle parcelle, preparazione del letto di semina e semina parcellare.*

Le due annate produttive sono iniziate con la preparazione del letto di semina, attraverso un'aratura profonda 35-40 cm e una successiva frangizollatura.

Successivamente alla fertilizzazione pre-semina, sono state seminate due varietà (Bolero e Verna) nel primo anno e tre (Bolero, Pandas, Palesio) nel secondo seguendo il disegno sperimentale descritto messo a punto dal DISPAA-UNIFI. La quantità di seme impiegato, in entrambi gli anni del progetto, è stato di 290 kg/ha per ciascuna varietà ed è stato seminato avvalendosi della seminatrice pneumatica trainata.



Figura - Parcelle sperimentali anno 2012-2013:

43.41319,11.063782

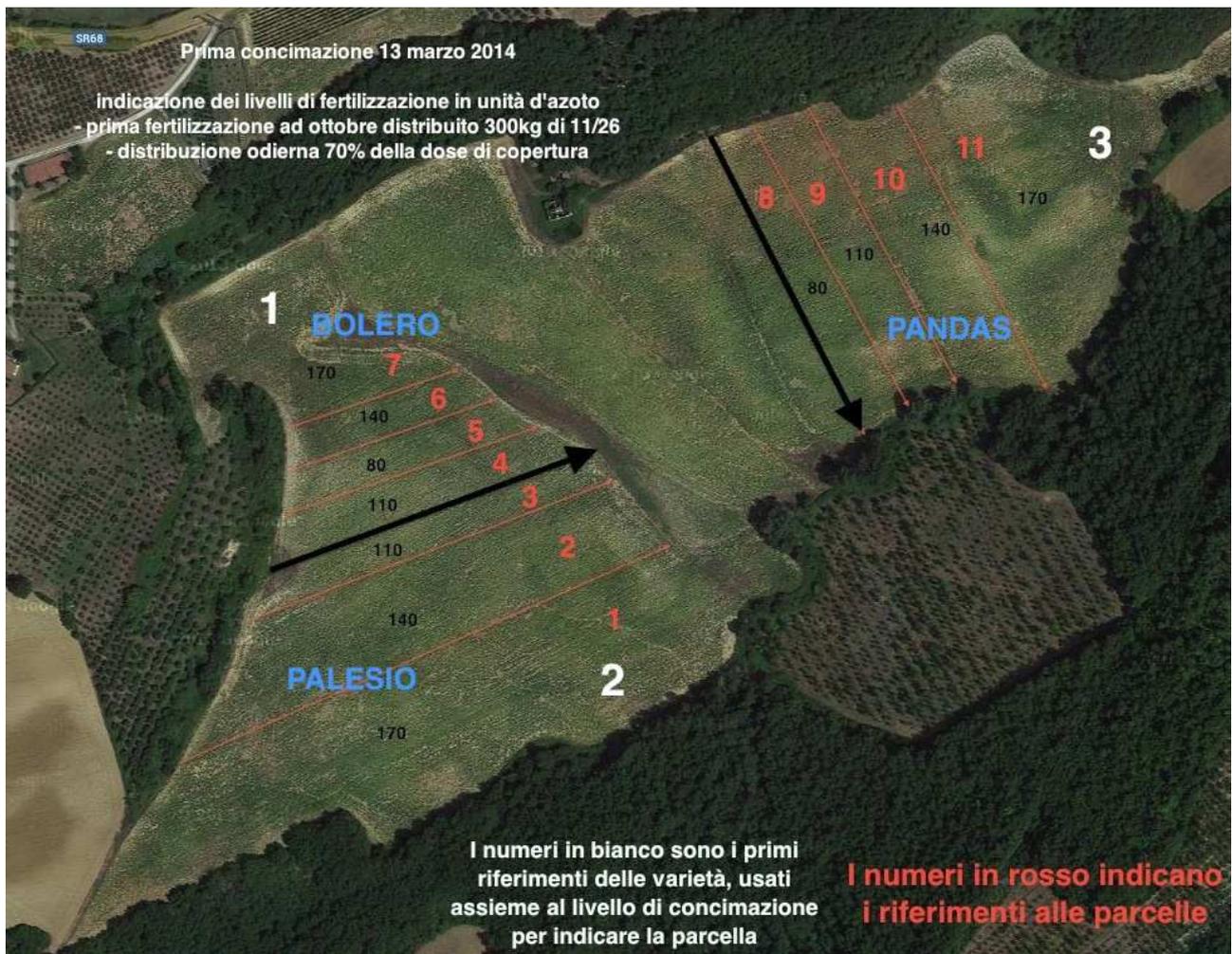


Figura - Parcella sperimentali anno 2013-2014:

43.404252,11.050487

b) Gestione interventi colturali di fertilizzazione, trattamenti fitosanitari, trattamenti erbicidi e concimazioni fogliari.

Ogni parcella, caratterizzata da una varietà ed un livello d'azoto, è stata replicata tre volte secondo il disegno sperimentale descritto da DISPAA-UNIFI. La descrizione di seguito riportata (ed i quantitativi di prodotto utilizzati) è risultata identica per entrambe le annate produttive (2012-2013 e 2013-2014). Il primo anno di sperimentazione la semina è stata effettuata nella prima decade di novembre 2012, mentre nel secondo anno, a causa della stagione climatica, è stata effettuata ad inizio dicembre 2013.

Per quanto riguarda gli interventi colturali di fertilizzazione sono stati effettuati una concimazione pre-semina, due concimazioni in copertura e una concimazione fogliare. La gestione della fertilizzazione azotata di copertura è stata effettuata con strumentazione di precisione, sia computer della trattatrice, sia spandiconcime con gestione controllata della distribuzione per le singole ali.

Le concimazioni di copertura sono state effettuate secondo livelli e dosi di seguito riportate in tabella.

TOT N (kg)	PRIMA FERTILIZZAZIONE			SECONDA FERTILIZZAZ.			TERZA FERTILIZZAZ.		
	N (kg)	% rispetto al totale	UREA (kg)	N (kg)	% rispetto al totale	fogliare 27% (kg)	N (kg)	% rispetto al totale	UREA (kg)
<b>80</b>	56	70	122	6.8	8.4	25	17	22	38
<b>110</b>	77	70	167	6.8	6.1	25	26	24	57
<b>140</b>	98	70	213	6.8	4.8	25	35	25	77
<b>170</b>	119	70	259	6.8	4.0	25	44	26	96

*Tabella - indicazione dei livelli e delle dosi di fertilizzante azotato distribuito in copertura*

La gestione dei trattamenti per la lotta contro infestanti e patogeni è stata effettuata poco dopo la seconda fertilizzazione azotata di copertura e l'intervento è stato effettuato impiegando due prodotti erbicidi, l'Axial Pronto per il controllo di infestanti graminacee, il Marox per il controllo delle infestanti a foglia larga e il Bumper P un fungicida organico generico, efficace contro mal del piede da Cercosporella, fusariosi, oidio e ruggini.





*Figura - Distribuzione sito specifica della seconda concimazione azotata, granulare, di copertura*

### *c) Raccolta parcellare.*

L'operazione di raccolta parcellare di precisione ha previsto in prima battuta il montaggio dei dispositivi elettronici atti a questo scopo, in particolare computer di bordo, sensori di carico, etc. sulla mietitrebbia per il monitoraggio in continuo della produttività delle parcelle. Dopo una successiva fase di cablatura dell'impianto e di taratura dei macchinari necessari, la macchina operatrice per la raccolta ha consentito il monitoraggio delle rese.

Le diverse parcelle sono state raccolte separatamente sia per tesi varietà/livello azoto che per replica e sono stati acquisiti sottocampioni georeferiti per eseguire le analisi quanti-qualitative. Questa operazione ha permesso la mappatura puntuale della resa all'interno delle parcelle, in modo da individuare eventuali anomalie di produzione e poter indagare successivamente sulle soluzioni da adottare per ottenere una resa il più possibile omogenea in tutto l'appezzamento.

### *2.4. Monitoraggio fenologico e produttivo, caratterizzazione pedo-climatica (DISPAA - UNIFI)*

I dati relativi alla coltura (crescita, sviluppo, ecofisiologia, etc.) raccolti in campo durante il periodo dell'attività progettuale hanno avuto un duplice scopo. Da una parte sono serviti per la validazione dei dati telerilevati a media ed alta risoluzione, dall'altra per la validazione delle relazioni semi-empiriche messe a punto. Per quanto riguarda la validazione delle informazioni derivate dagli indici telerilevati, i rilievi a terra hanno riguardato l'indice di area fogliare (LAI). Inoltre sono anche stati raccolti attraverso dei campionamenti distruttivi i dati sul contenuto di azoto, carbonio e idrogeno nelle piante. Per quanto riguarda, invece, la raccolta dei dati colturali necessari alla

messa a punto e alla validazione delle relazioni semi-empiriche verranno eseguiti campionamenti riguardanti:

- a. Fenologia (principali stadi fenologici)
- b. Crescita (altezza delle piante, numero di foglie, LAI, biomassa)
- d. Contenuto di azoto, carbonio, idrogeno
- f. Produzione (resa frumento, contenuto proteico e peso specifico della granella).

Al fine di relazionare le informazioni telerilevate con lo stato della coltura sono stati eseguiti rilievi eco fisiologici e quantitativi in tre periodi chiave del ciclo vegetativo del frumento duro quali l'inizio della levata (prima della seconda concimazione azotata di copertura), l'antesi (inizio fioritura) e la maturazione tecnica (raccolta).

In particolare, sono stati prelevati campioni per ogni parcella georeferiti con GPS al fine di poterli associare alle informazioni telerilevate.

I valori degli indicatori vegetazionali sono riportati al paragrafo successivo.

Nell'area di sperimentazione sono stati estratti tre campioni di suolo per ciascuna delle tre aree in cui sono state seminate le tre cultivar. I campioni di suolo sono stati quindi esaminati al fine di determinarne le caratteristiche principali necessarie per alimentare il modello SiriusQuality. Le caratteristiche dei suoli delle tre parcelle sperimentali sono analoghe. Si tratta di terreni franco argillosi (mediamente 40% di argilla 35% di limo) con buona adesività e media plasticità, buon addensamento delle particelle mediamente alcalini (pH medio 7.5) caratteristici della zona.

	Pal		Pan
Argilla (%)	43	41	38
Limo (%)	33	35	37
Sabbia (%)	24	24	25
pH	7.5	7,4	7.6
Bulk density (kg/dm <sup>3</sup> )	1.37	1,39	1.38
Base di saturazione (%)	100	100	100
Carbonio organico (% del peso)	1.63	1,61	1.59
Tipo di suolo	Franco argilloso	Franco argilloso	Franco argilloso

*Tabella – caratteristiche del suolo*

## *2.5. Valutazione dell'uso di informazioni telerilevate per il monitoraggio della coltura (DISPAA - UNIFI)*

Per quanto riguarda le prove sperimentali queste sono state organizzate, secondo quanto riportato nel progetto, presso l'azienda F.lli Bimbi nel comune di Colle Val d'Elsa. Dopo la scelta varietale del frumento tenero, sono state allestite le parcelle sperimentali con tre livelli di fertilizzazione. Nel corso del ciclo produttivo della coltura sono stati realizzati rilievi distruttivi e non che hanno interessato principalmente la fenologia, la crescita delle piante, l'ecofisiologia e la produttività. Tali dati sono correlati a quelli telerilevati grazie all'acquisizione di immagini ad alta risoluzione fornite dal satellite commerciale Rpideye durante la fase di levata. I campioni di granella prelevati a fine del ciclo produttivo, sono stati sottoposti ad analisi qualitativa indagando il contenuto proteico ed il peso ettolitrico delle cariossidi. Infine, parte della granella raccolta è stata macinata per avere la farina su cui portare avanti l'analisi qualitativa della stessa, seguendo lo studio di diversi parametri che ne determinano una maggiore o minore attitudine al processo di panificazione.

Le relazioni fra i parametri misurati sulla coltura e gli indicatori telerilevati sono poi state analizzate per determinare e calibrare la capacità descrittiva delle informazioni satellitari.

Il monitoraggio remoto effettuato nella fase di levata, prima della seconda fertilizzazione azotata consente, infatti, di fornire indicazioni per mettere a punto le strategie più opportune di applicazioni sito specifiche.

Nella prima parte di questa fase fenologica la copertura vegetale ha valori di LAI compresi fra 0,8-3,0, ed è questo il momento migliore per valutare la variabilità sulla quantità di vegetazione che insiste sulle differenti aree del campo. Prima infatti troviamo il terreno troppo nudo e quindi gli indici radiometrici non sono in grado di relazionarsi alla parte vegetativa, mentre successivamente, con valori di LAI superiori a 3 la risposta è piatta in quanto si entra nella fase di saturazione degli indici, ossia la vegetazione è troppo fitta per apprezzare le differenze di risposta radiometrica.

Il primo passo è stata l'acquisizione dell'immagine telerilevata, su ordinazione, la correzione radiometrica per la trasparenza dell'atmosfera, l'ortofotorettifica per migliorare l'aderenza cartografica con il territorio ed il calcolo degli indici vegetazionali. Tutte queste operazioni sono ormai reperibili nel mercato e quindi riteniamo siano alla portata di tutti, previa opportuna conoscenza di cosa vogliamo e a cosa serve. Il tempo che normalmente trascorre fra ordine e

restituzione dell'immagine elaborata è di pochi giorni e spesso è condizionato dalla trasparenza dell'atmosfera legata alla nuvolosità che caratterizza il mese di marzo.

Le immagini acquisite hanno le seguenti caratteristiche:

Risoluzione a terra: metrica (5,0 m);

Nuvolosità massima: 20%;

Bande acquisite: RGB (Red-Green-Blue) , NIR (vicino infrarosso) e Red Edge;

Ortorettificate;

Georeferenziate;

Comprensive di ortofotorettifica, elaborazioni di NDVI (Normalized Difference Vegetation Index), NDVI RE (NDVI Red Edge) e Indice di Clorofilla.

I dati multispettrali con bande nelle regioni del visibile, dell'infrarosso e del verde consentono di misurare i comportamenti diagnostici delle colture riconducibili, dopo opportuna analisi, a caratteristiche di morfologia, stato e condizione fitosanitaria della pianta, risposta a input agronomici e ambientali.

Gli indici di vegetazione telerilevati calcolati sono stati:

NDVI (Normalized Difference Vegetation Index)

NDVI RE (Normalized Difference Vegetation Index Red Edge)

CHL (Chlorophyll Index)

OSAVI (Optimized Soil-Adjusted Vegetation Index)

L'NDVI ( $NIR - Red / NIR + Red$ ) mostra le differenze nel vigore delle piante. Questo indice combina l'alto assorbimento della clorofilla nella banda spettrale del Rosso (Red) e la riflettanza fogliare nella banda dell'Infrarosso Vicino (NIR). L'NDVI risulta efficace soprattutto in situazioni intermedie, quando la crescita delle piante non è eccessivamente abbondante.

Un altro indice simile utilizzato è l'NDVI Red Edge ( $NIR - RedEdge / NIR + RedEdge$ ), che si basa sullo stesso principio dell'indice NDVI. La scelta del canale Red Edge al posto della banda spettrale del Rosso fornisce una minore saturazione dell'indice rispetto all'NDVI nelle zone con una ricca copertura di vegetazione. Infine, nello studio è stato utilizzato l'indice CHL (Chlorophyll Content), che mostra lo stato nutrizionale di azoto delle piante all'interno di un campo. Data la stretta correlazione tra l'N e il contenuto di clorofilla, si può utilizzare questo indice per generare mappe di tipo applicativo relative alla variabilità dell'azoto.

Con l'Indice di Vegetazione Ottimizzato Rettificato per il Suolo (OSAVI), grazie alla combinazione con la linea dei suoli, si ha un miglioramento dei contributi di riflettanza dell'ambiente circostante

e un miglioramento della sensibilità alle variazioni di contenuto di clorofilla fogliare. Si rivela un indice utile nello scenario agricolo operativo in quanto la sua determinazione non necessita di informazioni sulle proprietà ottiche del suolo e fornisce ottimi risultati per molti tipi di colture. Sensibile alle variazioni di contenuti di clorofilla ,resistente alle variazioni di LAI e all' angolo di zenith di illuminazione solare.

Indici di vegetazione utilizzati in questo studio, dove R è riflettanza alla lunghezza d'onda (nm).

Indice	Formula	Bibliografia
NDVI	$(R780 - R670)/(R780 + R670)$	Rouse et al., 1974
NDVI RE	$(R780 - R700)/(R780 + R700)$	Gitelson e Merzlyak, 1997
MCARI	$[(R700 - R670) - 0.2(R700 - R550)] R700/R670$	Daughtry et al., 2000
TCARI	$3[(R700 - R670) - 0.2(R700 - R550) R700/R670]$	Haboudane et al., 2002
OSAVI	$(1 + 0.16)(R800 - R670)/(R800 + R670 + 0.16)$	Rondeaux et al., 1996
CHL	$R780/R550 - 1$	Gitelson et al., 2003

*Tabella - Indici di vegetazione utilizzati in questo studio, dove R è riflettanza alla lunghezza d'onda (nm).*

A partire da tali prodotti e grazie all'acquisizione sincrona di misure di campo puntuali, sono stati testati sia metodi di spazializzazione, sia modelli semi-empirici per la stima di parametri bio-fisici della vegetazione su tutta l'area d'interesse. I metodi di spazializzazione sfruttano i dati telerilevati come informazione ausiliaria nella definizione dei campi di variabilità spaziale. I modelli semi-empirici invece si basano sulla definizione di una relazione statistica che intercorre tra le variabili bio-fisiche della vegetazione e la risposta spettrale misurata dal sensore. A partire da analisi di correlazione tra misure di campo e spettrali, sintetizzate sotto forma di indici di vegetazione, sono stati sviluppati modelli semi-empirici in grado di predire e quindi spazializzare le misure di campo. Il punto di partenza è stato l'acquisizione dell'immagine dal satellite Rapid Eye il 29 marzo 2014 e dopo 3 giorni sono state disponibili le informazioni elaborate.

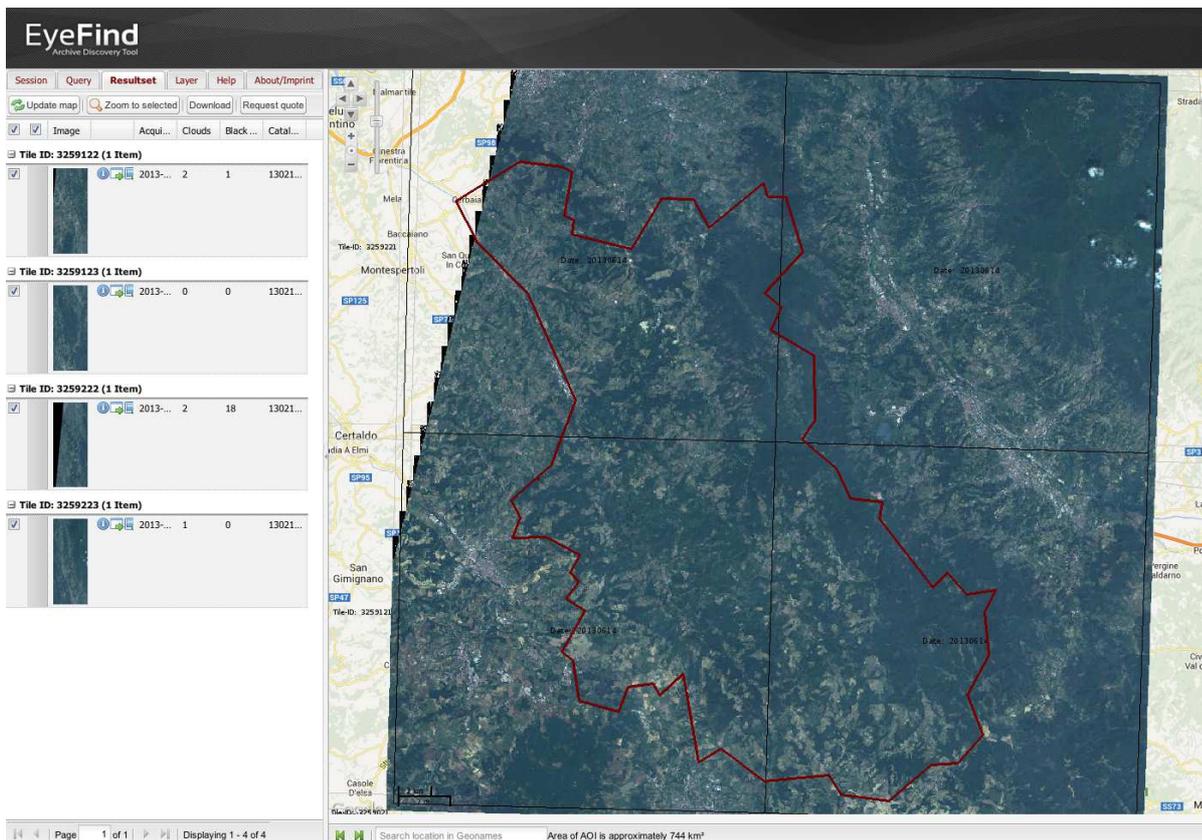


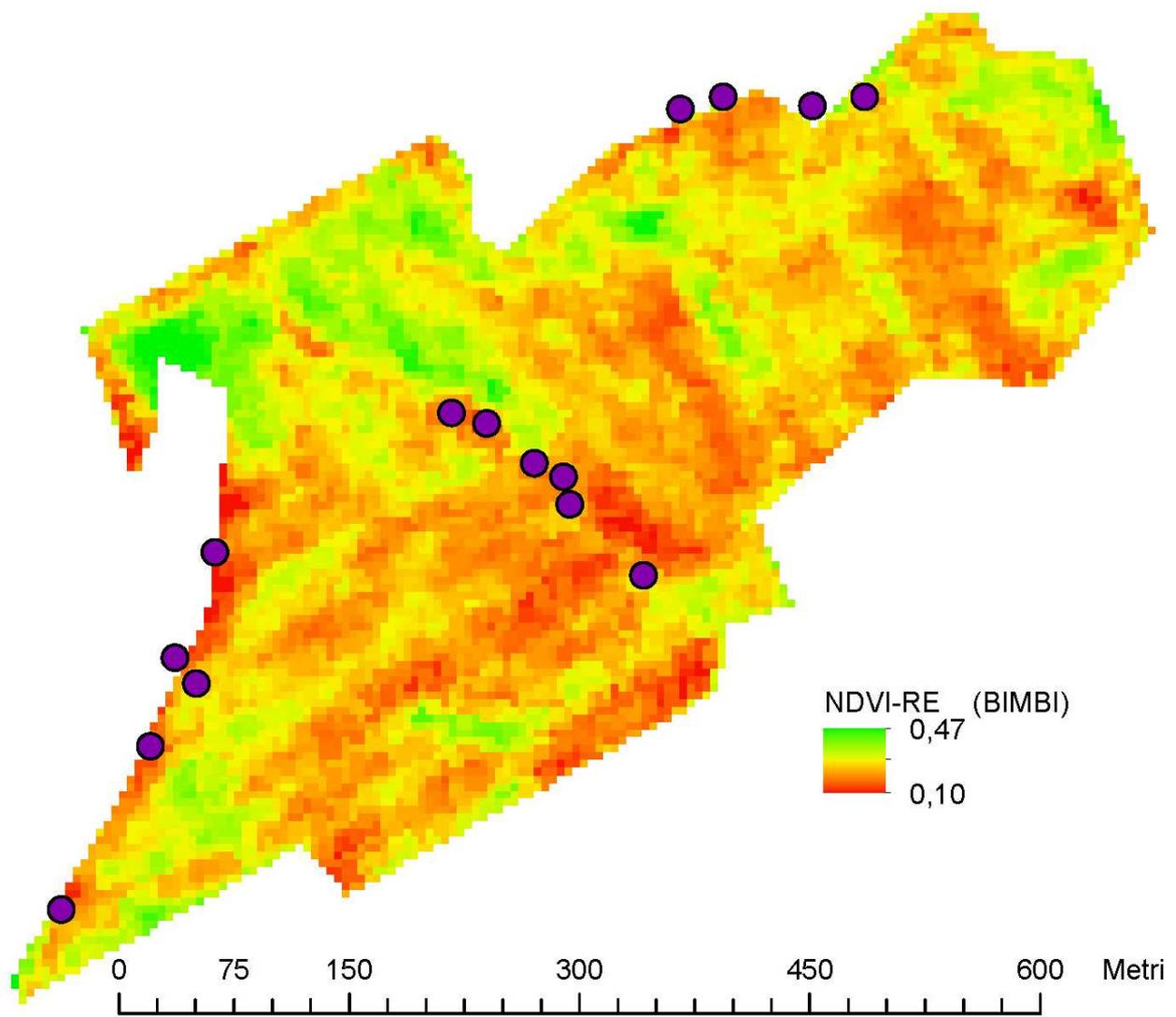
Figura – sito web Rapid Eye per la scelta delle immagini d'archivio

Le analisi precedenti hanno mostrato chiaramente che l'indice NDVI<sub>re</sub> ha la migliore capacità di monitoraggio remoto della vegetazione. Le immagini Rapid Eye hanno il canale radiometrico red edge, quindi hanno permesso il calcolo di questo indice per le parcelle sperimentali, di seguito riportato in figura.

### Elaborazione indice vegetazionale NDVI<sub>re</sub>

Fra gli indici vegetazionali elaborati la migliore performance è stata ottenuta dal Normalized Difference Vegetation Index Red Edge, e nella figura di seguito è evidente l'estrema variabilità dell'indice (indicata in falsi colori).

La variabilità vegetazionale accentuata dai differenti livelli di fertilizzazione azotata è stata poi ulteriormente accentuata dalla elevato livello di precipitazioni che si è avuto nella primavera 2014.



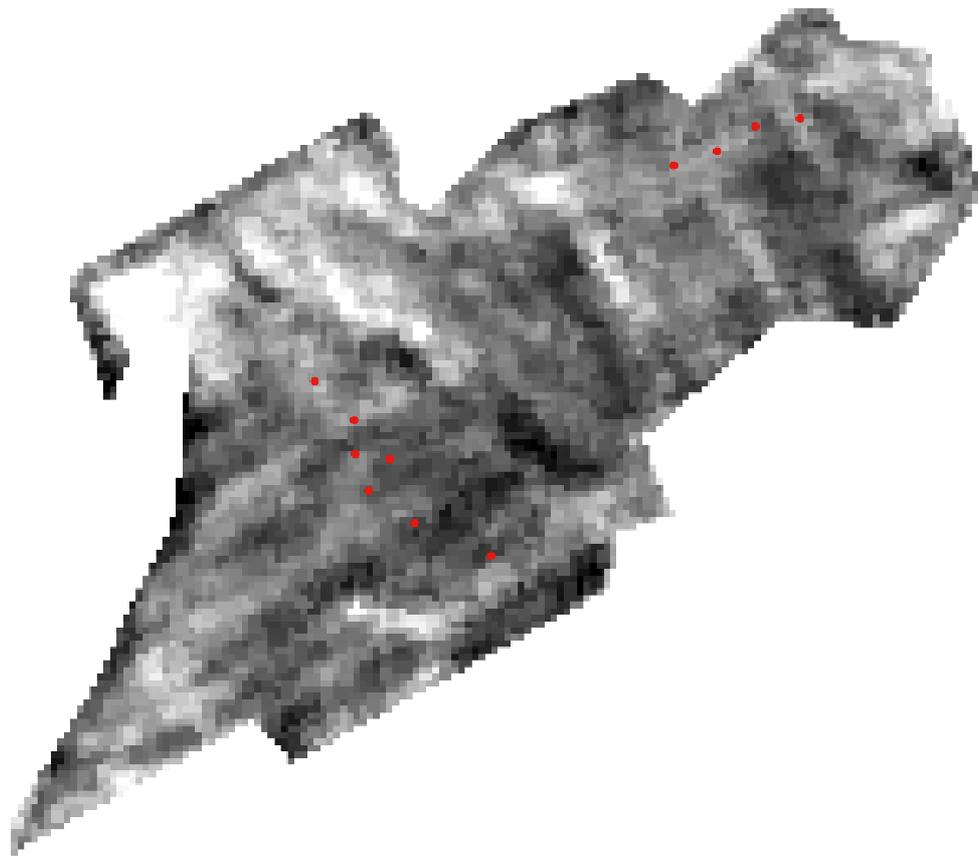
*Figura – Indice vegetazionale NDVIre, calcolato dall'immagine satellitare acquisita il 29 marzo, nel campo sperimentale dei Az. Agr. Bimbi*

Il risultato è stato una estrema e casuale variabilità non interamente riconducibile alle parcelle impostate. Ai fini dello scopo di questa fase del progetto ciò non ha avuto nessuna influenza, in quanto la capacità di monitoraggio è indipendente dalla conoscenza di quanto effettuato con le operazioni colturali.



*Figura – come appare il campo sperimentale il 2 aprile*

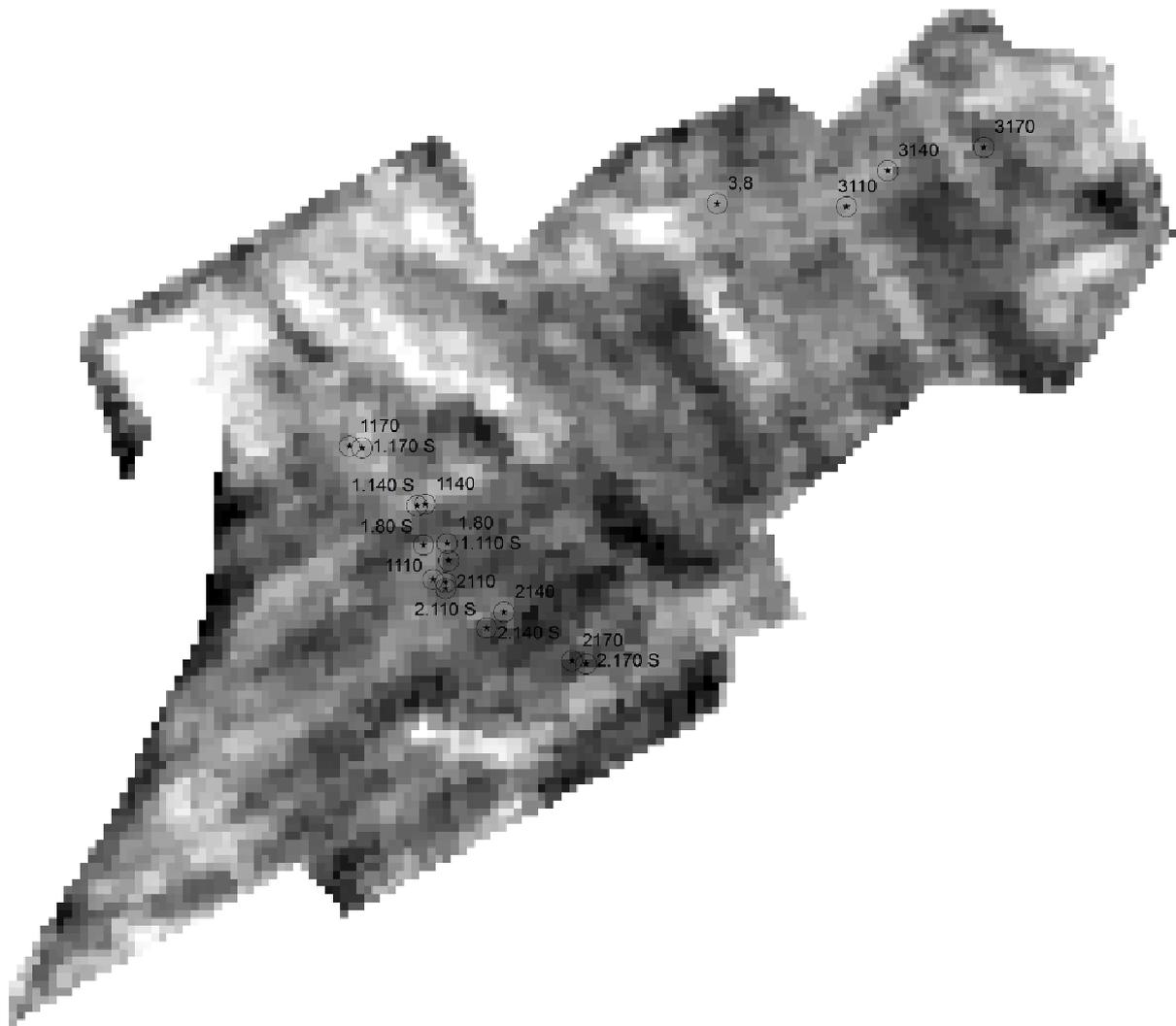
Nelle 11 parcelle sperimentali, differenziate per livelli di fertilizzazione azotata, sono state aggiunte parcelle circolari di 10 m di diametro su cui è stata distribuita una dose equivalente a 60 unità ad ettaro di zolfo granulare.



*Figura – indicazione delle parcelle in cui è stata effettuata la fertilizzazione solfatica granulare in un cerchio di 10 m di raggio*

RILIEVI DI CRESCITA E SVILUPPO DEL 23 APRILE 2014 ED NDVIre

Il 23 aprile 2014 è stato effettuato un rilievo su 18 punti all'interno delle parcelle sperimentali.



*Figura - posizione dei rilievi effettuati in fase di botticella-spigatura (23 aprile 2014)*

Per ciascun punto è stata prelevata la biomassa aerea su cinque sottoaree di  $0,2 \text{ m}^2$  ciascuna ed è stato determinato il valore medio, riportato in tabella di seguito.

La correlazione lineare fra NDVIre e peso secco ha mostrato la capacità di monitoraggio di questo indice.

ID	X	Y	PS 23 apr 2014 (g)	NDVIre
1	666077	4807505	74.7	0.231
1s	666086	4807503	73.5	0.246
2	666034	4807536	60.9	0.264
2s	666023	4807526	56.5	0.228
3	665997	4807555	29.1	0.243
3s	665997	4807551	34.1	0.243
4	665989	4807557	65.1	0.257
4s	665999	4807569	46.2	0.215
5	665998	4807580	44.2	0.259
5s	665983	4807579	65.3	0.264
6	665984	4807605	100	0.274
6s	665979	4807604	87.8	0.294
7	665936	4807642	93	0.294
7s	665944	4807641	108.1	0.296
8	666169	4807797	55.6	0.291
9	666251	4807795	65.8	0.293
10	666277	4807818	93.5	0.310
11	666338	4807833	88.7	0.236

Tabella – coordinate spaziali, peso secco (PS) e valore di NDVIre dei rilievi effettuati in fase di botticella-spigatura (23 aprile 2014)

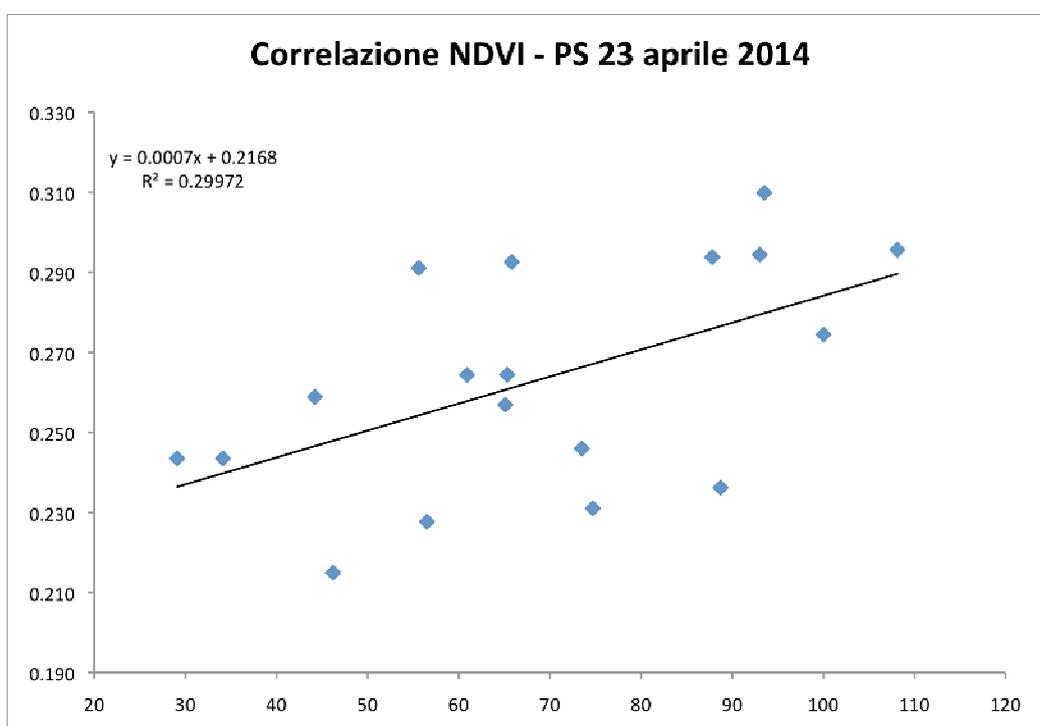
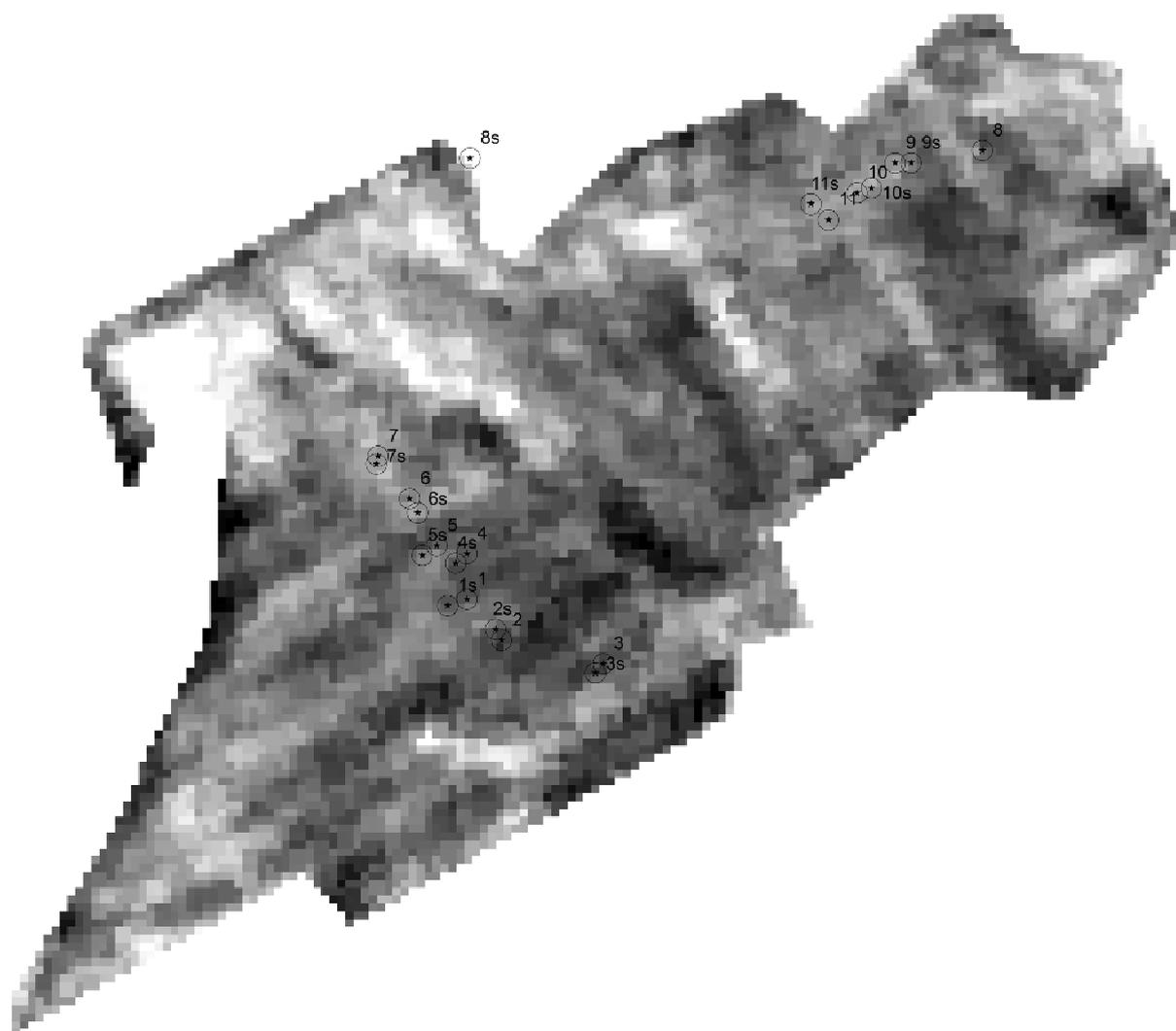


Figura – Correlazione lineare tra NDVIre e peso secco dei rilievi effettuati in fase di botticella-spigatura (23 aprile 2014)

RILIEVI DI CRESCITA E SVILUPPO DELL'11 giugno 2014 ED NDVIre

L'11 giugno 2014 è stato effettuato un rilievo su 22 punti all'interno delle parcelle sperimentali.



*Figura - posizione dei rilievi effettuati in fase di maturazione latte-cerosa (11 giugno 2014)*

Per ciascun punto è stata prelevata la biomassa aerea su cinque sottoaree di  $0,2 \text{ m}^2$  ciascuna ed è stato determinato il valore medio, riportato in tabella di seguito.

La correlazione lineare fra NDVIre e peso secco ha confermato la capacità di monitoraggio di questo indice, e soprattutto ha mostrato come le differenze vegetazionali presenti in fase di levata si mantengono anche in fase di maturazione.

ID	X	Y	PS 11 glu 2014 (g)	NDVire
1	666,007	4,807,549	167.8	0.241
1s	665,995	4,807,545	148.4	0.234
2	666,029	4,807,523	151.3	0.208
2s	666,025	4,807,530	172.3	0.228
3	666,093	4,807,508	193.5	0.208
3s	666,088	4,807,502	167.0	0.206
4	666,007	4,807,578	191.4	0.230
4s	666,000	4,807,572	189.4	0.230
5	665988	4807583	205.7	0.239
5s	665979	4807577	196.6	0.264
6	665,971	4,807,613	211.8	0.266
6s	665,976	4,807,604	218.6	0.294
7	665,951	4,807,640	304.8	0.287
7s	665,950	4,807,635	294.4	0.297
8	666332	4807834	200.9	0.244
8s	666009	4807829	210.6	0.260
9	666,277	4,807,826	206.3	0.287
9s	666,287	4,807,826	243.6	0.261
10	666,253	4,807,807	197.7	0.295
10s	666,262	4,807,810	181.4	0.274
11	666,235	4,807,790	155.8	0.240
11s	666,224	4,807,800	211.6	0.291

Tabella – coordinate spaziali, peso secco (PS) e valore di NDVire dei rilievi effettuati in fase di maturazione latte-cerosa (23 aprile 2014)

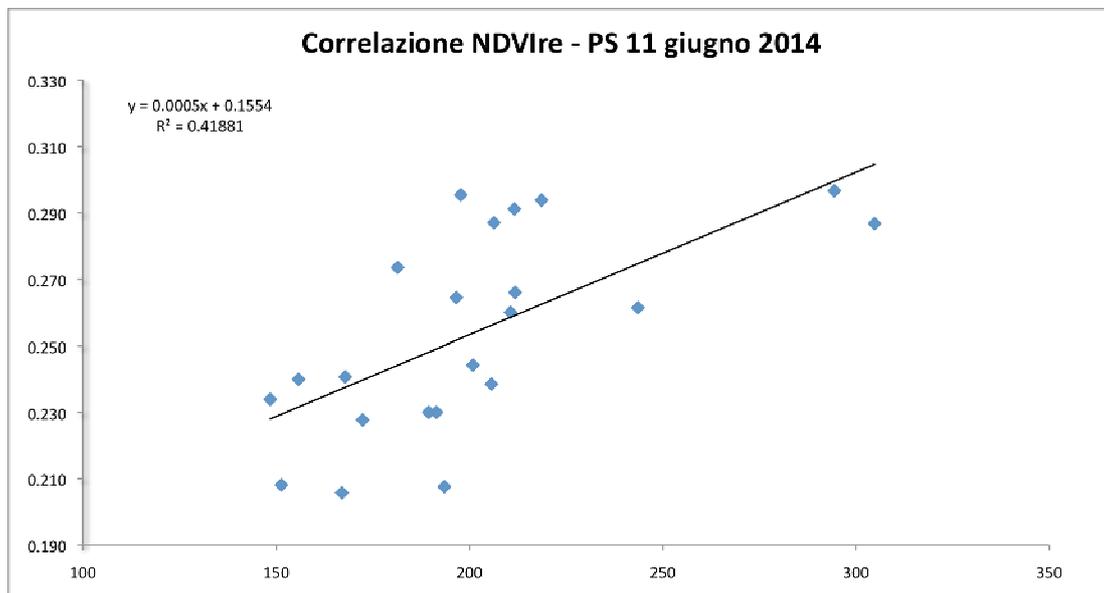
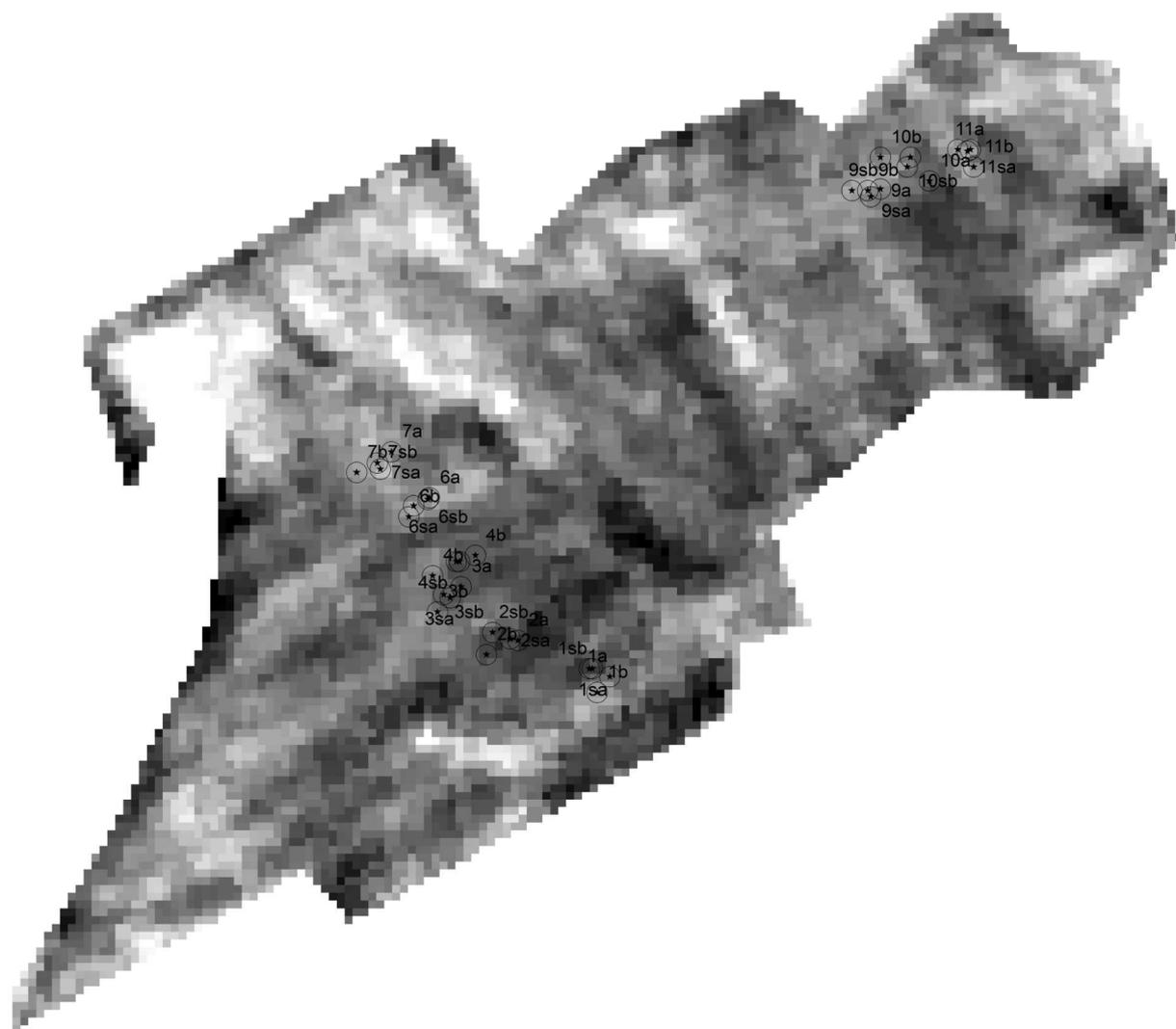


Figura – Correlazione lineare tra NDVire e peso secco dei rilievi effettuati in fase di botticella-spigatura (23 aprile 2014).

## RILIEVI PRODUTIVI ED NDVire

L'18 luglio 2014 è stato effettuato un rilievo su 36 punti all'interno delle parcelle sperimentali.



*Posizione dei rilievi effettuati in fase di maturazione finale (raccolta)*

Per ciascun punto è stata prelevata la biomassa aerea su 2,0 m<sup>2</sup> determinata la resa in granella, e le sue caratteristiche qualitative/merceologiche, riportate in tabella di seguito.

La correlazione lineare fra NDVire e peso secco ha confermato la capacità di monitoraggio di questo indice, e soprattutto ha mostrato come le differenze vegetazionali presenti in fase di levata si traducono in differenze produttive. In particolare è risultata:

- una relazione altamente significativa con la resa in granella,
- una relazione non significativa con il contenuto proteico.

ID	X	Y	varietà	Azoto (kg/ha)	Zolfo (Kg/ha)	peso (g)	peso ettolitrico	umidità (%)	peso 1000 semi (g)	NDVire
1 A	666098	4807499	palesio	170	0	732.65	74.9	15	39.25	0.25000
1 B	666090	4807489	palesio	170	0	515.66	75	14.8	37.35	0.23210
1 A S	666087	4807504	palesio	170	60	570	72.6	14.6	34.4	0.20574
1 B S	666085	4807504	palesio	170	60	476.04	70.8	14.6	32.05	0.20476
2 A	666040	4807522	palesio	140	0	651.68	73.3	15	34.55	0.20853
2 B	666020	4807513	palesio	140	0	642.72	72	14.8	33.4	0.21281
2 A S	666035	4807523	palesio	140	60	637.25	74.9	15	42.2	0.20853
2 B S	666024	4807527	palesio	140	60	607.93	73.9	15	37.5	0.22768
3 A	666004	4807556	palesio	110	0	597.31	73.8	14.9	37	0.22170
3 B	665989	4807540	palesio	110	0	772.79	74.5	14.9	36.7	0.27640
3 A S	665997	4807549	palesio	110	60	626.44	73.9	15	37.95	0.22402
3 B S	665993	4807551	palesio	110	60	558.63	74	14.7	35	0.23874
4 A	665986	4807563	bolero	110	0	648.94	78.9	15.3	51.95	0.26818
4 B	666013	4807576	bolero	110	0	849.27	78.3	15.1	49.9	0.23114
4 A S	666003	4807572	bolero	110	60	673.27	78.6	15.1	49.6	0.23005
4 B S	666001	4807572	bolero	110	60	718.6	78.8	15.1	49.35	0.23005
6 A	665984	4807613	bolero	140	0	879.91	78.8	15.1	48.3	0.28117
6 B	665971	4807601	bolero	140	0	970.21	77.5	15.1	47.45	0.30348
6 A S	665974	4807608	bolero	140	60	1062.52	77.1	15.6	47.5	0.30348
6 B S	665983	4807612	bolero	140	60	989.13	77	15.8	49.4	0.28117
7 A	665960	4807642	bolero	170	0	1011.62	75.6	14.9	41.1	0.29032
7 B	665938	4807629	bolero	170	0	1129.25	81.4	14	47.2	0.28753
7 A S	665953	4807631	bolero	170	60	1003.03	78.2	15.1	46.55	0.29665
7 B S	665951	4807635	bolero	170	60	1100.36	76.6	15.3	42.7	0.29665
9 A	666269	4807809	pandas	110	0	784.39	74.4	15	41.6	0.27027
9 B	666261	4807808	pandas	110	0	842.58	75.5	14.6	39.35	0.27352
9 A S	666263	4807804	pandas	110	60	982.78	74.8	14.5	41.15	0.26906
9 B S	666251	4807808	pandas	110	60	889.97	75.7	14.7	43.2	0.29540
10 A	666300	4807814	pandas	140	0	733.61	74.5	15.2	41.85	0.24221
10 B	666269	4807829	pandas	140	0	939.57	74.6	15.3	39.3	0.26711
10 A S	666288	4807829	pandas	140	60	869.3	74.1	14.9	38.5	0.26139
10 B S	666286	4807823	pandas	140	60	867.97	75	14.4	36.1	0.26442
11 A	666326	4807834	pandas	170	0	746.05	76.3	14.4	42.55	0.29604
11 B	666328	4807823	pandas	170	0	791.93	75.1	14.8	39.65	0.27660
11 A S	666324	4807833	pandas	170	60	718.91	73.2	14.5	39.15	0.29604
11 B S	666318	4807834	pandas	170	60	790.73	75.1	15.2	37.85	0.29792

Tabella – coordinate spaziali, peso secco (PS), caratteristiche merceologiche e valore di NDVire dei rilievi effettuati in fase di maturazione tecnica (18 luglio 2014)

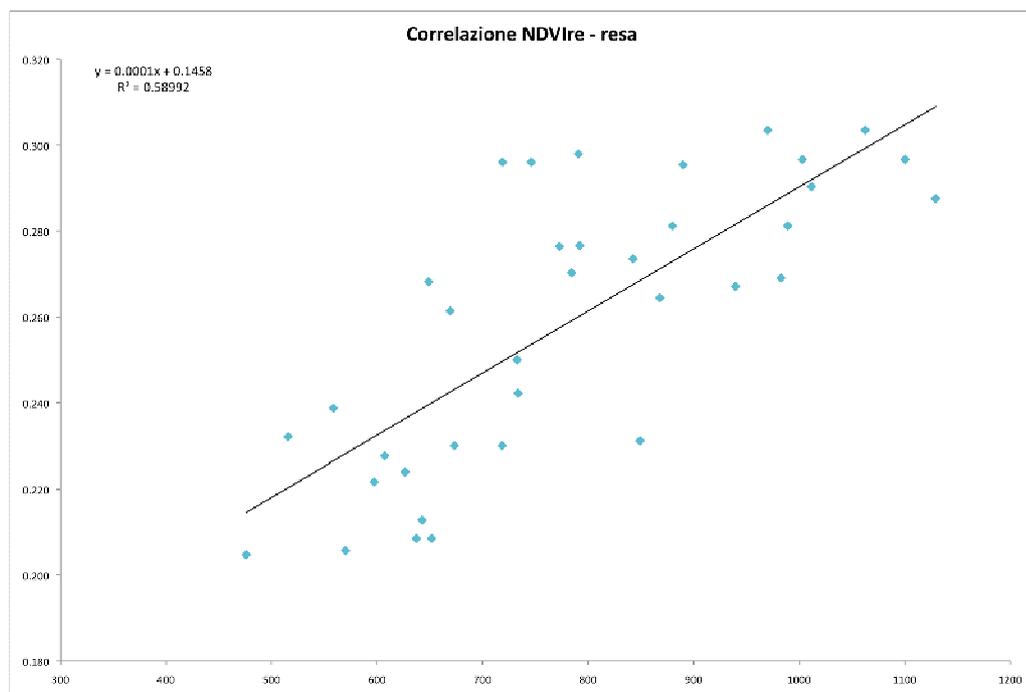


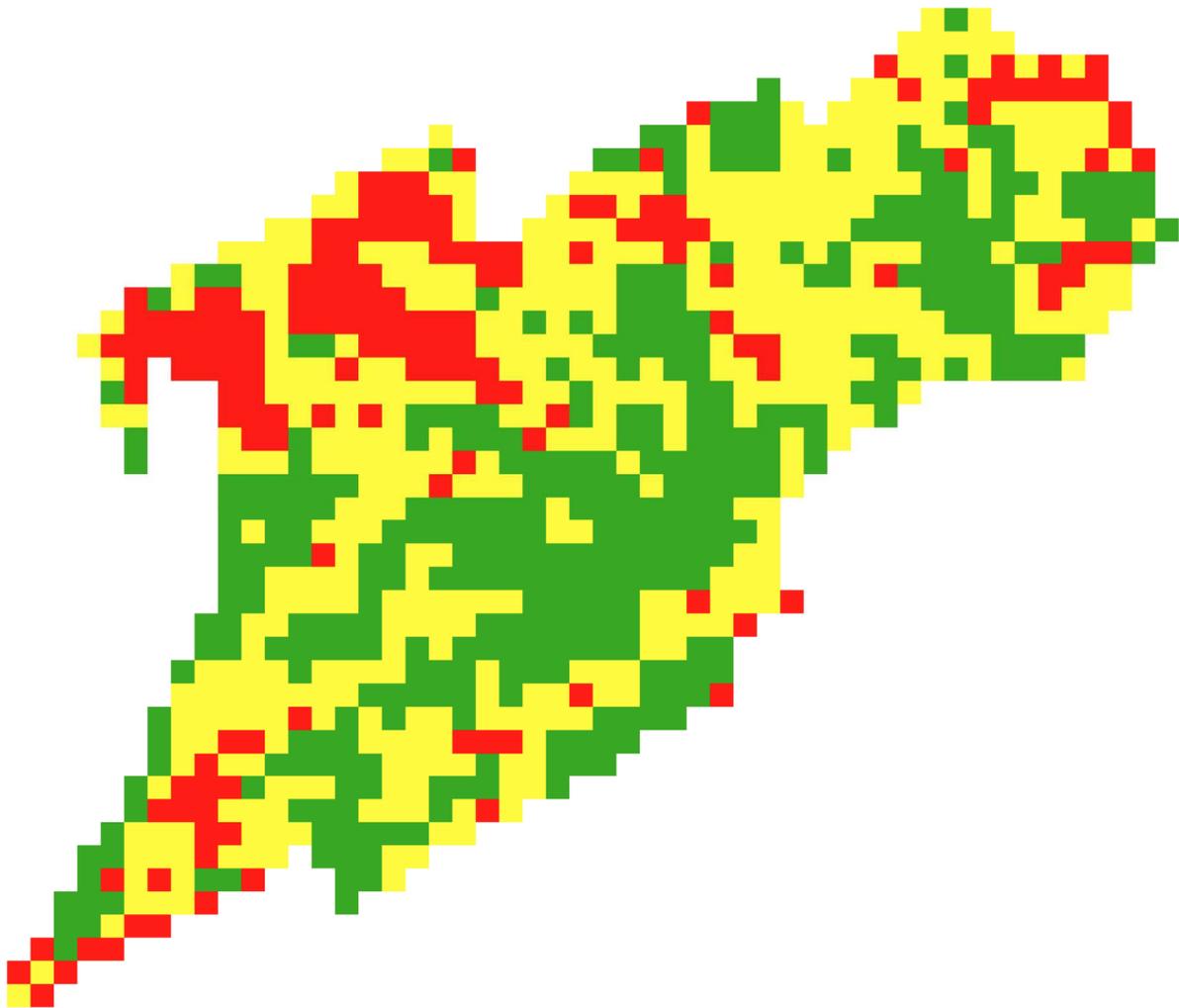
Figura - relazione fra resa in granella ed NDVire rilevato nella fase di levata (18 luglio 2014)

## CONCLUSIONI

L'NDVIre ha confermato la capacità descrittiva dello stato vegetazionale del frumento. Il suo impiego per il monitoraggio su vasta scala è quindi applicabile grazie a satelliti commerciali quali il Rapid Eye, che su ordinazione riescono a fare acquisizioni di immagini dettagliate nel giro di pochi giorni, quindi con la tempestività necessaria all'esecuzione di operazioni colturali.

Queste immagini acquisite nella fase di inizio levata possono essere processate per produrre mappe di indici vegetazionali quali l'NDVIre che descrivono la variabilità di campo presente nell'area d'indagine e sono predittori dei risultati produttivi finali.

La mappa di NDVIre può quindi essere reclassata e impiegata per effettuare la fertilizzazione sito specifica con trattore e spandiconcime di precisione. Il miglior metodo per la strategia da adottare è di fornire tre livelli di rigoglio vegetazionale ed in base alle aspettative peculiari dell'annata definire gli input per ciascun livello. Il numero livelli deve essere compatibile con l'operatività degli organi di distribuzione, quindi per non creare rumore di fondo si tende a raggruppare le unità di campo con esigenze simili, dalle esperienze maturate per gli appezzamenti produttivi dei nostri ambienti collinari tre livelli sono ottimali.



*Figura - mappa di prescrizione della fertilizzazione azotata, in rosso per alta produttività, in verde per bassa produttività ed in giallo per intermedia.*

#### *2.6. Analisi delle farine (DISPAA - UNIFI)*

In data 18/07/2014 è stata realizzata la raccolta e sono stati divisi 6 campioni di grano rappresentanti 6 blend diversi: le 3 varietà di grano secondo le concimazioni azotate massime e minime, come riportato nella tabella 1.

Nella raccolta dei campioni non è stato tenuto conto delle concimazioni sulfuree poiché, da analisi tramite analizzatore elementare CHN, in grado di rilevare la quantità di Zolfo all'interno della granella, è emerso che essi non erano contraddistinti da concentrazioni diversificate e significative di questo elemento; probabilmente per via del mal assorbimento, da parte delle piante di grano, dello Zolfo granulare distribuito in campo.

Campione	Varietà	Concimazione
		Azotata (kg/ha)
1	Palesio	170
2	Palesio	110
3	Bolero	110
4	Bolero	170
5	Pandas	110
6	Pandas	170

*Tab. 1 – campioni di farina per analisi*

Le analisi realizzate sui 6 campioni hanno riguardato la forza della farina (W) e l'elasticità (P/L). Di seguito si riportano i risultati ottenuti:

Campione	Forza (W)	Elasticità (P/L)
1	82	0,44
2	102	0,36
3	98	0,39
4	85	0,36
5	178	0,97
6	97	0,64

*Tab. 2 – analisi di forza ed elasticità delle farine*

I parametri rilevati riguardo elasticità e forza delle farine non corrispondono a quelli riportati nel disciplinare di produzione del "Pane Toscano a lievitazione naturale (DOP)" ed anzi dalle analisi emerge che le farine non sono idonee alla panificazione.

Dall'analisi di questi dati emerge che l'andamento climatico e la disomogeneità del terreno su cui le particelle sperimentali sussistevano, hanno compromesso l'esito della prova. Sicuramente anche la presenza di elevata umidità in alcune parti del campo, con visibili fenomeni di ristagno dell'acqua, ha contribuito a rendere difficoltoso l'assorbimento degli elementi nutritivi da parte delle piante, rendendo le fertilizzazioni azotate e sulfuree ininfluenti sulla qualità finale delle farine.

### **3) Messa a punto di un modello per la previsione della qualità del prodotto (DISPAA - UNIFI)**

#### *3.1. Sviluppo del modello*

##### *3.1.1 Introduzione*

La variabilità pedo-climatica di un territorio rappresenta un fattore determinante per le condizioni nutrizionali che influenzano le performance produttive di una coltura, anche all'interno dello stesso appezzamento. Lo studio delle dinamiche e delle influenze reciproche tra suolo, clima, genetica e pratiche colturali risulta quindi essenziale per mettere a punto sistemi di supporto ai piani di gestione agronomica. L'analisi dei principali rapporti di causa-effetto fra parametri ambientali e colturali è supportato oggi da moderni e innovativi strumenti per il monitoraggio della coltura (stazioni meteorologiche, immagini satellitari, strumentazione diagnostica per la coltura, ecc.) e dalla messa a punto di modelli agrometeorologici per la simulazione dello sviluppo e della crescita delle piante. I modelli di simulazione, applicati in ambito agricolo a partire dagli anni '80, hanno scopi di ricerca, gestionali e di pianificazione in quanto capaci di dare indicazioni sui tempi e modalità degli interventi agronomici e sulle loro possibili conseguenze, fornendo previsioni sullo stato e sui risultati produttivi delle colture. I modelli di simulazione vengono impiegati, in modo particolare, dai Servizi Regionali che operano in agricoltura, anche se il loro utilizzo può estendersi anche a livello di assistenza tecnica o di singola azienda. Il loro uso operativo in agricoltura ad oggi è legato ad applicazioni localizzate, rivolte soprattutto alle colture a maggiore redditività del settore viticolo e orto-frutticolo, mentre l'uso per il supporto alla gestione di coltivazioni estensive e sistemi produttivi organizzati, trova ancora difficoltà e rende questo ambito suscettibile di sviluppi e miglioramenti.

L'uso di modelli colturali, adeguatamente calibrati e validati, permette di simulare, con un certo margine di accuratezza e affidabilità, le potenzialità produttive delle colture soprattutto se alimentati con informazioni pedo-climatiche e gestionali di una determinata area. In tal senso il modello costituisce uno strumento efficace per valutare l'importanza o l'utilità di determinanti interventi colturali (come ad esempio le concimazioni) al fine di contenere i costi di produzione mantenendo una determinata produttività. L'impiego della modellistica a livello previsionale può inoltre risultare molto utile per rimodulare e tarare il piano delle operazioni colturali (es. concimazioni correttive, interventi fitosanitari, ecc.) nella fase terminale del ciclo produttivo: nella coltivazione del frumento tenero tale prospettiva risulta particolarmente interessante poiché la qualità e quantità delle produzioni è strettamente influenzata dalle ultime fasi fenologiche del ciclo produttivo legate al riempimento e maturazione della granella.

Dato che l'efficacia delle operazioni colturali risulta fortemente influenzata dall'evoluzione meteorologica, è fondamentale, avvalendosi del supporto fornito dalla modellistica, riuscire a ottimizzare le scelte agronomiche in modo da massimizzare gli effetti positivi sulla produzione e ridurre gli sprechi. Nell'ambito degli interventi che l'agricoltore può programmare su queste basi, sicuramente vi sono le fertilizzazioni azotate, di particolare rilievo in relazione al loro potere di influenzare le dinamiche di crescita della pianta e quindi le tendenze dei raccolti: sia la quantità che la qualità delle produzioni risultano infatti strettamente dipendenti dalle disponibilità di azoto nel terreno.

In tale contesto, un modello colturale è stato applicato per la valutazione delle potenzialità produttive dell'area oggetto di studio in funzione delle caratteristiche climatiche e pedologiche della zona. L'analisi è stata condotta tramite la costruzione di curve della resa quanti-qualitativa potenziale, delle varietà di frumento tenero analizzate, in risposta a dosi crescenti di concimazione azotata.

### *3.1.2 Analisi e scelta del modello di simulazione*

Il numero di modelli applicati in agricoltura è molto ampio e in continua crescita. Tutti i modelli colturali attualmente esistenti sono capaci di riprodurre le rese produttive delle colture in relazione alle dinamiche del suolo (acqua, elementi nutritivi), alle condizioni meteorologiche ed agli interventi di gestione. Alcuni riescono a simulare anche gli impatti sull'ambiente in termini di erosione del suolo, lisciviazione, ecc. I modelli possono inoltre lavorare a scale di applicazione diverse, ovvero riprodurre un singolo processo, simulare determinati fenomeni a scala aziendale (come ad esempio CropSyst, DSSAT, SiriusQuality, ecc.) oppure a scala di bacino (come SWAT, WEPP, ecc.). Esistono inoltre modelli capaci di riprodurre la fenologia e la resa di numerose colture, altri invece sviluppati per simulare i processi di crescita e di produzione di colture specifiche. Pertanto, la scelta del modello risulta essere una fase di cruciale importanza, funzionale all'obiettivo che si intende perseguire.

Sulla base di queste premesse, la fase iniziale del progetto si è pertanto concentrata nell'analizzare le caratteristiche principali (dati di input richiesti, principali processi simulati, output, colture simulate ecc.) di due modelli di simulazione colturale utilizzati in ambito cerealicolo: SiriusQuality (Martre et al., 2006) e CropSyst (Stöckle et al., 2003). Ambedue i modelli sono di tipo deterministico (anche detti *process-based*), perché sono in grado di riprodurre le dinamiche di sviluppo e crescita della coltura attraverso la simulazione dei diversi processi che ne sono alla

base. Le principali variabili in input richieste sono: il tipo di coltura (descritta in base all'interazione con i fattori ambientali); le caratteristiche pedologiche del terreno in esame; i dati meteorologici giornalieri (precipitazioni, temperature massima e minima dell'aria, radiazione solare globale); il tipo e la quantità di fertilizzanti utilizzati e la loro epoca di applicazione.

CropSyst è un modello capace di simulare su base giornaliera l'evoluzione di sistemi colturali diversi in diverse condizioni pedo-climatiche. Il modello fornisce vari output, tra i quali rivestono particolare importanza gli andamenti nel tempo della biomassa e superficie fogliare, l'evoluzione della tipologia e della quantità di azoto nel sistema, i movimenti d'acqua e soluti nel terreno, l'evapotraspirazione e gli effetti degli stress idrici e azotati sulla crescita della coltura. I processi simulati da CropSyst sono il bilancio idrico e di azoto del suolo e la crescita e lo sviluppo di varie colture erbacee, attraverso un simulatore generico.

SiriusQuality (vers. 2) è un modello di simulazione della crescita sviluppato per riprodurre la fenologia e la resa proprio del frumento. Tale modello, già ampiamente testato in ambito scientifico, è capace di calcolare la produzione di biomassa a partire dalla radiazione fotosinteticamente attiva intercettata (PAR) del frumento. L'uso di coefficienti di ripartizione regola la distribuzione della biomassa giornaliera prodotta nei diversi organi della pianta (foglie, steli, radici e granella) sulla base della fenologia colturale (Jamieson et al., 1998). Sirius comprende anche un sottomodello "suolo" che permette di simulare la distribuzione dell'acqua e dell'azoto nel terreno così da poterne valutare l'assorbimento da parte della coltura.

Dal confronto fra i due modelli, basato su quanto riportato in letteratura, sulla valutazione della complessità, in termini di dati di input ed output, nonché sull'affidabilità delle prestazioni, è stato deciso di utilizzare SiriusQuality. Questo modello infatti, in quanto specificatamente sviluppato per il frumento, a fronte di un minore numero di parametri in ingresso per la descrizione delle caratteristiche varietali, è risultato in grado di riprodurre più coerentemente lo sviluppo e la crescita della coltura e quindi è stato ritenuto maggiormente adatto per gli obiettivi del presente progetto.

Si è quindi proceduto ad analizzare le variabili di ingresso (dati di input) necessarie per la calibrazione del SiriusQuality. I parametri di input principali richiesti dal modello sono: i) dati meteo giornalieri di temperatura, minima e massima, precipitazioni e radiazione globale, ii) parametri di gestione della coltura come data di semina, parametri cultivar-specifici (i.e. sensibilità fotoperiodica, durata del periodo di riempimento della granella, ecc.), iii) proprietà relative al

profilo del suolo (tessitura, profondità, contenuto iniziale di acqua ed azoto, ecc.), iv) gestione dei fertilizzanti e degli interventi irrigui, v) concentrazione della CO<sub>2</sub> atmosferica.

Per poter riprodurre lo sviluppo di una determinata varietà, il modello SiriusQuality necessita di una serie di informazioni riguardanti alcune caratteristiche tipiche della varietà oggetto della simulazione (parametri varietali). I parametri varietali necessari al modello sono diversi, fra cui i principali sono:

- Sommatoria termica del periodo antesi-maturità
- Fillocrone (tempo che intercorre fra la comparsa di due foglie successive, ossia per lo sviluppo completo di una foglia, espresso come sommatoria termica)
- nr. minimo di foglie prodotte
- risposta fotoperiodica
- coefficienti di vernalizzazione
- dimensioni massime potenziali della foglia bandiera.

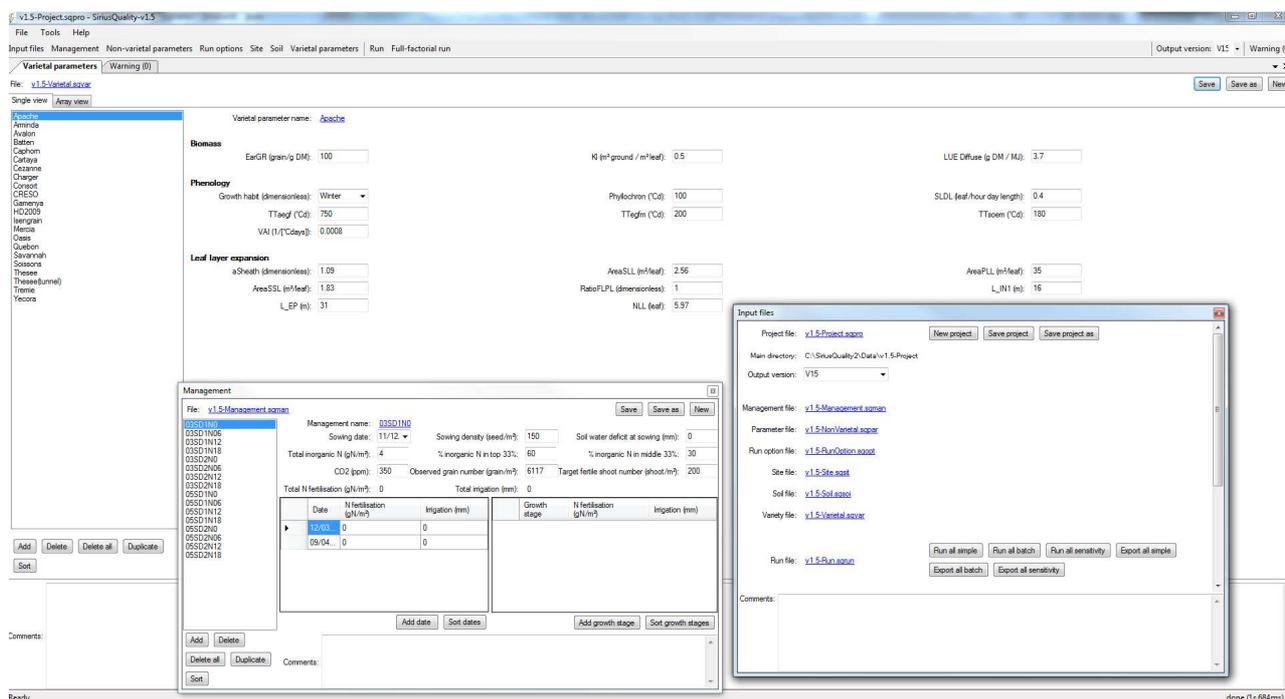


Figura 1 - Schermata del programma SiriusQuality 2 (finestra per l'inserimento dei parametri colturali e di gestione)

### 3.1.3. Applicazione del modello per la valutazione delle potenzialità produttive

#### Caratteristiche delle varietà di frumento tenero analizzate

Il frumento tenero è una coltura che si adatta soprattutto a terreni di buona fertilità, di medio impasto ed argillosi, mentre produzioni più scadenti si osservano in presenza di suoli sabbiosi, poveri e a reazione acida. È una pianta a medie esigenze idriche, concentrate soprattutto nel periodo tra la levata e le prime fasi di maturazione; teme fortemente, specie nei periodi freddi, il ristagno d'acqua nel terreno a seguito del quale si verificano uno sviluppo stentato per asfissia radicale e frequenti attacchi parassitari; infine, l'azione di vento forte e/o di temporali primaverili può risultare dannosa creando fenomeni di allettamento.

Le caratteristiche funzionali all'applicazione del modello delle cultivar analizzate nell'ambito del progetto sono riassunte nelle tabelle sottostanti. In particolare tutte e tre le varietà (Palesio, Pandas e Bolero) sono varietà di frumento tenero panificabile superiore, di cui due (Palesio e Pandas) sono a ciclo vegetativo medio-precoce e una (Bolero) medio tardivo. Tutte presentano spighe aristate e taglia da bassa (70-80 cm di altezza) a medio-alta (90-96 cm di altezza). La loro resistenza all'allettamento è buona (Bolero e Pandas) ed ottima (Palesio). Tutte e tre si caratterizzano per la loro buona resistenza al freddo e alle patologie fungine.

#### BOLERO

<b>Alternatività:</b>	si	
<b>Precocità:</b>	medio/tardiva (autunnale/primaverile)	
<b>Taglia:</b>	bassa (70-80 cm)	
<b>Spiga:</b>	aristata (tondeggiante)	
<b>Colore:</b>	Bianca	
<b>Resistenza all'allettamento:</b>	buona	
<b>Resistenza al freddo:</b>	buona	
<b>Resistenza all'oidio:</b>	Buona	
<b>Resistenza alla ruggine gialla:</b>	Buona	
<b>Resistenza alla ruggine bruna:</b>	buona	
<b>Classificazione tecnologica:</b>	panificabile superiore	
<b>Note:</b> Bolero è una varietà di frumento tenero panificabile superiore dal ciclo vegetativo medio tardivo che si caratterizza per la sua resistenza al freddo e alle patologie fungine. La varietà taglia bassa, presenta la spiga aristata fusiforme e la granella tondeggiante e di colore bianca. Le caratteristiche molitorie di Bolero sono molto apprezzate dall'industria di trasformazione e la varietà viene raccomandata anche per le colture biologiche.		

## PANDAS

<b>Alternatività:</b>	n.a	
<b>Precocità:</b>	medio/precoce	
<b>Taglia:</b>	medio-alta (90-95 cm)	
<b>Spiga:</b>	aristata	
<b>Colore:</b>	ambrata	
<b>Resistenza all'allettamento:</b>	buona	
<b>Resistenza al freddo:</b>	n.a	
<b>Resistenza all'oidio:</b>	n.a	
<b>Resistenza alla ruggine gialla:</b>	n.a	
<b>Resistenza alla ruggine bruna:</b>	n.a	
<b>Classificazione tecnologica:</b>	panificabile superiore	
<p><b>Note:</b> varietà rustica, adatta a tutti gli areali del centro Italia. Fornisce buoni risultati anche negli ambienti marginali e su terreni meno fertili, molto apprezzata dai mulini. Granella con elevato contenuto proteico.</p>		

## PALESIO

<b>Alternatività:</b>	si	
<b>Precocità:</b>	medio/precoce	
<b>Taglia:</b>	media	
<b>Spiga:</b>	aristata	
<b>Colore:</b>	Rosso	
<b>Resistenza all'allettamento:</b>	ottima	
<b>Resistenza al freddo:</b>	n.a	
<b>Resistenza all'oidio:</b>	Buona	
<b>Resistenza alla ruggine gialla:</b>	Ottima	
<b>Resistenza alla ruggine bruna:</b>	Buona	
<b>Classificazione tecnologica:</b>	panificabile superiore	
<p><b>Note:</b> n.a</p>		

### Calibrazione del modello SiriusQuality

Per utilizzare il modello SiriusQuality, al fine di riprodurre le capacità produttive delle tre varietà nel contesto pedo-climatico oggetto di studio, sono state individuate due varietà di frumento tenero, aventi caratteristiche eco-fisiologiche molto simili a quelle interessate dal progetto, per le quali erano disponibili dati fenologici, di resa e concimazioni per un numero di anni sufficiente a calibrare e validare il modello. Nello specifico, sono state individuate una varietà a ciclo medio precoce (Mieti) ed una a ciclo medio tardivo (Isengrain). Per tali varietà sono stati presi dati di fenologia e di resa, nonché quelli gestionali forniti dal CRA (Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura), Sezione di Sant' Angelo Lodigiano (Lodi) nell'ambito della loro rete nazionale di sperimentazione finalizzata al confronto varietale di frumento tenero in Italia. Tale banca dati contiene informazioni riguardanti la data di semina, concimazioni, resa (ton/ha) e spigatura (in termini di numero di giorni dal 1° di aprile) dal 1992 al 2008 per 130 varietà di grano tenero sperimentate nelle zone più vocate alla cerealicoltura in Toscana (province di Arezzo, Grosseto e Pisa).

Le Tabelle 1 e 2 riportano i dati agro fenologici della varietà medio-precoce e di quella medio-tardiva per le due stazioni sperimentali utilizzati per la calibrazione/validazione del modello.

Tabella 1 – Dati agro-fenologici relativi alla stazione sperimentale in Provincia di Arezzo per le la cultivar medio-precoce e medio-tardiva

#### MEDIO PRECOCE - CESA (AR)

ANNO	Resa (Ton/ha)	Data Spigatura (gg)	Antesi (gg)	Data semina	Data raccolta
2002	5.63	127	133	17/11/2001	04/07/2002
2003	6.1	129	135	12/11/2002	04/07/2003
2004	8.33	132	138	14/11/2003	10/07/2004
2005	7.8	134	140	16/11/2004	11/07/2005
2006	7.46	137	143	12/01/2006	12/07/2006
2007	7.19	116	122	03/11/2006	29/06/2007

#### MEDIO TARDIVA - CESA (AR)

2002	7.37	130	137	17/11/2001	04/07/2002
2003	6.14	134	141	12/11/2002	04/07/2003
2004	8.55	139	146	14/11/2003	10/07/2004
2006	8.93	142	149	12/01/2006	12/07/2006
2007	7.31	124	131	03/11/2006	29/06/2007

Tabella 2 – Dati agro-fenologici relativi alla stazione sperimentale in Provincia di Pisa per le la cultivar medio-precocce e medio-tardiva

**MEDIO PRECOCE - SAN PIERO A GRADO (PI)**

ANNO	Resa (Ton/ha)	Data Spigatura (gg)	Antesi (gg)	Data semina	Data raccolta
1998	7.12	129	135	15/12/1997	<i>Non disp</i>
1999	5.09	122	128	28/11/1998	09/07/1997
2000	6.99	127	133	03/01/2000	02/07/2001
2002	8.27	117	123	07/12/2001	27/07/2002
2003	5.67	139	145	07/02/2003	02/07/2003
2004	7.73	130	136	20/12/2003	09/07/2004
2005	7.59	125	131	25/11/2004	13/07/2005
2006	7.08	124	130	24/11/2005	14/07/2006

**MEDIO TARDIVA - SAN PIERO A GRADO (PI)**

2002	7.97	123	130	07/12/2001	27/07/2002
2003	6.21	144	151	07/02/2003	02/07/2003
2004	8.34	136	143	20/12/2003	09/07/2004
2006	7.23	128	135	24/11/2005	14/07/2006

Il modello di Sirius è stato pertanto calibrato e validato per le due cultivar selezionate su 2 località Toscane: Cesa (AR) [Lat: 43.30, Long: 11.80] e San Piero a Grado (PI) [Lat: 43.70, Long: 10.30].

*Dati meteorologici utilizzati per l'applicazione del modello SiriusQuality*

I dati climatici da utilizzare per l'applicazione del modello sull'area di studio sono stati estratti dal database MARS (<http://mars.jrc.ec.europa.eu>). Il database di MARS, creato appositamente per scopi modellistici in agricoltura, fornisce dati meteorologici giornalieri, derivanti dall'interpolazione di dati osservati, organizzati in una griglia a 25 km di risoluzione. Il procedimento di interpolazione adottato in MARS fa riferimento alle aree agricole in modo che ogni punto della griglia sia rappresentativo della climatologia osservata di determinate zone. I dati di MARS utilizzati in questo studio sono riferiti ad una finestra temporale che va dal 1° gennaio 1975 al 31 dicembre 2012 fornendo dati giornalieri di temperatura minima e massima, precipitazioni e radiazione globale osservati. I dati riferiti all'area di studio sono stati quindi estratti dalla cella di MARS più vicina al campo sperimentale. Essendo la risoluzione di tali dati piuttosto ampia, i dati MARS sono stati sottoposti ad un procedimento di *downscaling spaziale*, ovvero ad una correzione sistematica sulla base dei dati meteorologici provenienti dalla stazione più vicina all'area della sperimentazione (Stazione di San Gimignano (SI), LAT 43° 28', LON 11° 02'). Da tale

stazione sono stati pertanto scaricati i dati giornalieri di precipitazione, radiazione solare e temperatura riferiti la serie temporale dal 10/12/1993 al 13/5/2012. Tali dati sono stati quindi sottoposti ad un controllo quali-quantitativo al fine di accertare la presenza o meno di dati mancanti o dati inammissibili (es. temperature massime inferiori alle minime). La correzione dei dati MARS si è avvalsa del calcolo, per ciascun parametro (temperatura, precipitazione e radiazione solare), della variazione fra i due dataset (MARS e Stazione di San Gimignano) sulla base dei valori medi mensili utilizzando le seguenti formule:

$$\Delta T_M = Avg(T_{M,SIM}) - Avg(T_{M,OBS}) \quad (1)$$

$$\Delta P_M \% = \frac{1/N \sum P_{M,OBS} - 1/N \sum P_{M,OBS}}{1/N \sum P_{M,OBS}} \quad (2)$$

Dove T è la minima (o massima) temperatura, M rappresenta il mese a cui ci si riferisce, P è la precipitazione ed N il numero degli anni. La variazione della radiazione solare ( $\Delta R\%$ ) è stata calcolata sulla base della formula (2).

#### *Dati di suolo*

Nel corso dei rilievi in campo sono stati estratti campioni di suolo al fine di determinarne le caratteristiche principali (tessitura, pH, Bulk density, base di saturazione, carbonio organico) da utilizzare per la parametrizzazione del suolo nel modello. La Tabella 3 riporta i dati medi dell'area. Trattasi di terreni franco argillosi (mediamente 40% di argilla e 35% di limo) con buona adesività e media plasticità, buon addensamento delle particelle e con pH mediamente alcalino (pH medio 7.5) caratteristico della zona.

**Tabella 3 - Caratteristiche del suolo**

<b>Argilla (%)</b>	40
<b>Limo (%)</b>	35
<b>Sabbia (%)</b>	25
<b>pH</b>	7.5
<b>Bulk density (kg/dm<sup>3</sup>)</b>	1.37
<b>Base di saturazione (%)</b>	100
<b>Carbonio organico (% del peso)</b>	1.63
<b>Tipo di suolo</b>	Franco argilloso

### 3.2. Validazione del modello (DISPAA - UNIFI)

La fase di validazione ha previsto la messa a confronto dei dati simulati dal modello con quelli sperimentali osservati, diversi da quelli impiegati nella sua calibrazione. Nel nostro caso, i dati relativi a 2 anni per Cesa (AR) e due anni per San Piero a Grado (PI) delle due varietà (medio precoce e medio tardiva) sono stati impiegati per la calibrazione del modello, i restanti anni sono stati invece impiegati per la sua validazione. In tal modo è stato possibile identificare il livello di accuratezza predittiva del modello stesso. La capacità del modello di riprodurre la resa e la fenologia delle due tipologie di cultivar è stata effettuata mettendo a confronto i dati osservati con i risultati delle simulazioni tramite il calcolo di opportuni indici statistici quali il Root Mean Square Error (RMSE) e il coefficiente di correlazione di Pearson (r) secondo le seguenti formule:

$$RMSE = \sqrt{N^{-1} \sum_{i=1}^N (Obs_i - Sim_i)^2}$$

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$$

### 3.3 Risultati e discussione (DISPAA - UNIFI)

Il grafico della Figura 2 riporta i dati di temperatura minima e massima e di precipitazione cumulata medi giornalieri (espressi in Giorni Giuliani) riferiti al periodo 1975-2012. Tali dati sono pertanto rappresentativi della climatologia dell'area in esame secondo i dati corretti del database MARS.

Da tale grafico si evince, che il clima della zona è tipicamente mediterraneo con temperature massime che si attestano intorno ai 30°C durante i mesi estivi e temperature invernali miti che raramente scendono sotto 0°C. Le precipitazioni (800 mm annui) sono concentrate prevalentemente nei mesi autunnali, con un picco secondario nei mesi primaverili.

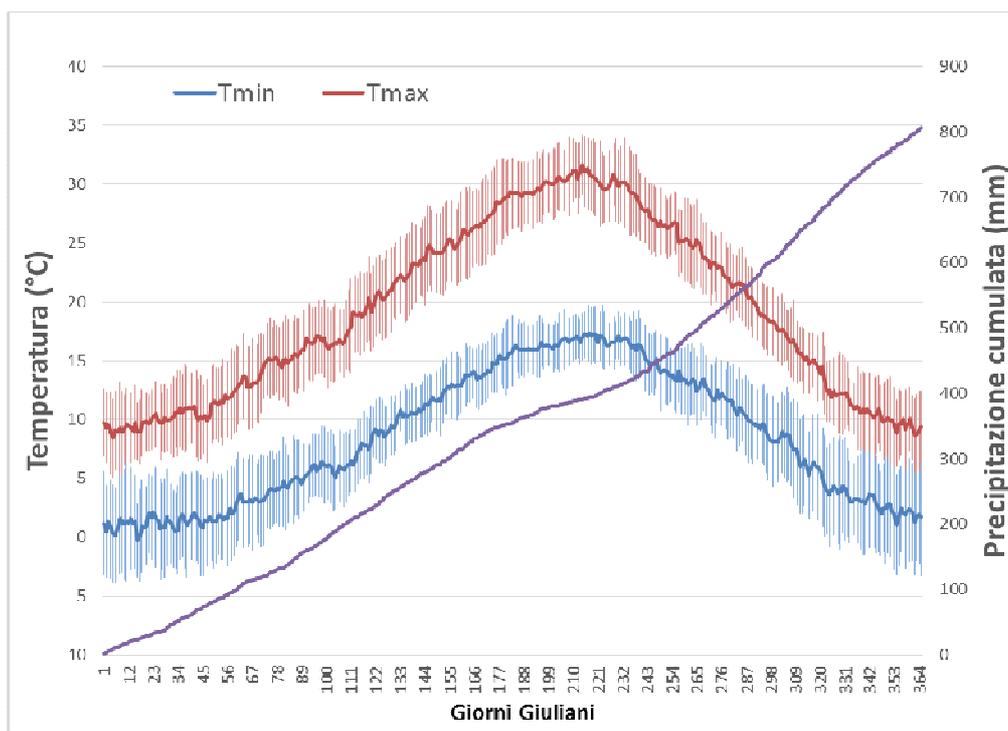


Figura 2 – climatologia (tmin, tmax e precipitazioni cumulate) del database MARS relativa all'area di studio.

Il modello SiriusQuality, calibrato sulle due varietà (medio-precoce e medio-tardiva), è risultato robusto e valido per riprodurre la fenologia e la resa delle colture. In riferimento alla cultivar medio precoce l'RMSE risulta di 3.3 giorni per la fenologia mentre di 0.7 tonnellate/ha per la resa. Il coefficiente di Pearson ha valore 0.96 e 0.64, rispettivamente per la fenologia e la resa della varietà. Per la varietà medio tardiva, l'RMSE ha valore di 3.7 giorni per la fenologia e 1.1 tonnellate/ha per la resa. Il calcolo del coefficiente di Pearson ha portato come risultati: 0.95 per la fenologia e 0.59 per la resa. La calibrazione del modello ha permesso pertanto una buona simulazione sia della resa sia della fenologia di entrambe le cultivar.

Una volta calibrato e validato, il modello SiriusQuality è stato applicato per valutare le potenzialità produttive di cultivar a differente durata del ciclo di crescita nell'area di studio. Più specificatamente, è stata stimata la risposta della resa, in termini quantitativi e qualitativi, in funzione di dosi crescenti di concimazione azotata (da 0 a 270 kg di azoto ad ettaro). A tale scopo è stata ipotizzata una gestione standard della coltura: data di semina tipica della zona e somministrazione dell'azoto pari ad 1/3 del totale nella fase di accestimento e a 2/3 del totale in fase di levata. Le rese e la relativa percentuale proteica della granella delle due tipologie di varietà

(medio precoce e medio tardiva) sono state simulate per il periodo 1975-2012. I risultati ottenuti dalle simulazioni sono stati quindi mediati e riportati nei grafici delle Figure 3 e 4.

Dalle simulazioni ottenute si evince che la varietà medio-tardiva ha mediamente potenzialità produttive superiori rispetto alle varietà medio-precoci. Inoltre, la risposta di entrambe le tipologie di varietà tende ad aumentare in modo lineare per aumenti progressivi di livelli di concimazione fino ad arrivare ad un punto di saturazione, al di sopra del quale la resa tende a stabilizzarsi (Figura 3). Nello specifico, secondo il modello la varietà medio-tardiva, nelle specifiche condizioni pedo-climatiche, considerate può arrivare a rese di poco inferiori alle 6ton/ha quando si forniscano 180 Kg di azoto ad ettaro; mentre la varietà medio precoce stabilizza le rese (3.5 ton/ha) a concimazioni di circa 120 kg di azoto ad ettaro. Questi risultati trovano riscontro con quanto osservato nelle rilevazioni in campo. Difatti, sulla base delle misurazioni effettuate (vedi tabella 4 e Figura 4), la resa della varietà medio-tardiva (Bolero) è risultata superiore rispetto a quella delle varietà medio-precoci (Pandas e Palesio), rispettivamente pari a 4,46 ton/ha e 3,49 ton/ha.

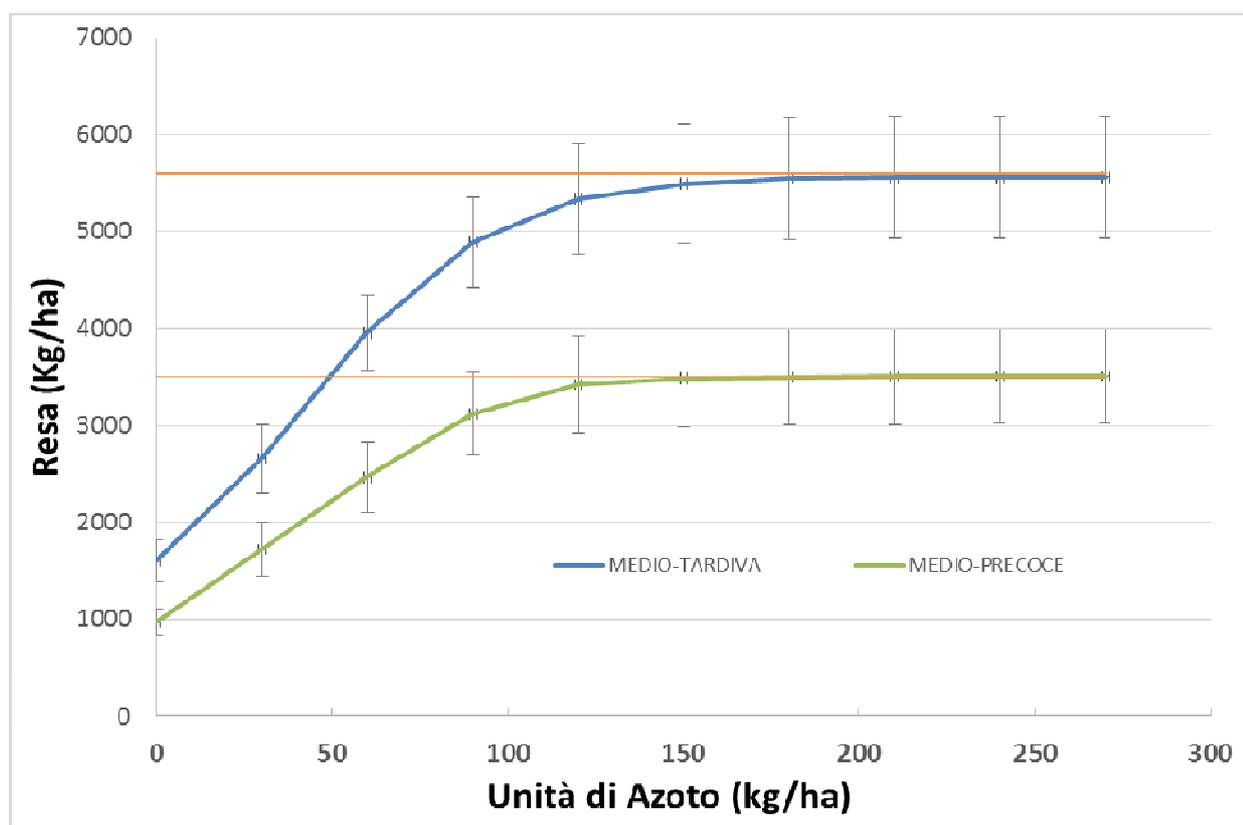


Figura 3 – Resa potenziale delle varietà medio-precoce e medio-tardiva in funzione di vari livelli di concimazione azotata.

Tabella 4 - Livelli di azoto somministrati e data di somministrazione per le tre varietà (Pal = Palesio, Bol = Bolero, Pan = Pandas), resa e percentuale proteica della granella nell'area di sperimentazione

Varietà	Ciclo	Concimazione Azotata (Kg/ha)	Resa (t/ha)	% proteica
Pal1	Medio precoce	170	2.62	10.99
Pal2	Medio precoce	140	3.11	11.34
Pal3	Medio precoce	110	2.96	11.25
Bol4	Medio tardiva	110	3.48	11.55
Bol6	Medio tardiva	140	5.13	11.03
Bol7	Medio tardiva	170	5.26	11.79
Pan9	Medio precoce	110	4.68	10.41
Pan10	Medio precoce	140	3.84	9.29
Pan11	Medio precoce	170	3.77	11.80

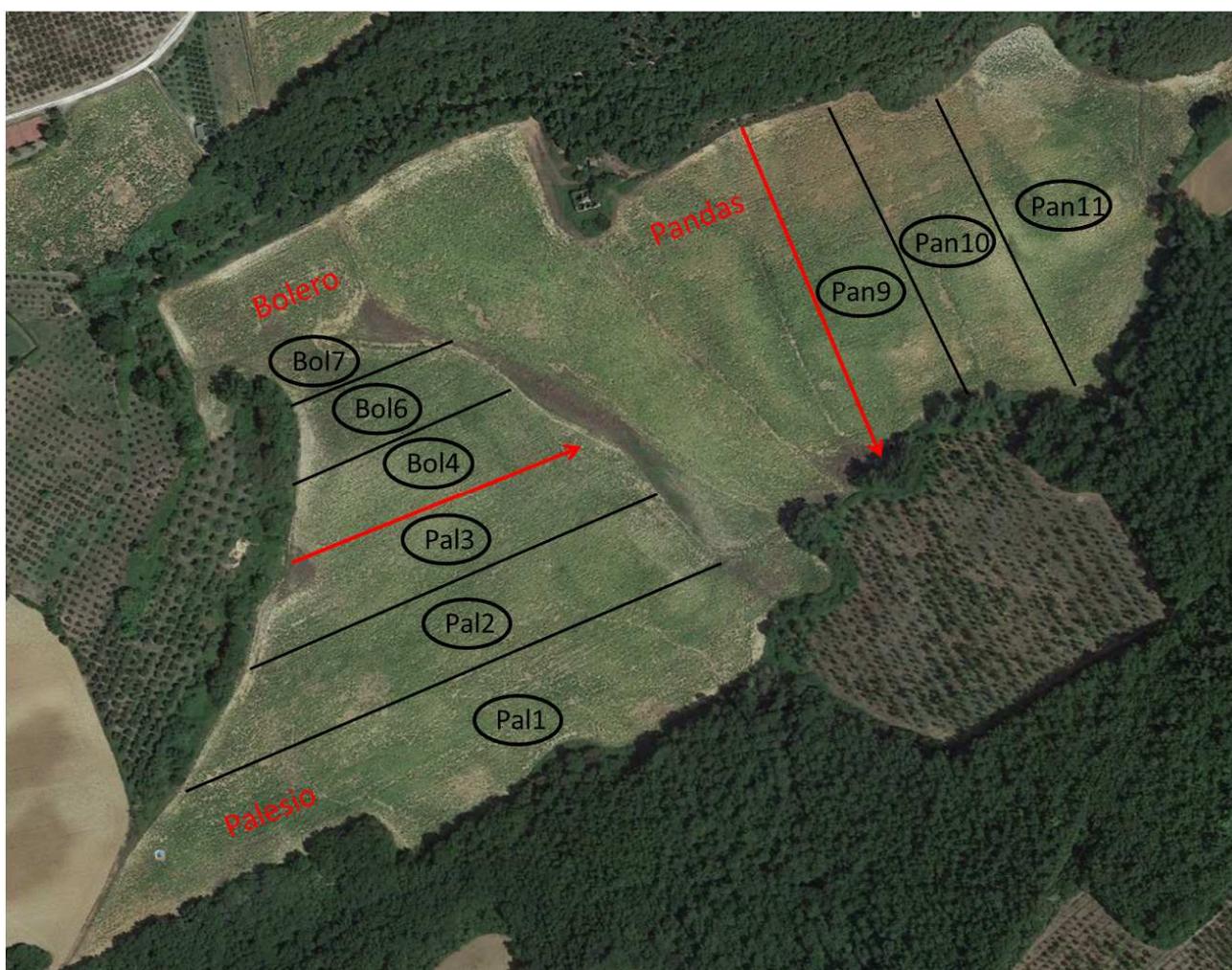


Figura 4 - Mappa delle tre varietà e delle concimazioni nel campo sperimentale (LAT 43° 24', LON 11° 03')

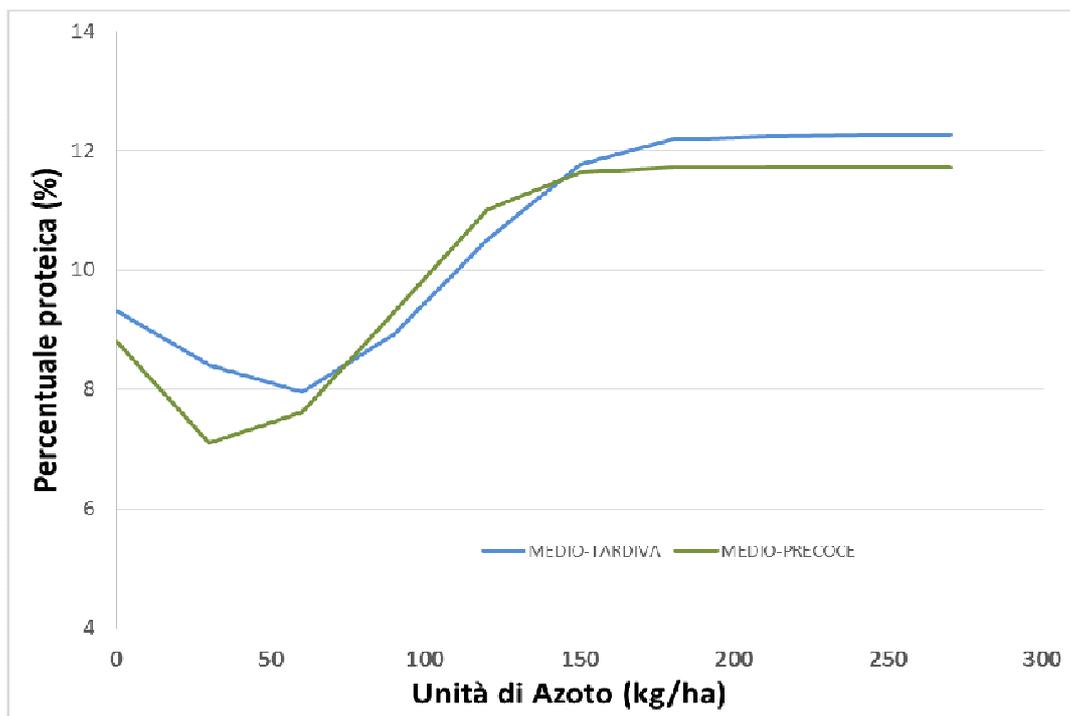


Figura 5 – Percentuale proteica potenziale delle varietà medio-precoce e medio-tardiva in funzione di vari livelli di concimazione azotata.

Sulla base dei risultati delle simulazioni di SiriusQuality, la percentuale proteica della granella non differisce sostanzialmente tra le due tipologie varietali, seppur si può osservare una leggera tendenza della varietà medio-tardiva ad un maggior contenuto proteico (Figura 5). Anche la percentuale proteica della granella tende alla saturazione per livelli alti di azoto (circa 180 Kg/ha di azoto per la medio tardiva, circa 140 kg/ha di azoto per le medio precoci). Anche in questo caso, i risultati modellistici trovano riscontro con quanto osservato nelle analisi effettuate sui campioni raccolti dall'area di studio in fase di raccolta finale (vedi tabella 4).

### Conclusioni

In conclusione, possiamo dire che il modello messo a punto nell'ambito del progetto si è dimostrato efficace e robusto per valutare le potenzialità produttive, in termini di resa e percentuale proteica della granella, delle varietà di frumento tenero analizzate (medio precoce e medio tardiva) nelle condizioni pedo-climatiche caratteristiche dell'area.

Similmente a quanto osservato in campo, i risultati modellistici suggeriscono che, nelle condizioni pedo-climatiche dell'area di studio, varietà medio-tardive presentano una potenzialità produttiva maggiore rispetto a varietà più precoci.

### *Bibliografia*

Stöckle, Claudio O., Marcello Donatelli, and Roger Nelson. "CropSyst, a cropping systems simulation model." *European Journal of Agronomy* 18.3 (2003): 289-307.

Martre P., Jamieson P.D., Semenov M.A., Zyskowski R.F., Porter J.R. & Triboi E. (2006) Modelling protein content and composition in relation to crop nitrogen dynamics for wheat. *European Journal of Agronomy*, 25, 138-154.

Jamieson, P. D., et al. "A comparison of the models AFRCWHEAT2, CERES-Wheat, Sirius, SUCROS2 and SWHEAT with measurements from wheat grown under drought." *Field Crops Research* 55.1 (1998): 23-44.

## ***4) Isolamento e identificazione delle popolazioni microbiche presenti nella madre acida adottata dal "Consorzio Pane Toscano a Lievitazione Naturale"***

### *4.1 Isolamento e identificazione delle popolazioni microbiche presenti nella madre acida adottata dal "Consorzio Pane Toscano a Lievitazione Naturale" (CPT) (DiSAAA-a –UNIFI Pisa/micro)*

Al fine di isolare le popolazioni microbiche presenti nella madre acida adottata dal "Consorzio Pane Toscano a Lievitazione Naturale" (CPT), il campione di madre acida fornita dal Consorzio è stato sottoposto ad analisi microbiologica (panificio Giuntini). Tale tecnica, coltura dipendente, ha previsto l'utilizzo del metodo delle diluizioni seriali e successiva semina su mezzi di coltura agarizzati specifici per l'isolamento di lieviti (WL Nutrient, YPD, Malto) e batteri lattici (MRS Man Rogosa Sharpe, mMRS, MRS5 e SDB, Sour Dough Bacteria). Le piastre MRS, mMRS, MRS5 e SDB inoculate sono state incubate in giare sature con CO<sub>2</sub> utilizzando buste per anaerobiosi (AnaeroGen, Oxoid). Le piastre di Malto, YPD e WL Nutrient Medium inoculate sono state incubate in condizioni aerobiche. I risultati ottenuti hanno permesso di determinare i terreni ottimali per l'isolamento e identificazione delle comunità microbiche caratterizzanti la madre acida suddetta.

In particolare, per l'isolamento dei batteri lattici sono stati impiegati i mezzi di coltura MRSm e SDB e per l'isolamento dei lieviti i mezzi YPD e WL Nutrient agar. L'analisi microbiologica ha permesso di evidenziare la presenza nei campioni di madre acida di lieviti e batteri lattici nell'ordine di  $2,14 \pm 0,17 \cdot 10^7$  e  $2,33 \pm 0,54 \cdot 10^9$  UFC/g rispettivamente. Il rapporto tra batteri lattici e lieviti è risultato di 100:1 evidenziando una capacità acidificante e lievitante degli impasti nella norma. Le colonie sviluppatesi, scelte in maniera casuale all'interno di ciascuna morfologia evidenziata, sono state isolate in coltura pura mediante successivi strisci su mezzi di coltura agarizzati. Successivamente, gli isolati, unitamente a ceppi di collezione utilizzati come riferimento, sono stati sottoposti ad estrazione del DNA genomico per essere identificati a livello di genere e specie. L'identificazione dei batteri isolati è stata effettuata mediante analisi ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis). Tale tecnica ha previsto l'amplificazione PCR del 16S rDNA, mediante i primers 27F e 1495R, seguita dall'analisi di restrizione con gli enzimi *AluI*, *HaeIII* ed *Hinfi*. La successiva combinazione dei profili di restrizione ottenuti con i tre enzimi (Tab. 1), ha permesso di raggruppare i batteri lattici isolati in tre differenti biotipi.

Tab. 1: Distribuzione degli isolati batterici e dei ceppi batterici di riferimento nei gruppi derivanti dalla combinazione dei profili di restrizione ottenuti dall'analisi ARDRA

Ceppi	AluI	HaeIII	Hinfi	Biotipi
<i>Lb. sanfranciscensis</i> DSMZ 20451	1	1	1	1
<i>Lb. brevis</i> DSMZ 20054	2	2	2	2
<i>Lb. plantarum</i> DISAAA-a B23	3	3	3	3
<i>Lb. curvatus</i> DISAAA-a LB51	4	4	4	4
<i>Lb. fermentum</i> DSMZ 20052	5	5	5	5
<i>Lb. panis</i> DSMZ 6035	6	6	6	6
Isolati (1-2; 5; 8; 10; 12-13; 16-18; 20; 26-29; 32; 37-39; 41-43; 52; 55; 57-58; 60; 62; 65; 67; 73-74; 78; 82-87; 89-90; 92; 94-95; 97-98)	7	1	7	7
Isolati (3; 6-7; 9; 11; 14-15; 19; 21-22; 24-25; 30-31; 33-36; 40; 44-49; 51; 53; 56; 59; 61; 63-64; 66; 68-72; 75-77; 79-81; 88; 91; 93; 96; 99)	1	1	1	1
Isolati (23)	1	1	8	8

Ai fini dell'identificazione molecolare dei batteri lattici isolati, l'amplificato 16S rDNA di alcuni rappresentanti per ciascuno dei tre biotipi è stato purificato e sequenziato. Tutti i batteri lattici isolati sono stati identificati appartenenti alla specie *Lb. sanfranciscensis*. I risultati ottenuti dalle analisi delle sequenze non hanno permesso di evidenziare le differenze tra i tre diversi biotipi, riscontrate invece mediante l'analisi di restrizione. Ciò, probabilmente, in quanto tale analisi

permette di evidenziare solo le sequenze maggiormente espresse nelle copie del gene 16S rRNA e non quelle meno espresse contenenti la mutazione dei siti target degli enzimi.

L'identificazione dei lieviti isolati è stata effettuata l'amplificazione PCR della regione ITS, mediante i primers ITS1 e ITS4, seguita dall'analisi di restrizione con gli enzimi *HaeIII* ed *HinfI*. La successiva combinazione dei profili di restrizione ottenuti con i due enzimi (Tab. 2), ha permesso di raggruppare i lieviti isolati in due differenti biotipi.

*Tab. 2: Distribuzione degli isolati fungini e dei ceppi dei lieviti di riferimento nei gruppi derivanti dalla combinazione dei profili di restrizione ottenuti dall'analisi RFLP dell'ITS*

Ceppi	ITS	HinfI	HaeIII	Biotipi
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 32167	850 pb	1	1	1
<i>D. bruxellensis</i> DiSAAA-B 1L	450 pb	2	2	2
<i>C. humilis</i> DBVPG 6753	630 pb	3	3	3
<i>K. exigua</i> DBVPG 6956	730 pb	4	4	4
Isolati 1-18; 20-35; 37-51; 103-120	630 pb	3	3	3
Isolati 19; 36	850 pb	1	1	1

Il confronto tra i profili di restrizione ottenuti dai ceppi di riferimento con quelli ottenuti dai lieviti isolati evidenziano che i lieviti del biotipo 3 sono ascrivibili a *Candida humilis*, mentre quelli del biotipi 1 sono ascrivibili a *Saccharomyces cerevisiae*. Il risultato delle analisi delle sequenze ha confermato quanto evidenziato dall'analisi di restrizione.

**5) Valutazione delle possibili alterazioni indotte sul sistema lievitante (madre acida) e quindi sulle caratteristiche degli impasti e del prodotto finito, dalle condizioni ambientali e di lavorazione adottate nelle diverse realtà produttive**

**5.1 Valutazione delle possibili alterazioni indotte sulle caratteristiche chimiche –composizionali degli impasti e del prodotto finito, dalle condizioni ambientali e di lavorazione adottate nelle diverse realtà produttive (DiSAAA-a -UNIFI Pisa/tecalim)**

Al fine di valutare se e quanto le diverse condizioni di lavorazione e ambientali possano nel tempo alterare l'equilibrio microbiologico che caratterizza il sistema lievitante adottato dal CPT, sono state condotte le analisi chimico/fisiche volte a caratterizzare gli impasti prodotti utilizzando il

sistema lievitante conservato e riprodotto in accordo a quanto previsto dal disciplinare di produzione in forni ubicati in varie zone del territorio regionale.

Le analisi chimiche sono state effettuate su tutti i campioni di impasti prelevati nei diversi forni e sui pani da essi prodotti. Su ogni campione è stata effettuata la rilevazione della temperatura e del pH, e dopo l'omogeneizzazione con Ultra Turrax sono state effettuate le analisi per la determinazione dei principali prodotti di fermentazione: etanolo, acido (D,L)-lattico, acido acetico.

I campioni sono stati inoltre sottoposti a valutazione del contenuto di umidità relativa.

I rapporti quantitativi tra i diversi prodotti determinati sperimentalmente possono fornire utili indicazioni sia sul decorso dei processi fermentativi, sia sulle caratteristiche organolettiche che saranno assunte dal pane cotto. A tale scopo, per ogni campione di pasta acida caratterizzato, sono stati calcolati alcuni indici fermentativi che possono rappresentare importanti parametri tecnologici da impiegare per la caratterizzazione dei processi produttivi considerati:

- il rapporto tra la concentrazione molare dell'acido lattico e quella dell'acido acetico riscontrate in un impasto, definito quoziente di fermentazione, è considerato un parametro dell'andamento fermentativo. Tale rapporto assume valori diversi in funzione di alcune variabili, quali durata della fermentazione, temperatura, specie di batteri lattici predominanti, condizioni di ossigenazione ecc;
- il rapporto tra la concentrazione molare dell'acido lattico e quella dell'alcool etilico, che può evidenziare il contributo fermentativo dei batteri lattici rispetto a quello dei lieviti alcolici;
- l'acidità, considerata come la somma delle concentrazioni molarie dell'acido lattico e dell'acido acetico.

## *5.2 Valutazione delle possibili alterazioni microbiologiche indotte sul sistema lievitante dalle condizioni ambientali e di lavorazione adottate nelle diverse realtà produttive (DiSAAA-a -UNIFI Pisa/micro)*

Per determinare le popolazioni microbiche presenti nel sistema lievitante alle diverse condizioni ambientali e di lavorazione adottate dai diversi forni è necessario adottare una tecnica molecolare coltura indipendente quale la PCR-DGGE, dopo estrazione del DNA direttamente dalla madre acida. L'elettroforesi su gel di poliacrilammide con gradiente di denaturanti chimici si basa sul principio per cui ogni frammento amplificato ha un suo punto specifico di denaturazione. Pertanto è possibile distinguere i frammenti, caratterizzati dalla stessa lunghezza ma da una differente

sequenza in basi azotate. Dopo la colorazione è possibile visualizzare i frammenti presenti sul gel, ciascuno dei quali rappresenta una specifica sequenza di rDNA appartenente ad una determinata specie microbica. La posizione del frammento sul gel permette di identificare la specie, e la sua concentrazione è proporzionale all'intensità del frammento. Tale metodo presenta alcune difficoltà dovute alla presenza di inibitori che possono interferire con la successiva fase di amplificazione. Allo scopo di ottenere un DNA adatto all'amplificazione è stato messo a punto un metodo di estrazione diretta del DNA (utilizzando un campione di madre acida proveniente dal panificio Giuntini), seguito da amplificazione mediante PCR della regione V3-V5 del 16S rDNA (batteri) e della regione D1-D2 del 26S rDNA (lieviti) e visualizzazione degli amplificati ottenuti mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio.

Successivamente è stato messo a punto il protocollo di separazione su gel di poliacrilammide con gradiente denaturante degli amplificati che ha permesso di ottenere profili rappresentanti le popolazioni fungine e batteriche caratterizzanti il campione di impasto acido.

Mediante l'impiego della tecnica PCR-DGGE è stato possibile identificare e confrontare le specie microbiche caratterizzanti l'impasto acido di tre diversi panifici (Giuntini, Domenici e Pane di Casore) unitamente a quello mantenuto presso il laboratorio tecnologico del DISAAA-a. Per quanto riguarda la popolazione batterica, i profili ottenuti dalla separazione elettroforetica su gel denaturante di poliacrilammide degli amplificati della regione V3-V4 del 16S rDNA dei campioni di impasto acido proveniente dai diversi forni sono riportati in figura 1. Ai fini di confermare l'identificazione delle specie batteriche rilevate mediante l'analisi dei profili DGGE dei diversi campioni, i frammenti d'interesse sono stati excisi e il DNA è stato amplificato e sottoposto a sequenziamento. Le sequenze, sono state analizzate per determinare l'omologia con le sequenze depositate in banca dati e la loro elaborazione ha permesso l'identificazione delle specie batteriche.

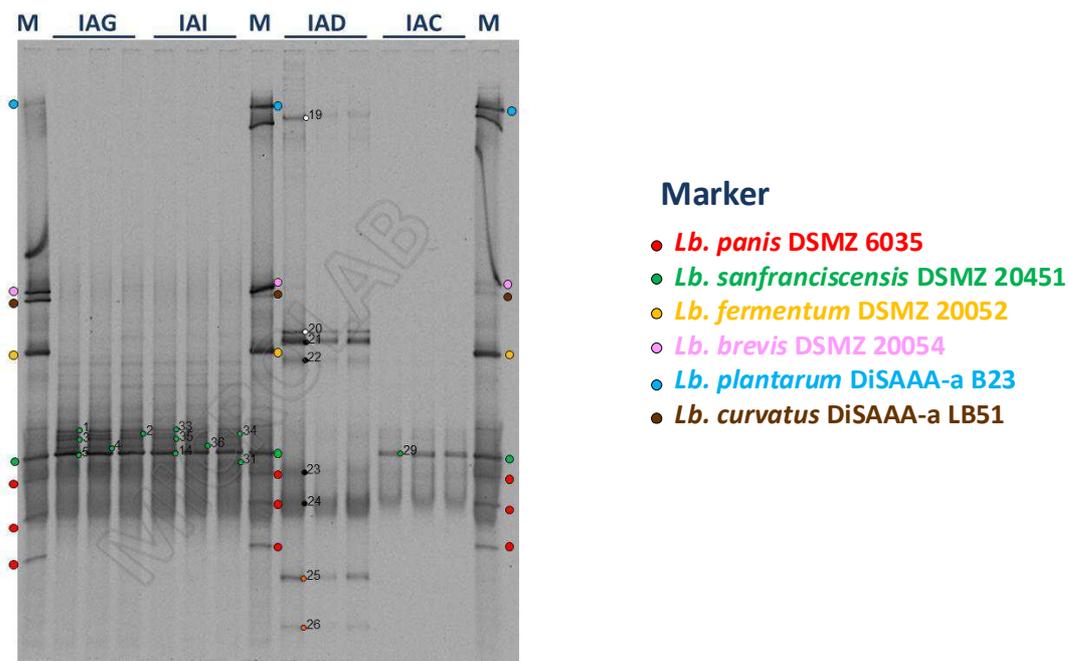
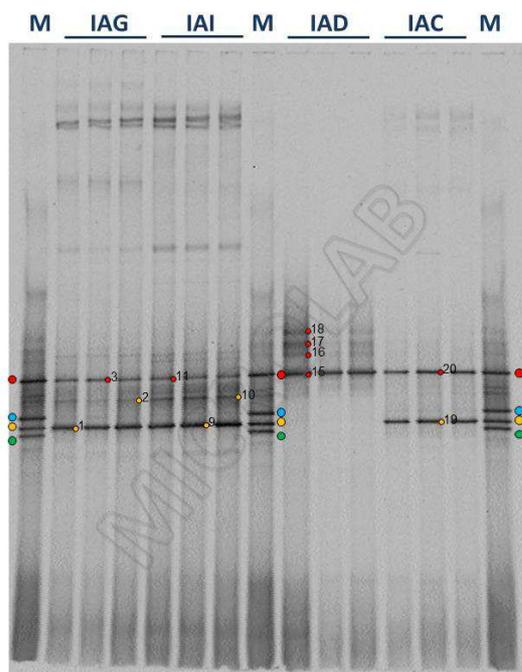


Fig. 1: Profilo DGGE dei prodotti PCR della regione V<sub>3</sub>-V<sub>4</sub> del 16S rDNA degli impasti acidi provenienti dai diversi panifici. M: marker; IAG: Panificio Giuntini (Lu); IAI: Laboratorio tecnologico; IAD: Panificio Domenici (Li); IAC: Panificio Pane di Casore (Pt). I frammenti di interesse prelevati e sequenziati sono indicati con il numero ed il marcatore colorato che indica l'ordine di appartenenza risultante dall'omologia delle sequenze in banca dati: ● *Lb. sanfranciscensis*, ● *Lb. pontis*, ● *W. cibaria*

Dai risultati ottenuti è possibile evidenziare un unico profilo relativo alle popolazioni batteriche degli impasti acidi provenienti dal panificio Giuntini, dal panificio Pane di Casore e dal Laboratorio Tecnologico del DiSAAA-a - Unipi. Tale profilo è caratterizzato da un frammento di elevata intensità, ascrivibile a *Lb. sanfranciscensis*. Esso non risulta presente nel profilo ottenuto dall'analisi DGGE dell'impasto acido proveniente dal panificio Domenici che presenta specie batteriche diverse.

Per quanto riguarda la popolazione fungina, i profili ottenuti dalla separazione elettroforetica su gel denaturante di poliacrilammide degli amplificati della regione D1-D2 del 26S rDNA dei campioni di impasto acido proveniente dai diversi forni sono riportati in figura 2. Ai fini di confermare l'identificazione delle specie fungine rilevate mediante l'analisi dei profili DGGE dei diversi campioni, i frammenti d'interesse sono stati excisi e il DNA è stato amplificato e sottoposto a sequenziamento. Le sequenze, sono state analizzate per determinare l'omologia con le sequenze depositate in banca dati e la loro elaborazione ha permesso l'identificazione delle specie fungine.



### Marker

- *S. cerevisiae* ATCC 32167
- *D. bruxellensis* DISAAA-a 1L
- *C. humilis* DBVPG 6753
- *K. exigua* DBVPG 6956

Fig. 2: Profilo DGGE dei prodotti PCR della regione D1-D2 del 26S rDNA degli impasti acidi provenienti dai diversi panifici. M: marker; IAG: Panificio Giuntini (Lu); IAI: Laboratorio tecnologico; IAD: Panificio Domenici (Li); IAC: Panificio Pane di Casore (Pt). I frammenti di interesse prelevati e sequenziati sono indicati con il numero ed il marcatore colorato che indica l'ordine di appartenenza risultante dall'omologia delle sequenze in banca dati: ● *S. cerevisiae* ● *C. humilis*.

Dai risultati ottenuti è possibile evidenziare un unico profilo relativo alle popolazioni fungine degli impasti acidi provenienti dal panificio Giuntini, dal panificio Pane di Casore e dal Laboratorio Tecnologico. Tale profilo è caratterizzato da due frammenti, entrambi di elevata intensità, ascrivibili a *Candida humilis* e a *Saccharomyces cerevisiae*. Il profilo ottenuto dall'analisi DGGE dell'impasto acido proveniente dal panificio Domenici risulta invece costituito da un unico frammento ascrivibile a *Saccharomyces cerevisiae*.

Dai risultati ottenuti mediante l'impiego della tecnica PCR-DGGE è stato possibile evidenziare che le condizioni ambientali e di lavorazione adottate nelle diverse realtà produttive non hanno dato origine ad alterazioni microbiologiche indotte sul sistema lievitante. La diversità delle popolazioni microbiche riscontrata nell'impasto acido proveniente dal panificio Domenici non è ascrivibile a cambiamenti indotti dall'ambiente. La tecnica molecolare PCR-DGGE si è mostrata uno strumento valido al fine della tracciabilità del microbiota caratterizzante l'impasto acido adottato dal "Consorzio Pane Toscano a Lievitazione Naturale" (CPT).

**6) Individuazione delle condizioni operative ottimali da impiegare nel corso del processo di liofilizzazione della madre acida al fine di indurre le minor alterazioni possibili agli equilibri microbiologici e chimico-composizionali esistenti all'interno della madre acida adottata dal CPT**

**6.1 Individuazione delle condizioni operative ottimali da impiegare nel corso del processo di liofilizzazione della madre acida e monitoraggio delle possibili alterazioni chimico-composizionali (DiSAAA-a - UNIFI Pisa/tecalim)**

Al fine di individuare le condizioni più idonee a produrre la madre acida liofilizzata, sono state sviluppate le seguenti fasi sperimentali:

- a) Scelta delle condizioni operative da adottare per il mantenimento della madre acida da inviare alla liofilizzazione: in un primo momento sono state ricercate le condizioni ottimali di conservazione della pasta madre. Il sistema di mantenimento della madre in acqua si è dimostrato il più efficiente tra quelli indagati, in quanto permette un maggior controllo termico e garantisce una maggior impermeabilizzazione all'ossigeno.
- b) Individuazione delle operazioni preliminari alla successiva fase di liofilizzazione (modalità seguite nel corso dell'operazione di "rinfresco" e condizioni di conservazione dell'impasto così ottenuto): a seguito di ripetute prove sperimentali volte all'individuazione delle condizioni operative più idonee per la procedura di rinfresco della madre acida da destinare alla liofilizzazione è stato definito uno specifico protocollo sperimentale: il rinfresco è stato eseguito a giorni alterni a partire dalla madre mantenuta in acqua; ad ogni rinfresco alla madre acida (fig. 3 A) si aggiunge una quantità equivalente in peso di farina forte ( $w \sim 280$ ) fornita dal Consorzio CPT e dell'acqua pura distillata in quantità pari al 40% in peso della farina utilizzata. I diversi ingredienti vengono impastati a temperatura ambiente per 15 minuti impiegando un'impastatrice automatica (fig. 3B); l'impasto così ottenuto viene immerso in acqua sterilizzata e mantenuto a 28 °C finché non inizia a galleggiare a seguito dell'incremento di volume indotto dall'attività microbica. A conclusione del processo la nuova madre viene conservata, immersa in acqua, in cella frigo a 4 °C. Per favorire la moltiplicazione microbica, all'impasto così ottenuto è stato aggiunto lo 0,5% in peso di D-fruttosio. In relazione alla scelta dello zucchero da inserire in ricetta, inizialmente sono state messe a confronto le performances di mantenimento della madre addizionata di D-glucosio o D-fruttosio. Entrambi gli zuccheri hanno dato buoni risultati sulla madre fresca, ma dai risultati su madre liofilizzata il fruttosio si è rivelato preferibile. I risultati migliori si sono ottenuti sottoponendo a liofilizzazione la madre acida dopo circa due ore dal rinfresco.



**Fig. 3:** Impasto acido prima del rinfresco (A) e macchina del pane Princess mod 152006- 15 programmi, capacità 900 grammi, utilizzata durante la sperimentazione per i rinfreschi e le prove di panificazione (B).

c) Individuazione delle condizioni operative più idonee da adottare nel processo di liofilizzazione: al fine di individuare le condizioni più idonee a produrre la madre acida liofilizzata è stato utilizzato un liofilizzatore Lyobeta Telstar (fig. 4), progettato per le matrici biologiche, farmaceutiche e per i prodotti alimentari e situato presso il Molino Giambastiani (LU). Si tratta di una unità ad alte prestazioni che permette di adottare una ampia gamma di variabili operative e di eseguire l'intero processo di liofilizzazione in modo completamente automatico e con la massima precisione di monitoraggio.



**Fig. 4:** Liofilizzatore Lyobeta Telstar, modello 3PS.

Al fine di ridurre al minimo l'impatto della riduzione della temperatura nel corso della fase di congelamento che precede la liofilizzazione, la madre acida da sottoporre alla liofilizzazione è stata mantenuta a 4 °C.

Sono state effettuate ripetute prove di liofilizzazione modificando di volta in volta, nel corso delle prime fasi della sperimentazione, le principali variabili operative (Tab. 3). Si è così proceduto

all'individuazione delle migliori condizioni operative da adottare nel corso del processo di liofilizzazione della madre acida idonee per ottenere un prodotto adatto alla panificazione. Lo schema operativo corrispondente alla prova n° 11 si è rivelato il migliore ed è stato adottato nel corso delle successive prove di liofilizzazione.

**Tab.3:** Condizioni operative adottate nel corso delle varie prove di liofilizzazione

Ricette <i>n.</i>	Shelves preparation	Freezing		Condenser preparation	Chamber vacuum	Primary drying			Secondary drying	
	<i>minuti</i>	<i>minuti</i>	<i>T °C</i>	<i>minuti</i>	<i>μbar</i>	<i>ore</i>	<i>T °C</i>	<i>μbar</i>	<i>ore</i>	<i>T °C</i>
1	60	90	-40	10	200	24	-20	200	12	20
2	60	120	-20	10	200	24	-20	200	12	20
3	20	90	-40	5	200	27	-30	200	12	20
4	20	90	-40	5	200	27	-30	200	12	30
5	30	120	-20	5	100	12	-20	100	24	30
6	30	720	-20	60	100	12	-20	100	24	30
7	30		--	60	100	12	-20	100	12	30
8	60	120	-40	60	200	48	-40	200	24	30
9	60	120	-40	60	200	48	-40	200	24	30
10	60	120	-40	60	200	48	-40	200	24	30
11	60	120	-40	60	100	48	-40	100	24	30

d) Definizione delle condizioni operative (tempi e temperature di processo) ottimali da adottare nel processo della rivitalizzazione della madre acida liofilizzata: al fine di ottenere una madre acida attiva a partire dal liofilizzato ottenuto, si sono indagate le condizioni da adottare nel corso del processo di rivitalizzazione della madre liofilizzata.

I migliori risultati sono stati ottenuti rivitalizzando con le seguenti condizioni:

- ✓ determinazione del quantitativo di acqua perso per effetto della liofilizzazione;
- ✓ reidratazione del liofilizzato con acqua sterile in proporzione alla quantità di acqua persa durante la liofilizzazione al fine di ripristinare il tenore idrico inizialmente presente nella madre acida sottoposta a liofilizzazione;
- ✓ mantenimento del liofilizzato reidratato a bagnomaria a 28 °C per 30 minuti, al fine di indurre la rivitalizzazione dei microrganismi presenti.

Le caratteristiche del liofilizzato rispetto alla madre fresca dopo reidratazione in accordo al protocollo proposto sono riportate in Tab. 4.

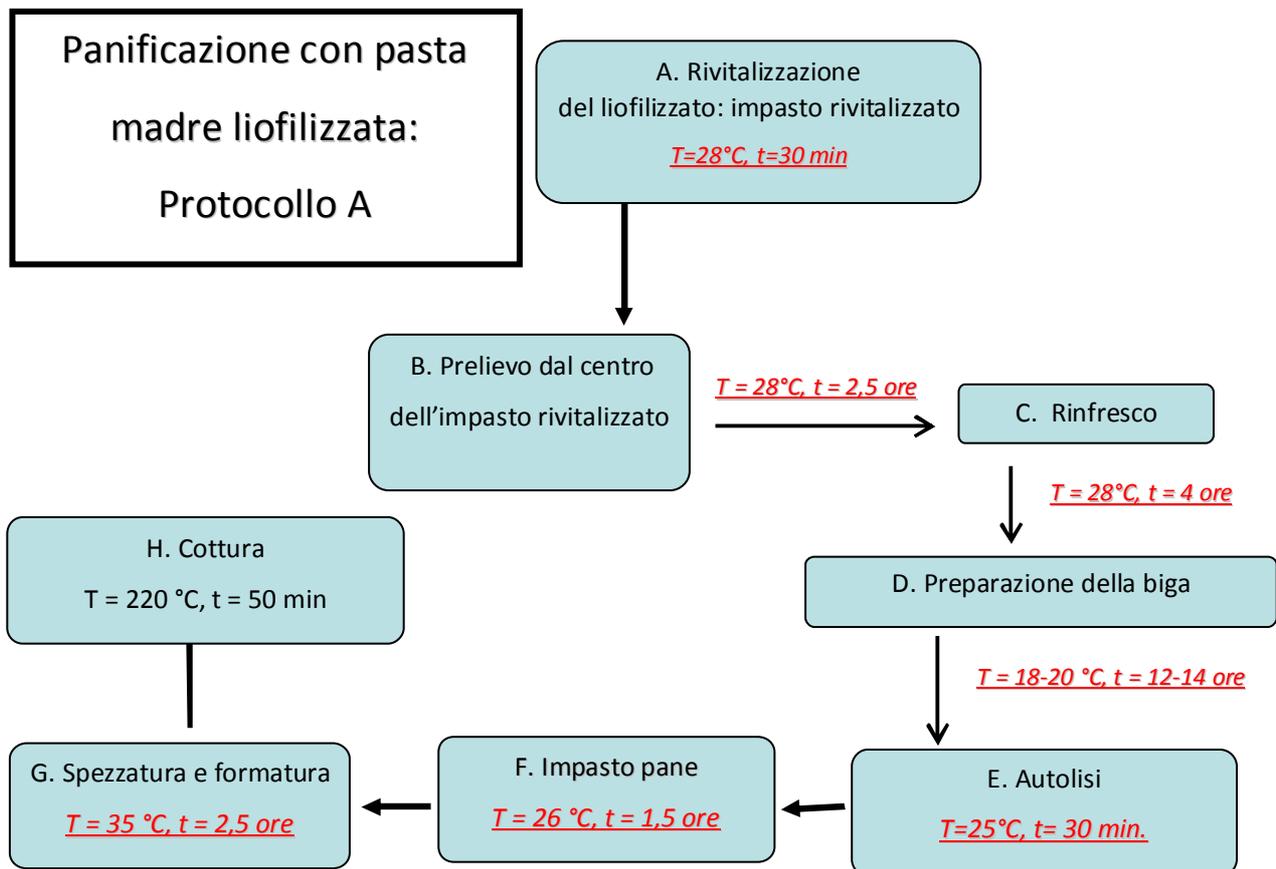
**Tab. 4:** Caratteristiche chimiche della madre acida prima e dopo la liofilizzazione

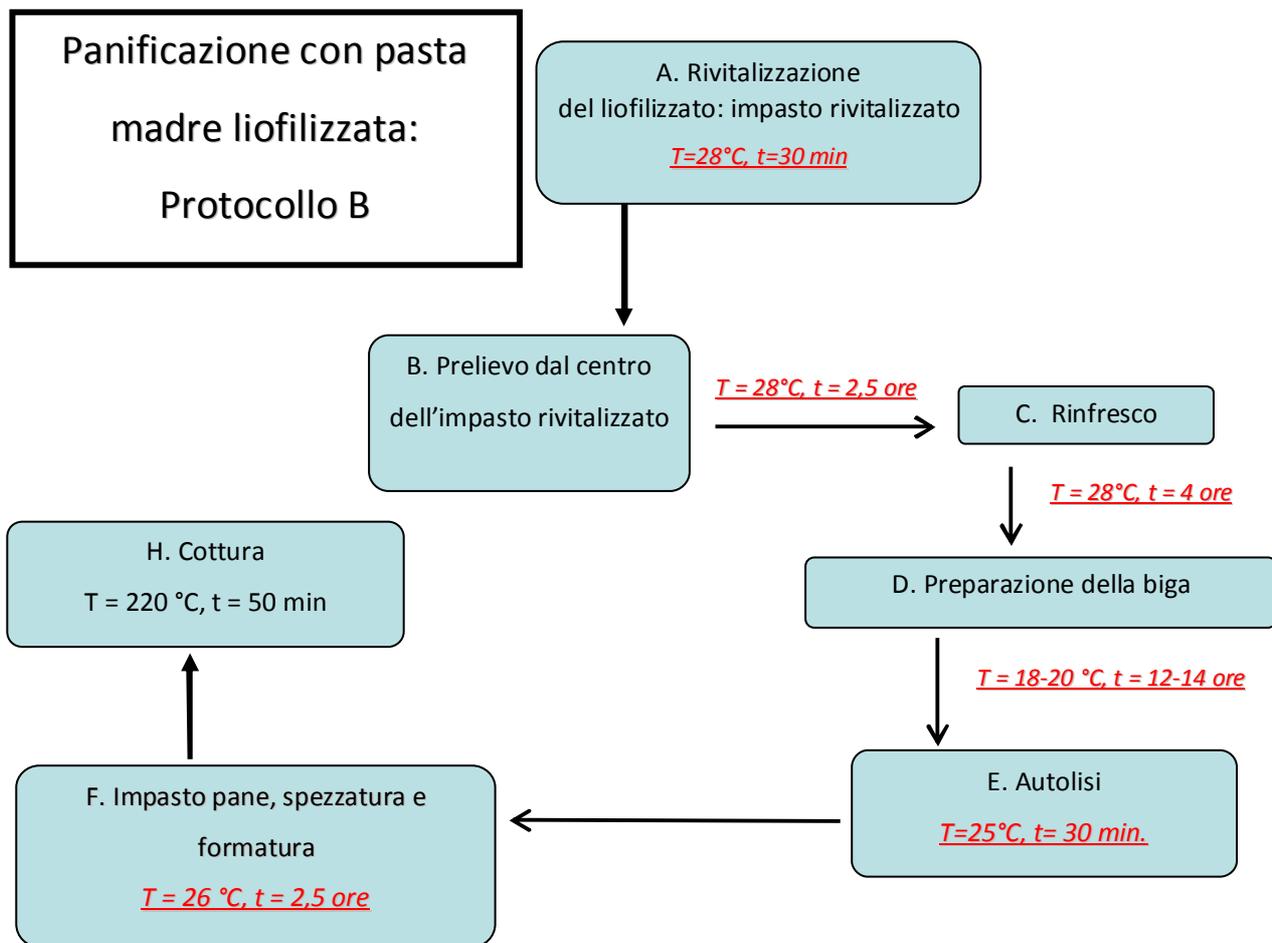
	pH	T (°C)	<u>ac.(D+L) lattico</u> ac acetico	<u>ac.(D+L) Lattico</u> etanolo	<u>ac. (D)-lattico</u> ac (L)-lattico
<b>Madre fresca</b>	4.12±0.07	27.30±0.01	2.02±0.13	0.85±0.05	0.40±0.04
<b>Madre liofilizzata e rivitalizzata</b>	4.39±0.03	27.30±0.01	2.36±0.18	1.27±0.03	0.46±0.01

Al fine di individuare le condizioni operative da adottare per la conservazione nel tempo della madre acida liofilizzata sono state indagate differenti condizioni di conservazione variando il livello di vuoto e/o l'atmosfera gassosa all'interno della confezione (in aria, in argon, sottovuoto).

Sia la conservazione in argon, sia quella sottovuoto hanno dato buoni risultati a 1, 2 e 3 mesi di conservazione, a parità di temperatura di stoccaggio (4 °C), ma i dati sono al momento in corso di elaborazione statistica.

e) Impiego in panificazione della madre acida liofilizzata e rivitalizzata al fine di determinare sia la sua attitudine tecnologica alla panificazione che la qualità chimico composizionale e organolettica del pane prodotto: sulla base del metodo di panificazione previsto dal disciplinare di produzione per il Pane Toscano DOP utilmente modificato per consentire l'impiego della madre acida liofilizzata, sono state eseguite prove di panificazione con l'utilizzo della madre acida liofilizzata e reidratata, che da ora in poi chiameremo "impasto rivitalizzato". In figura 5 vengono riportati due protocolli sperimentali alternativi (protocollo A e protocollo B) impiegati nella fase di messa a punto del metodo. I due protocolli si differenziano nella seconda parte del processo: il protocollo A prevede una sosta (T=26°C per 1,5 ore) tra la fase di impasto e le successive fasi di spezzatura e formatura seguite da un'ulteriore sosta di 2,5 ore a T=35°C; nel protocollo B la spezzatura e la formatura vengono effettuate subito dopo la fase di impasto e sono seguite da una sosta unica a T=26°C per 2,5 ore.





**Fig 5:** Protocolli di panificazione con pasta madre liofilizzata.

Al fine di monitorare il processo di panificazione sono state condotte sia analisi microbiologiche e chimiche sull'impasto prima della cottura, sia analisi chimiche sulla mollica del pane cotto, sia una caratterizzazione sensoriale complessiva del pane prodotto.

Come è possibile notare dagli indici tecnologici riportati in Tab. 5, l'impasto B è caratterizzato da un quoziente di fermentazione e un rapporto tra acido lattico ed etanolo maggiori rispetto all'impasto A .

**Tab. 5:** Caratteristiche chimiche degli impasti ottenuti con i differenti protocolli di panificazione

	pH	T (°C)	<u>ac.(D+L) lattico</u> ac acetico	<u>ac.(D+L) Lattico</u> etanolo	<u>ac. (D)-lattico</u> ac (L)-lattico
<b>Impasto A</b>	5.67±0.02	27.6±0.2	0.76±0.08	0.79±0.08	2.20±0.31
<b>Impasto B</b>	5.46±0.03	28.8±0.1	1.52±0.15	0.31±0.11	1.67±0.27

Anche i risultati ottenuti dalle determinazioni chimiche sulla mollica del pane cotto evidenziano un quoziente di fermentazione e un rapporto tra acido lattico ed etanolo maggiori per il pane B rispetto al pane A (Tab. 6).

**Tab. 6:** Caratteristiche chimiche della mollica ottenuti con i differenti protocolli di panificazione

	pH	T (°C)	<u>ac.(D+L) lattico</u> ac acetico	<u>ac.(D+L) Lattico</u> etanolo	<u>ac. (D)-lattico</u> ac (L)-lattico
<b>Mollica pane A</b>	5.68±0.01	35.0±0.1	1.13±0.17	0.17±0.09	6.33±0.03
<b>Mollica pane B</b>	5.06±0.01	35.2±0.1	1.25±0.21	0.59±0.21	2.33±0.20

La valutazione sensoriale dei due pani è stata svolta da un gruppo di panelist addestrati seguendo un protocollo definito di degustazione che prevede la comparazione separatamente di mollica e crosta dal punto di vista olfattivo, visivo, gustativo e confrontando la struttura al tatto e in bocca, secondo una scala numerica lineare (da 1 a 10). I risultati dell'analisi sensoriale non hanno evidenziato rilevanti differenze per quanto riguarda la crosta, in particolare in relazione alla struttura. Sia il profilo olfattivo sia l'esame visivo di intensità, regolarità e tonalità sono risultati simili, ma con più spiccate caratteristiche di cereale e di fragranza evidenziate nel pane B per quanto riguarda l'olfatto. Relativamente al profilo sensoriale esibito dalla mollica nei pani ottenuti con i due metodi di panificazione le differenze risultano più evidenti, probabilmente a causa del minore impatto sulla caratterizzazione della mollica del procedimento di cottura, che risulta del tutto analogo nei due protocolli proposti. In generale, laddove si evidenziano delle differenze, la mollica del pane B risulta sempre caratterizzata da un profilo sensoriale migliore di quella del pane A.

Il protocollo di panificazione B si dimostra dunque più idoneo per valorizzare le caratteristiche della madre acida liofilizzata. Dal confronto del profilo sensoriale relativo al pane B, ottenuto da madre liofilizzata, con quello del pane ottenuto a partire da madre fresca (fig 7.A), si ottengono dati sostanzialmente sovrapponibili con differenze non particolarmente marcate e generalmente statisticamente non significative. In particolare la gradevolezza complessiva del prodotto (fig 7.B) in entrambi i casi si attesta intorno a valori di sufficienza (6/10) con valori statisticamente analoghi.

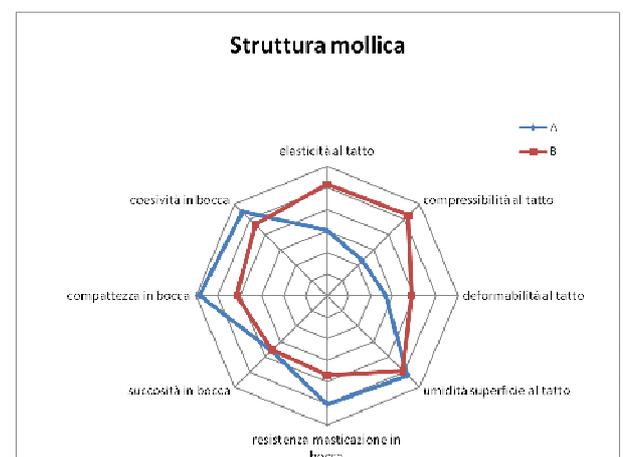
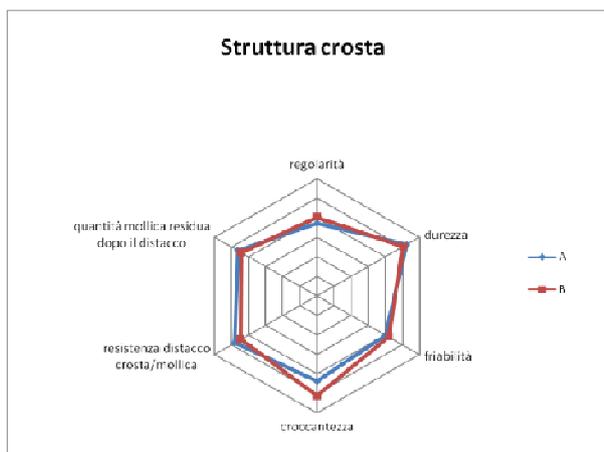
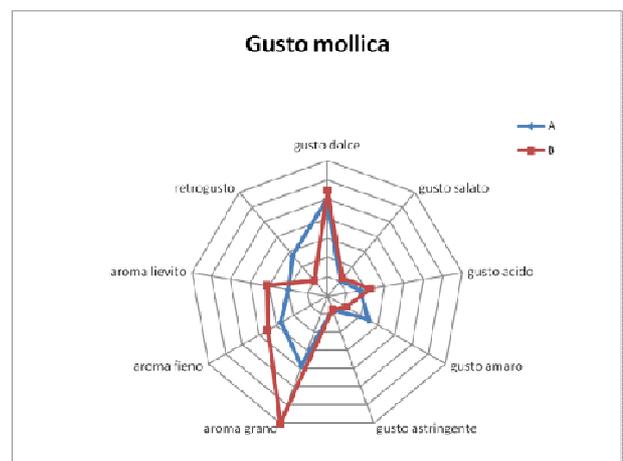
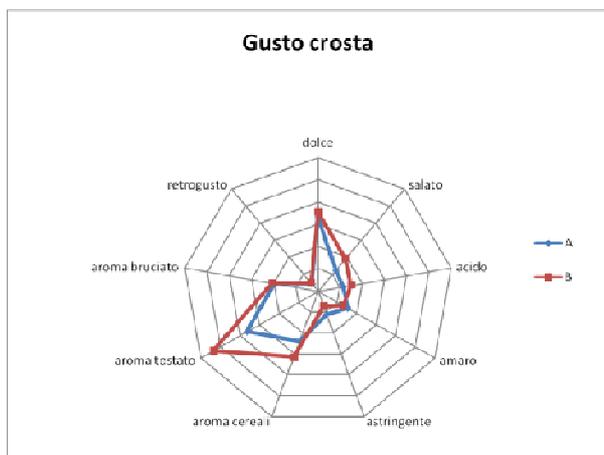
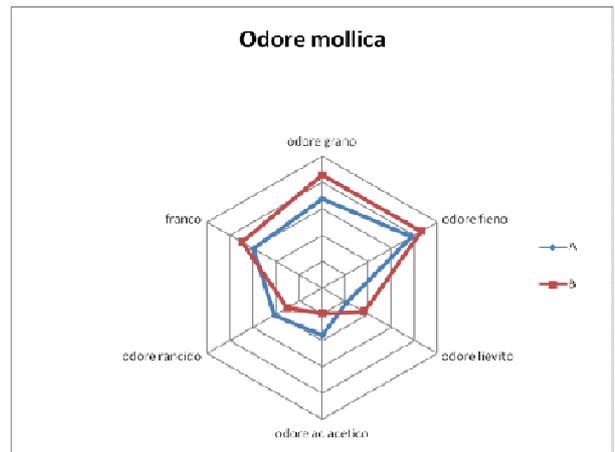
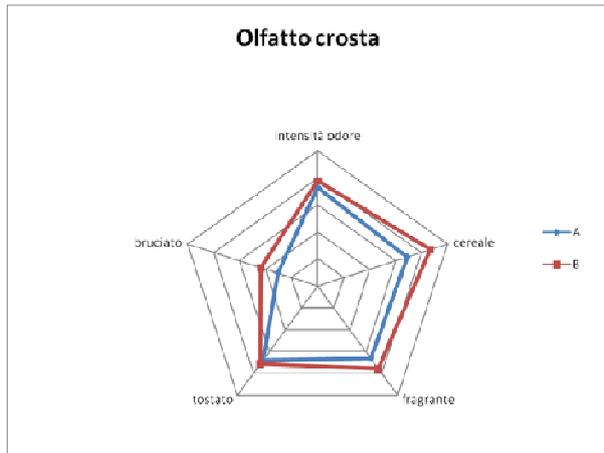
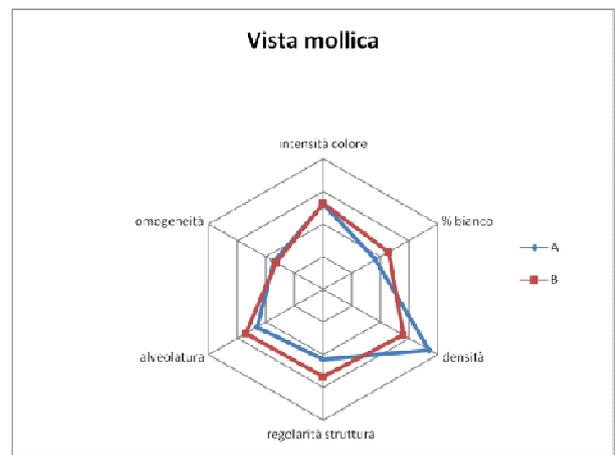
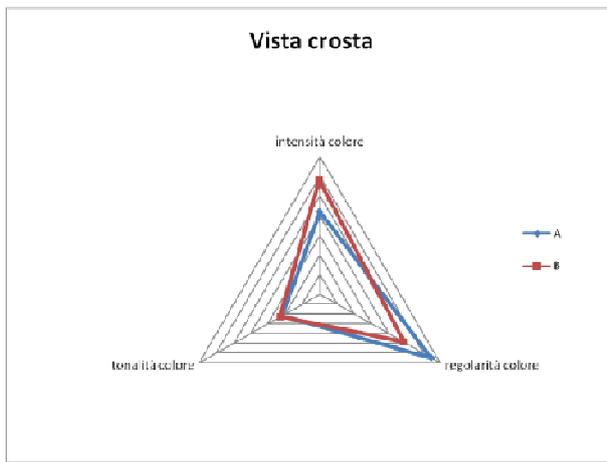
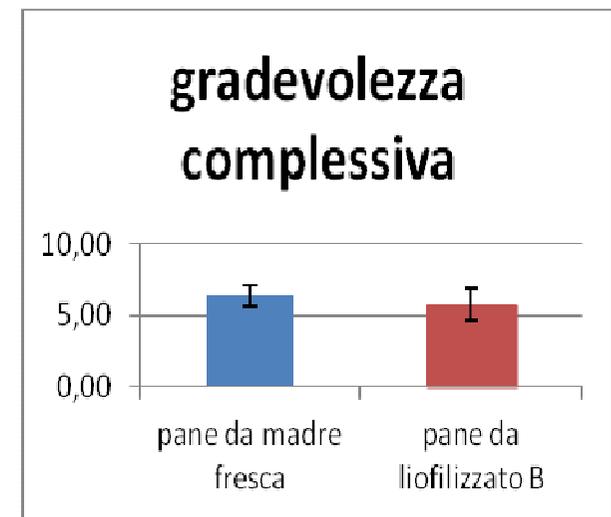
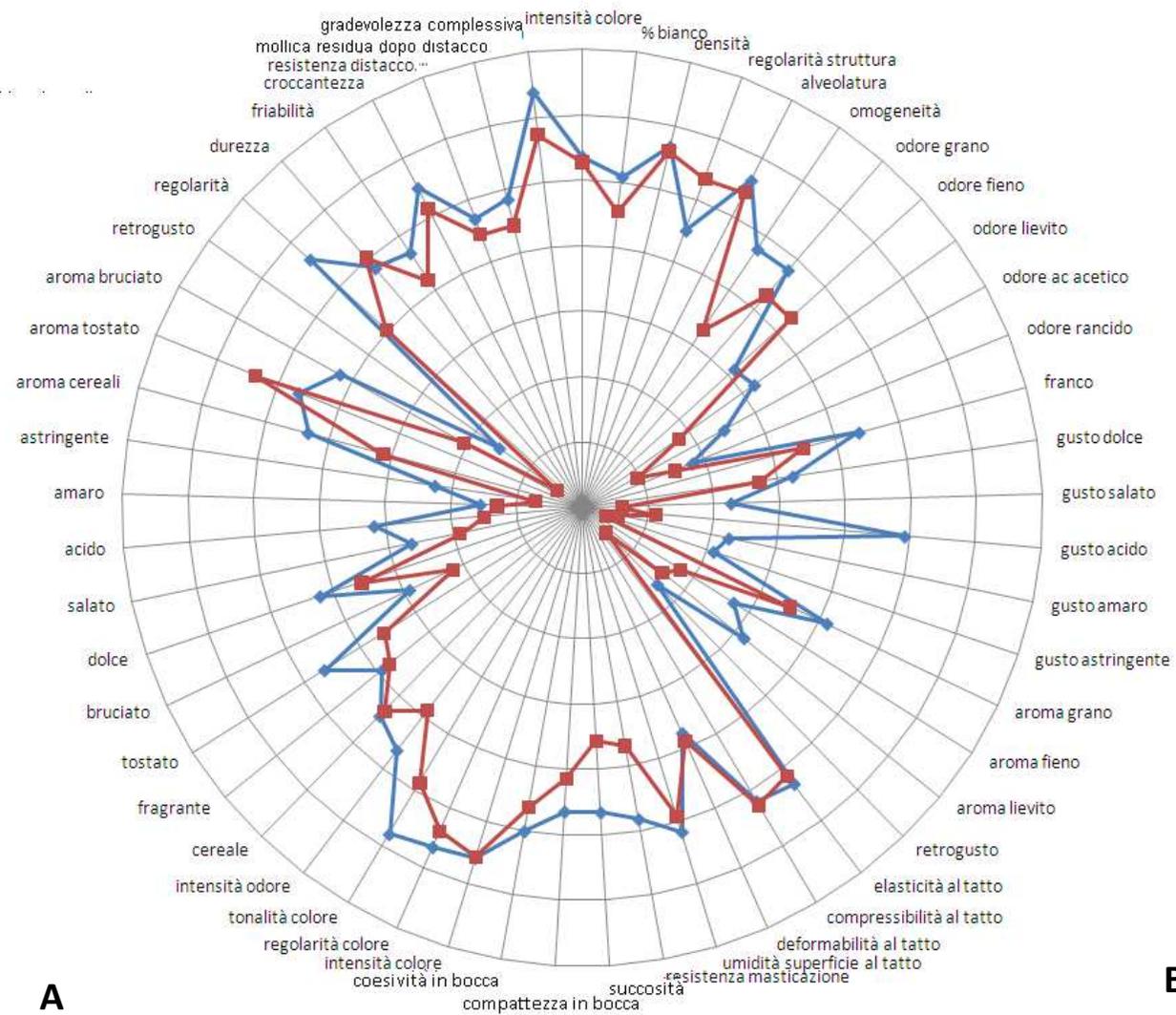


Fig 6: Profilo sensoriale del pane prodotto con i due metodi di panificazione proposti (pane A, pane B).



**Fig.7** : A. Profilo sensoriale completo del pane ottenuto da **madre fresca** e da **madre liofilizzata** (protocollo B); B: Dettaglio gradevolezza complessiva

6.2 Monitoraggio delle possibili alterazioni indotte dal processo di liofilizzazione sugli equilibri che intercorrono tra le popolazioni microbiche presenti nella madre acida (DiSAAA-a -UNIFI Pisa/micro)

Allo scopo di valutare l'impatto del processo di liofilizzazione dell'impasto acido adottato dal "Consorzio Pane Toscano a Lievitazione Naturale" (DOP) sulla diversità delle popolazioni microbiche che lo caratterizzano è stata utilizzata la tecnica PCR-DGGE. In particolare, sono stati analizzati i campioni forniti dal laboratorio tecnologico del DISAAA-a riportati in tabella 7.

Tab. 7: Campioni analizzati provenienti dal laboratorio tecnologico del DISAAA-a

<b>LO</b>	Impasto acido liofilizzato
<b>RO</b>	Liofilizzato rivitalizzato con acqua
<b>MO</b>	Madre acida ottenuta dal liofilizzato
<b>IO</b>	Impasto acido ottenuto dal liofilizzato

Per quanto riguarda la popolazione batterica, i profili DGGE ottenuti dalla separazione elettroforetica su gel denaturante di poliacrilammide degli amplificati della regione V3-V4 del 16S rDNA dei diversi campioni sono stati confrontati con quelli ottenuti dall'impasto acido del CPT (fig. 8).

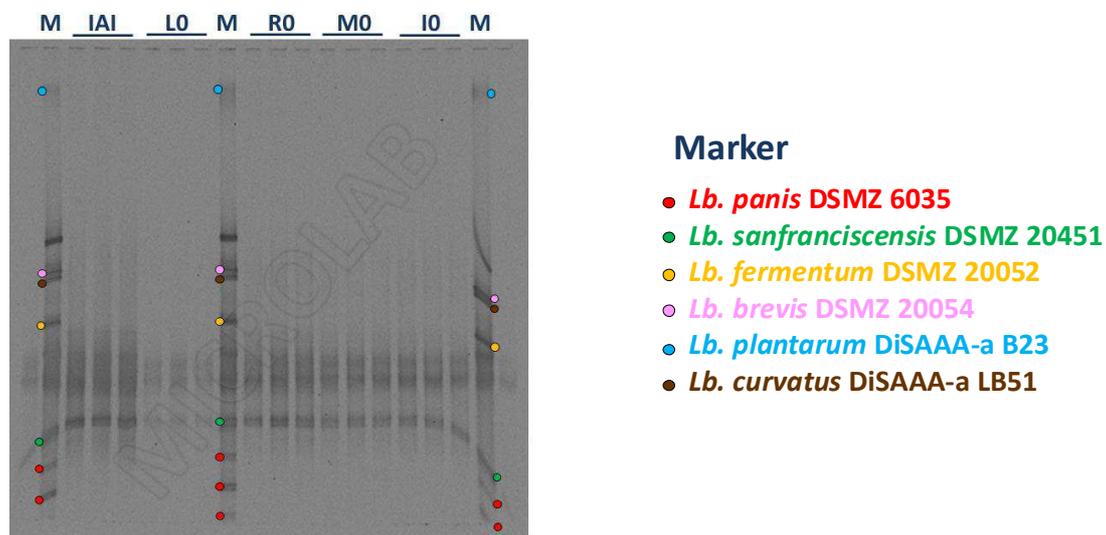
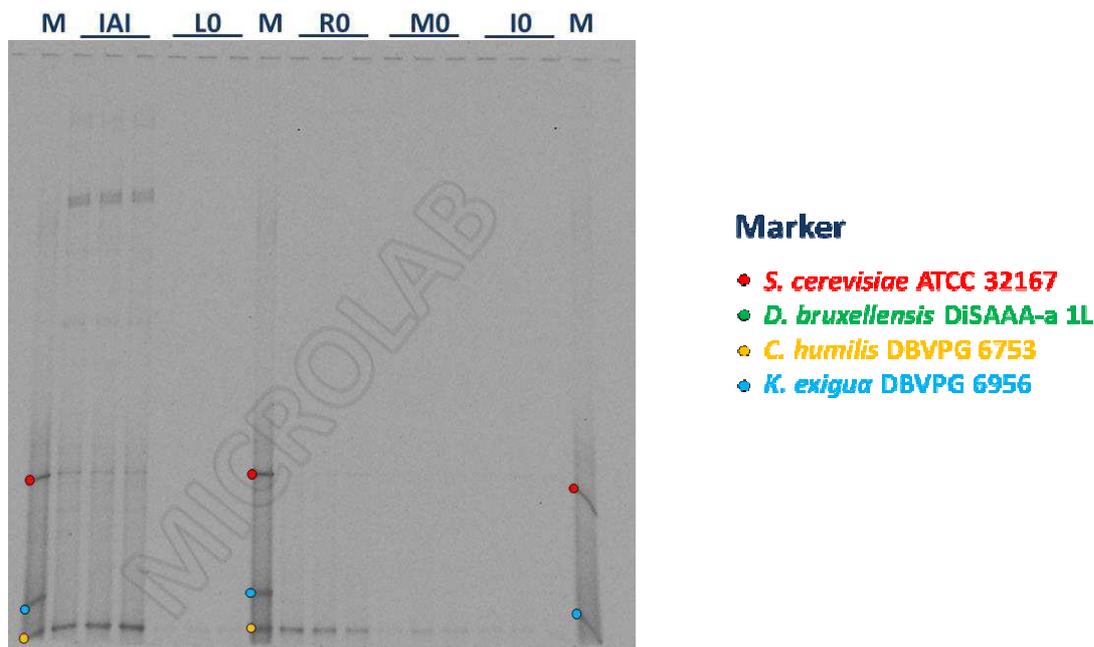


Fig. 8: Profilo DGGE dei prodotti PCR della regione V<sub>3</sub>-V<sub>4</sub> del 16S rDNA dei campioni analizzati. M: marker; IAI: impasto acido del Laboratorio tecnologico; LO: Impasto acido liofilizzato; RO: Liofilizzato rivitalizzato con acqua; MO: Madre acida ottenuta dal liofilizzato; IO: Impasto acido ottenuto dal liofilizzato.

Dai risultati ottenuti è possibile evidenziare la presenza di un frammento ascrivibile a *Lb. sanfranciscensis* in tutti i campioni analizzati, anche se il frammento ottenuto dal campione liofilizzato (LO) risulta di minore intensità.

Per quanto riguarda la popolazione fungina, i profili DGGE ottenuti dalla separazione elettroforetica su gel denaturante di poliacrilammide degli amplificati della regione D1-D2 del 26S rDNA dei diversi campioni sono stati confrontati con quelli ottenuti dall'impasto acido del CPT (fig. 9)



**Fig. 9:** Profilo DGGE dei prodotti PCR della regione D1-D2 del 26S rDNA dei campioni analizzati. M: marker; IAI: impasto acido del Laboratorio tecnologico; LO: Impasto acido liofilizzato; RO: Liofilizzato rivitalizzato con acqua; MO: Madre acida ottenuta dal liofilizzato; IO: Impasto acido ottenuto dal liofilizzato.

Dai risultati ottenuti è possibile evidenziare la presenza dei due frammenti ascrivibili a *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida humilis* solo nel campione relativo all'impasto acido del Laboratorio tecnologico.

L'utilizzo della tecnica PCR-DGGE ha permesso di evidenziare che il processo di liofilizzazione ha un maggior impatto sulla popolazione fungina rispetto a quella batterica.

## **7) Valutazione delle caratteristiche microbiologiche e chimico-composizionale degli impasti e delle caratteristiche organolettiche del pane da questi prodotto, al variare della tecnica agronomica di coltivazione della farina adottata**

### *7.1 Valutazione delle caratteristiche chimico-composizionale degli impasti e delle caratteristiche organolettiche del pane da questi prodotto, al variare della tecnica agronomica di coltivazione della farina utilizzata (DiSAAA-a – UNIPI Pisa/tecalim)*

A causa di problematiche agronomiche derivanti dalla stagione metereologica del tutto anomala che ha caratterizzato l'annata 2014, le farine prodotte sono risultate inadatte alla panificazione. Le ripetute prove di panificazione, che sono state comunque condotte a livello sperimentale applicando il protocollo previsto dal CPT, hanno prodotto pani del tutto inaccettabili da un punto di vista sia organolettico che chimico-composizionale.

### *7.2 Valutazione delle caratteristiche microbiologiche degli impasti al variare della tecnica agronomica di coltivazione della farina utilizzata (DiSAAA-a – UNIPI Pisa/micro)*

Allo scopo di valutare le eventuali variazioni delle popolazioni microbiche caratterizzanti l'impasto acido adottato dal "Consorzio Pane Toscano a Lievitazione Naturale" (DOP) indotte dalle tecniche agronomiche di coltivazione del grano per la produzione della farina, è stata utilizzata la tecnica PCR-DGGE. Tali analisi, effettuate sulle farine forniteci, non hanno evidenziato alcun cambiamento nei profili delle popolazioni microbiche.

## **8) Costituzione di un archivio dei dati chimico-analitici e sensoriali e di una banca del germoplasma**

### *8.1 Costituzione di un archivio dei dati chimico-analitici e sensoriali del "Pane Toscano a lievitazione naturale" (DOP) (DiSAAA-a – UNIPI Pisa/tecalim).*

I dati relativi alla caratterizzazione chimico fisica degli impasti e dei pani da essi prodotti nei diversi forni individuati sono raccolti in un database presso il DiSAAA-a dell'Università di Pisa che costituirà l'archivio chimico analitico di riferimento per la produzione del "Pane Toscano a lievitazione naturale" (DOP).

Per quanto riguarda la madre acida i valori assunto dal pH e dalle concentrazioni nei principali metaboliti prodotti dai lieviti (alcol etilico), dai batteri lattici (acido lattico nelle sue due forme

isomere L- e D-lattico) e dai batteri acetici (acido acetico) sono stati determinati subito dopo il completamento delle operazioni di rinfresco.

I valori analitici ottenuti consentono di calcolare degli indici tecnologici (Tab. 4) che danno una misura di come si siano evolute le principali fermentazioni all'interno dell'impasto considerato.

Il rapporto tra la quantità di acido lattico prodotto rispetto all'etanolo accumulato all'interno della madre, generalmente inferiore all'unità, permette di evidenziare di quanto si sia evoluta la fermentazione lattica rispetto a quella alcolica. Il rapporto tra acido lattico e acetico si mantiene invece intorno a due.

### 8.2 Costituzione di una banca del germoplasma dei microrganismi della madre acida del "Pane Toscano a lievitazione naturale" (DOP) (DiSAAA-a – UNIFI Pisa/micro)

L'isolamento in coltura pura dei batteri lattici e lieviti della madre acida (proveniente dal panificio Giuntini) ha permesso di ottenere 516 isolati microbici (386 batteri lattici e 130 lieviti) che sono stati sottoposti a crioconservazione. In particolare, per ciascun isolato, un'aliquota di coltura cellulare liquida è stata posta in tubi per criogenia aggiungendo glicerolo alla concentrazione finale del 20 % v/v e congelata a -80°C in due diversi ultrafreezer.

Ogni ceppo è stato siglato con l'acronimo del terreno utilizzato seguito da un numero progressivo e inserito nella collezione del DiSAAA-a, Laboratori di Microbiologia, a costituire una banca del germoplasma dei ceppi di batteri e lieviti caratterizzanti la madre acida del "Consorzio Pane Toscano a Lievitazione Naturale" (CPT) (Tab. 8).

**Tab. 8:** Banca del germoplasma dei ceppi di batteri e lieviti caratterizzanti l'impasto acido del "Consorzio Pane Toscano a Lievitazione Naturale" (CPT)

Mezzo	Isolati IA	Isolati IAL
WL	1-51; 103-120	52-102; 121-130
MRSm	1-3; 5-49; 51-53; 55-99	100-142; 144; 146-184; 186-198
SDB	1-36; 38-44; 46-65; 67-99	100; 101; 103-198

## **9) Divulgazione/Trasferimento delle conoscenze**

*9.1 Divulgazione/Trasferimento delle conoscenze disponibili in letteratura ed acquisite nel corso delle attività previste dalla misura 124, condotte dal Capofila in collaborazione con i Dipartimenti universitari (DISPAA/UNIFI e DiSAAA-α/UNIPI) coinvolti nel progetto. (Molino F.Ili Giambastiani)*

Il Molino F.Ili Giambastiani si è avvalso della collaborazione di consulenti esterni, i sigg. Roberto e Daniele Pardini, per lo svolgimento di attività relative alla promozione del progetto, alla divulgazione dei risultati dei processi innovativi messi a punto per la produzione di farina e pane di qualità (DOP) e al trasferimento delle conoscenze acquisite nel corso di svolgimento delle attività del progetto. Queste azioni sono state indirizzate sia al personale che opera all'interno delle aziende cerealicole e ai panificatori inseriti all'interno della filiera produttiva del "Pane Toscano a lievitazione naturale (DOP)" che, soprattutto, ai consumatori finali, ai produttori di grano tenero ed ai panificatori toscani.

Il sig. Roberto Pardini, Direttore del Consorzio di Promozione e Tutela del Pane Toscano a lievitazione naturale (C.P.T.), per la lunga esperienza nel settore agro-alimentare, nello specifico nel settore della panificazione, è parso fin da subito il profilo ideale per svolgere le attività previste, grazie alla profonda conoscenza del Disciplinare proposto per il riconoscimento della protezione comunitaria di origine (DOP) del Pane Toscano a lievitazione naturale, detenuto, dal C.P.T., e alla numerosa rete di contatti costruita nel corso della sua esperienza istituzionale.

In particolare, l'intervento del sig. Roberto Pardini, coadiuvato dal sig. Daniele Pardini, si è incentrato nell'organizzazione e partecipazione ad eventi ed incontri a carattere divulgativo-formativo, sia all'interno di eventi e manifestazioni fieristiche a carattere regionale, sia presso gli operatori della filiera ed i panifici aderenti al "Consorzio di promozione e tutela del pane Toscano a lievitazione naturale" (C.P.T.).

Elenco eventi in cui è stato presentato il PIF ed il progetto sulla misura 124 "Innova pane DOP":

<b>Data</b>	<b>Evento</b>	<b>Luogo</b>
8/06/2013	<b>Festival del pane</b>	Prato
13/08/2013	<b>34° Festival La Versiliana</b>	Pietrasanta (LU)
12-15/09/2013	<b>Expo Rurale 2013</b>	Firenze
7-8/12/2013	<b>5° Mostra mercato "C'è olio e olio"</b>	Livorno
10/05/2014	<b>Festa del Pane</b>	Altopascio (LU)
13/06/2014	<b>Premio per l'innovazione</b>	Salerno
08/07/2014	<b>Festa del grano 2014</b>	Sesto Fiorentino (FI)
21/07/2014	<b>Versiliana Gualtierio Marchesi La cucina di ieri di oggi domani</b>	Pietrasanta (LU)
19/09/2014	<b>Expo Rurale 2014</b>	Firenze
02/11/2014	<b>Terre Fiorenti</b>	Firenze

Il sig. Daniele Pardini ha svolto inoltre attività di supporto al trasferimento delle conoscenze in merito al sistema informativo di tracciabilità e rintracciabilità di filiera sviluppato nell'ambito del progetto, finalizzato a raccogliere e gestire in modo centralizzato i dati relativi alle materie prime in entrata e ai prodotti in uscita presso ogni singolo operatore coinvolto nella filiera (vedi attività 10.1). In particolare, sono stati organizzati degli incontri in-formativi presso alcuni operatori della filiera allo scopo di illustrare il funzionamento del sistema di tracciabilità sviluppato dalla società Zucchetti Centro Sistemi, effettuando anche delle simulazioni di casi pratici.

Azioni di divulgazione sono state condotte inoltre anche dai partner scientifici del progetto in occasione di eventi accademici (si segnala il contributo della dott.ssa Francesca Venturi del DiSAAA-a/UNIPI al "2<sup>nd</sup> International Conference on Bioprocess and Engineering", Valencia 26-27 giugno 2014; e la presenza all' Open Day della Ricerca, Pisa, 10 - 11 aprile 2014).

E' inoltre presente sul sito web del capofila Molino F.lli Giambastiani [www.molinogiambastiani.it](http://www.molinogiambastiani.it) una sezione dedicata al progetto INNOVA PANE (DOP). Collegamenti alla sezione verranno attivati sui siti istituzionali dei partner scientifici <http://www.agr.unipi.it/dipartimento.html>, <http://www.dispaa.unifi.it/>, che di soggetti istituzionali coinvolti indirettamente nel progetto [www.capsi.it](http://www.capsi.it), [www.panetoscano.net](http://www.panetoscano.net).

Si prevede infine di organizzare un convegno per la divulgazione dei risultati ottenuti rivolto sia alla comunità scientifica, che ai partecipanti della filiera del Pane Toscano a lievitazione naturale e agli operatori del settore agricolo.

## **10) Progettazione e sviluppo di un sistema di tracciabilità e rintracciabilità di filiera**

*10.1 Progettazione e sviluppo di un sistema informativo a supporto delle aziende coinvolte nel progetto, che permetta di raccogliere e di gestire in modo centralizzato i dati relativi alle materie prime in entrata e ai prodotti in uscita presso ogni singolo operatore coinvolto nella filiera di produzione del “Pane toscano a lievitazione naturale” (DOP). (Molino F.Ili Giambastiani)*

Il Molino F.Ili Giambastiani si è avvalso della collaborazione di qualificati consulenti informatici della società Zucchetti Centro Sistemi S.p.A per la progettazione e lo sviluppo di un sistema informativo a supporto delle aziende coinvolte nella filiera di produzione del “Pane toscano a lievitazione naturale (DOP), in grado di raccogliere e gestire in maniera centralizzata i dati relativi alle materie prime in entrata e ai prodotti in uscita presso ogni singolo operatore della filiera.

La società Zucchetti Centro Sistemi ha sviluppato una soluzione web innovativa altamente personalizzata, nata sulle esigenze specifiche della filiera, grazie alla quale è possibile mappare in modo semplice e sicuro tutte le fasi relative ad un determinato lotto di Pane Toscano DOP. A partire dai sementi, viene creato un lotto prodotto con creazione automatica del codice articolo.

Tutti gli attori coinvolti nella filiera (produttori agricoli, aziende di stoccaggio del grano, aziende molitura e panificatori) accedono ad un portale web (Cassiopea) <http://62.108.239.158/cassiopea/> nel quale registrano le operazioni relative ad un determinato lotto (carico o scarico magazzino, trasformazione materia prima in prodotto/semilavorato, variazione giacenza ecc).

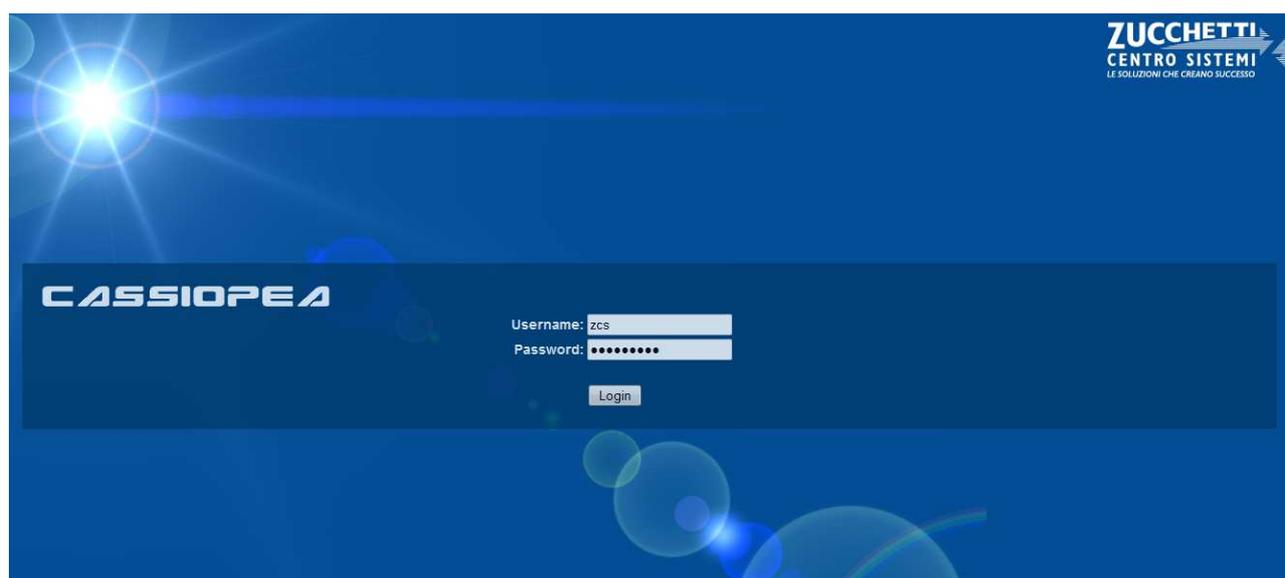


Figura: Maschera di login accesso sistema di tracciabilità di filiera

E' stato installato un server virtuale e diviso l'ambiente configurando 4 desktop personalizzati in modo da far aderire il tutto ai quattro profili coinvolti nel processo di filiera del Pane toscano DOP:

- Aziende agricole aderenti al PIF
- Aziende di stoccaggio
- Aziende di molitura
- Aziende di panificazione

In base alla profilazione definita, una volta effettuato l'accesso ogni tipologia di azienda visualizzerà le funzioni di propria competenza.

#### AZIENDE AGRICOLE PIF

L'attività che riguarda ogni azienda agricola facente parte della filiera coinvolta nella coltivazione del grano è fondamentalmente in capo al Consorzio Agrario di Siena. Lo stesso Consorzio si occuperà, all'inizio manualmente, e poi tramite apposita interfaccia tra il loro software gestionale, di implementare i dati carico e scarico dal momento nel quale l'azienda agricola acquista i mezzi tecnici, solo ed esclusivamente dal Consorzio Agrario di Siena, fino al momento in cui il grano esce dal deposito di stoccaggio direzione azienda molitura.

In base alla documentazione di legge le aziende sono dovute a:

- Dichiarare le particelle di terreno adibite alla produzione di grano destinato al Consorzio;
- Acquistare tutti i mezzi tecnici solo e soltanto presso il Consorzio agrario di Siena che ne garantisce la qualità.;
- Essere supervisionati da tecnici specializzati inviati dal consorzio di Siena per il controllo dalla semina fino al raccolto:
- A loro volta i tecnici annotano tutte le operazioni effettuate nel periodo (per data e ora) dalla semina al raccolto;
- Annotare tutte le operazioni nel quaderno di campagna.

Per quanto concerne la documentazione a loro disposizione, le aziende agricole aderenti al PIF ricevono fattura dei sementi e degli altri mezzi tecnici dal Consorzio Agrario di Siena con specifica di articoli e lotti acquistati. Producono un Ddt manuale con le quantità di grano prodotte al momento della consegna al Centro di stoccaggio senza nessuna indicazione di lotto. La consegna avviene franco centro di stoccaggio.

## CONSORZIO AGRARIO DI SIENA

Il consorzio provvede, una volta ricevuto il Ddt dalle aziende PIF, a caricare il quantitativo ricevuto facendo un "pre-carico" e assegnando un lotto fornitore "provvisorio" fino al momento del controllo e del carico definitivo in una delle seguenti agenzie del Consorzio Agrario di Siena:

- 1) Agenzia di Steccaia
- 2) Filiale di Belvedere
- 3) Agenzia di Monteroni
- 4) Agenzia di Gallina
- 5) Polo Sinalunga
- 6) Agenzia di Camucia

Al momento del carico definitivo viene imputato tutto il quantitativo ad un articolo ben definito: codice 40066 GRANO TENERO DA FILIERA.

Il codice lotto sarà composto da 3 char per il codice agenzia e 4 char per il codice campagna

*Esempi: Se l'agenzia fosse 041 e la campagna fosse 2013 il codice del lotto definitivo del grano sarebbe 0412013 caricato sul codice prodotto 40066*

*Questo lotto 041400662013 fa riferimento ad N lotti fornitori (collegabili ciascuno all'azienda PIF di produzione) in modo che tutto sia tracciabile.*

Da prevedere che si faccia un passaggio da una agenzia ad un'altra. A quel punto viene riassegnato un nuovo codice lotto.

*Se ad esempio la sede di partenza fosse la 041 e quella di destinazione fosse la 049 occorrerebbe scaricare il lotto 041400662013 e caricare il 049400662013.*

Successivamente, quando il grano è in partenza destinazione molitura, il Consorzio emette un Ddt di consegna per quantità e lotto al Molino Giambastiani.

## MOLINO F. LLI GIAMBASTIANI

Le tipologie di grano in arrivo dal centro di stoccaggio sono fondamentalmente tre:

- Grano di forza

- Grano bianco
- Grano rosso

Al momento del carico del grano, oltre ad un cambio codice deve essere previsto la generazione del lotto lungo dieci caratteri e contenente:

2 char codice identificativo interno del Consorzio di promozione e tutela del Pane Toscano a lievitazione naturale (CPT) riferito al centro di stoccaggio (03 consorzio di Siena)

2 char codice identificativo interno del CPT riferito all'azienda di molitura (01 Molino Giambastiani)

6 char data di riferimento del carico (esempio 20092013)

Quindi il lotto caricato oggi sarà 0301240913 associato ad una o più delle tre tipologie di grano definite in anagrafica.

Al momento dell'utilizzo di tale grano per la produzione verrà assegnato un lotto uguale alla data di produzione.

Fatto il carico della produzione al momento della consegna della farina ai panificatori verrà scaricata la giacenza della farina tramite un ddt di consegna ai panificatori.

La consegna può avvenire in sacchi o alla rinfusa con la possibilità, ad ogni passaggio, di utilizzare indifferentemente kg o tonnellate per la movimentazione.

#### AZIENDE DI PANIFICAZIONE

Oltre alla consultazione degli archivi di sistema (soggetti coinvolti, anagrafiche prodotti ecc.) le aziende di panificazione dovranno fundamentalmente effettuare i seguenti passaggi chiave obbligatori:

1) Registrare il carico in ingresso della farina proveniente dall'azienda di molitura

Accedendo all'apposita funzione di ingresso della farina ogni singola azienda di panificazione si troverà una lista dei ddt di trasferimento che l'azienda di molitura ha inserito a sistema con destinazione la stessa azienda di panificazione.

Una volta selezionato o selezionati i ddt , l'azienda dovrà confermare soltanto lotto e scadenza della partita caricata ingressando sul proprio deposito il quantitativo caricato.

2) Registrare il carico delle ulteriori materie prime utili per la tracciabilità (buste, bollini ecc.)

- 3) Registrare il carico di produzione giornaliero (differenziato per tipologia pane da 0,5 1 o 2 kg) provvedendo a scaricare i lotti di farina utilizzati, bollini, buste e quant'altro definito necessario per la tracciabilità

Il sistema sviluppato permette così di tracciare tutti gli eventi ed i movimenti relativi ad un lotto. L'installazione in cloud ha permesso di centralizzare tutte le informazioni derivanti dai vari livelli della filiera, informazioni che fino ad ora risultavano totalmente destrutturate e distribuite sui sistemi privati di ogni singolo attore.

Il Consorzio di promozione e tutela del Pane Toscano a lievitazione naturale (C.P.T.) attraverso l'ERP Teseo 7 raccoglie tutti i dati a livello centralizzato e li elabora al fine di garantire il marchio DOP; tale etichetta contiene un codice utile per tracciare tutta la filiera produttiva relativa ad un determinato lotto: dalla materia prima, alla molitura, alla produzione del pane.

Il progetto di sistema di tracciabilità di filiera sviluppato in collaborazione con la società Zucchetti Centro Sistemi è stato selezionato per la partecipazione all'VIII edizione del premio Best Practices per l'Innovazione, che si è tenuto a Salerno il 12 e il 13 giugno 2014. Ciò conferma l'innovatività della soluzione sviluppata, che potrà rappresentare un modello di riferimento anche per le altre filiere agroalimentari.

#### *10.2 Individuazione di eventuali identificatori chimico composizionali (markers) in grado di contraddistinguere in modo inequivocabile il prodotto finito (DiSAAA-a -UNIPI Pisa/tecalim).*

Le principali trasformazioni chimiche che decorrono all'interno dell'impasto nel corso della lievitazione sono la fermentazione alcolica e quella lattica, due processi metabolici condotti da popolazioni microbiche che si diversificano sostanzialmente per tipologia e densità.

La distribuzione percentuale con cui le diverse popolazioni microbiche compaiono all'interno dell'impasto e quindi il corrispondente accumulo dei metaboliti da queste prodotti (alcol etilico, acido D/L,  $\alpha$ -lattico, acido acetico), dipendono da molteplici fattori:

- ✓ le caratteristiche chimico-composizionali ed enzimatiche delle farine impiegate in panificazione.
- ✓ la tecnica di lavorazione adottata (modalità di conduzione e numero dei rinfreschi effettuati).

- ✓ le condizioni operative utilizzate (temperature, tenore idrico, efficacia nel promuovere un'efficiente omogeneizzazione dell'impasto, la conseguente diffusione dell'ossigeno dell'aria all'interno della massa, ecc.).

L'analisi dei risultati analitici connessi alla caratterizzazione chimico-composizionale dei campioni di pane valutati nel corso del progetto, ha consentito di attribuire ai rapporti tra concentrazioni di metaboliti prodotti nei processi fermentativi, la funzione di identificatori o markers caratteristici del "Pane toscano a lievitazione naturale".

Infatti, questi ultimi possono fornire utili indicazioni sia sul decorso dei processi fermentativi durante il processo, sia sulle caratteristiche organolettiche (aromatiche e gustative) del pane.

I principali rapporti individuati, sulla base dei quali è possibile asserire, con un elevato grado di affidabilità, se il campione analizzato appartenga o meno a questa tipologia di prodotto, sono:

- ✓ Il rapporto tra la concentrazione molare dell'acido lattico e quella dell'acido acetico riscontrate in un impasto, definito quoziente di fermentazione o indice di vigoria, è considerato un parametro dell'andamento fermentativo. Tale rapporto assume valori diversi in funzione di alcune variabili, quali durata della fermentazione, temperatura, specie di batteri lattici predominanti, condizioni di ossigenazione ecc.
- ✓ Il rapporto tra la concentrazione molare dell'acido lattico e quella dell'alcool etilico, che indica l'evoluzione delle popolazioni batteriche e blastomicetiche, importante per le caratteristiche qualitative della matrice alimentare.
- ✓ Il rapporto tra le due forme stereoisomere (D/L) dell'acido lattico, infatti i due differenti isomeri del lattato prodotti dai batteri lattici vengono assimilati dall'organismo umano in maniera diversa, in particolare il D-lattato viene metabolizzato molto più lentamente. Madre acida e pane a pasta acida contengono acido D-lattico in quantità variabili in funzione della loro componente microbica, relativamente alla presenza di differenti ceppi di batteri lattici (ad esempio *Lactobacillus plantarum*, un batterio lattico comunemente presente nell'impasto acido, produce una quantità di acido D-lattico decisamente superiore ad altre popolazioni batteriche).

Con riferimento alla tabella 10.2 dell'Allegato F del bando, di seguito viene riportato il riepilogo delle spese sostenute da ogni singolo partner ripartito per fasi/azioni:

**Partner: MOLINO F.LLI GIAMBASTIANI S.R.L. (Capofila)**

<b>FASI PROGETTUALI/AZIONI</b>					
<b>VOCI DI COSTO</b>	<b>F1.1</b>	<b>F1.2</b>	<b>F9.1</b>	<b>F10.1</b>	<b>TOTALE</b>
Personale non dipendente			€ 28.443,87		€ 28.443,87
Missioni e trasferte					
Spese generali	€ 435,73	€ 262,83	€ 262,82	€ 262,82	€ 1.224,20
Investimenti immateriali	€ 5.000,00	€ 40.000,00	€ 2.000,00	€ 35.000,00	€ 82.000,00
Beni di consumo (acquisti e/o noleggi)					
Lavori edili e strutturali (quota di ammortamento)					
Lavori edili e strutturali (da imputare in toto)					
Macchinari e attrezzature (quota di ammortamento)					
Macchinari e attrezzature (da imputare in toto)					
Software/hardware					
<b>Totale</b>	<b>€ 5.435,73</b>	<b>€ 40.262,83</b>	<b>€ 30.706,69</b>	<b>€ 35.262,82</b>	<b>€ 111.668,07</b>

**Partner: Società Agricola F.lli Bimbi s.s.**

<b>FASI PROGETTUALI/AZIONI</b>		
<b>VOCI DI COSTO</b>	<b>F2.3</b>	<b>TOTALE</b>
Personale non dipendente		
Missioni e trasferte		
Spese generali		
Investimenti immateriali	€ 1.770,00	€ 1.770,00
Beni di consumo (acquisti e/o noleggi)	€ 19.234,90	€ 19.234,90
Lavori edili e strutturali (quota di ammortamento)		
Lavori edili e strutturali (da imputare in toto)		
Macchinari e attrezzature (quota di ammortamento)		
Macchinari e attrezzature (da imputare in toto)		
Software/hardware		
<b>Totale</b>	21.004,90	21.004,90

**Partner : DISPAA-UNIFI**

<b>FASI PROGETTUALI/AZIONI</b>								
<b>VOCI DI COSTO</b>	<b>F2.1</b>	<b>F2.2</b>	<b>F2.4</b>	<b>F2.5</b>	<b>F2.6</b>	<b>F3.1</b>	<b>F3.2</b>	<b>TOTALE</b>
Personale non dipendente	€ 3.845,90	€ 7.691,80	€ 13.460,65	€ 19.421,41	€ 11.537,70	€ 25.001,26	€ 2.629,70	€ 83.588,42
Missioni e trasferte						€ 69,30		€ 69,30
Spese generali				€ 235,17				€ 235,17
Investimenti immateriali								€ -
Beni di consumo (acquisti e/o noleggi)					€ 285,03			€ 285,03
Lavori edili e strutturali (quota di ammortamento)								€ -
Lavori edili e strutturali (da imputare in toto)								€ -
Macchinari e attrezzature (quota di ammortamento)								€ -
Macchinari e attrezzature (da imputare in toto)								€ -
Software/hardware (noleggio)				€ 750,00				€ 750,00
<b>Totale</b>	€ 3.845,90	€ 7.691,80	€ 13.460,65	€ 20.406,58	€ 11.822,73	€ 25.070,56	€ 2.629,70	€ 84.927,92

**Partner: DiSAAA-a –UNIPI**

<b>FASI PROGETTUALI/ AZIONI</b>											
<b>VOCI DI COSTO</b>	<b>F4.1</b>	<b>F5.1</b>	<b>F5.2</b>	<b>F6.1</b>	<b>F6.2</b>	<b>F7.1</b>	<b>F7.2</b>	<b>F8.1</b>	<b>F8.2</b>	<b>F10.2</b>	<b>TOTALE</b>
Personale non dipendente	€ 6.569,32	€ 12.033,46	€ 12.067,50	€ 30.163,99	€ 18.169,18	€ 3.066,54	€ 11.964,44	€ 15.992,65	€ 12.067,50	€ 8.045,00	€ 130.139,58
Missioni e trasferte	€ 37,46	--	--	€ 404,32	--	€ 39,80	--	€ 58,60	--	€ 880,00	€ 1.420,18
Spese generali											
Investimenti immateriali											
Beni di consumo (acquisti e/o noleggi)	€ 4.367,13	€ 3.854,36	€ 2.687,26	€ 6.374,94	€ 2.494,00	€ 24,40	€ 2.339,29	€ 1.617,90	€ 1.288,00	--	€ 25.047,28
Lavori edili e strutturali (quota di ammortamento)											
Lavori edili e strutturali (da imputare in toto)											
Macchinari e attrezzature (quota di ammortamento)											
Macchinari e attrezzature (da imputare in toto)											
Software/hardware											
<b>Totale</b>	€ 10.973,91	€ 15.887,82	€ 14.754,76	€ 36.943,25	€ 20.663,18	€ 3.130,74	€ 14.303,73	€ 17.669,15	€ 13.355,50	€ 8.925,00	€ 156.607,04

## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti sono stati soddisfacenti per ipotizzare un'applicazione della metodologia applicata nel progetto nel contesto agricolo di produzione di farine di grani atti alla produzione del pane Toscano DOP a lievitazione naturale. In particolare, l'approccio utilizzato per la scelta delle varietà di grano da seminare ha permesso una fruttuosa collaborazione fra il mondo scientifico e quello agrario/produttivo. Le conoscenze acquisite e consolidate in ambito scientifico sono state trasferite all'agricoltore rendendolo consapevole dell'importanza degli aspetti qualitativi delle diverse varietà e delle tecniche agronomiche per esaltare l'espressione delle singole varietà nell'ambiente pedo-climatico di coltivazione. Inoltre, l'utilizzo di mezzi operativi di campo capaci di distribuzione sito-specifica degli input, integrati a strumenti innovativi di precisione (come immagini da satellite e modelli colturali) ha permesso una prima introduzione conoscitiva su un nuovo modo di coltivazione da parte dell'Azienda Fratelli Bimbi, realtà rappresentativa di un settore che risulta ancora diffidente all'innovazione tecnologica. La particolarità dell'andamento climatico 2014 ha reso difficile un risultato pieno per la campagna cerealicola.

Per quanto riguarda la sperimentazione condotta presso DISAAA-a UNIPI i risultati salienti che sono stati ottenuti sono di seguito elencati:

- E' stata costituita una banca del germoplasma dei ceppi di batteri e lieviti caratterizzanti la madre acida del "Consorzio Pane Toscano a Lievitazione Naturale" (CPT). Ogni ceppo è stato siglato e inserito nella collezione del DiSAAA-a, Laboratori di Microbiologia.
- Sono stati individuati degli indici microbiologici, chimico-fisici e sensoriali caratterizzanti l'impasto acido adottato dal CPT ed il pane prodotto da alcuni panifici aderenti al Consorzio. La determinazione delle concentrazioni dei principali metaboliti prodotti dai microrganismi caratterizzanti l'impasto acido (acido D/L lattico, acido acetico, etanolo ed i rapporti fra di essi), l'influenza di tali composti sul profilo organolettico del pane ottenuto, unitamente all'analisi del profilo delle popolazioni microbiche mediante tecniche molecolari (PCR-DGGE), hanno permesso di evidenziare che, le condizioni ambientali e di lavorazione adottate nelle diverse realtà produttive che applicano il protocollo previsto dal disciplinare di produzione adottato dal CPT unitamente alle tecniche agronomiche di coltivazione del grano per la produzione della farina, non danno origine ad alterazioni microbiologiche indotte sul sistema lievitante.

- Sono state indagate le condizioni operative per condurre la liofilizzazione dell'impasto acido del CPT per valutare la possibilità di impiego di tale tecnologia conservativa con lo scopo di semplificare drasticamente il protocollo di rinfresco dell'impasto acido con conseguente riduzione dei costi di manodopera. Il prolungamento della conservabilità dell'impasto acido assicurato dalla liofilizzazione ne consente inoltre l'impiego per i nuovi operatori che facessero richiesta di aderire al CPT e di modulare prontamente le potenzialità produttive dei panificatori già inseriti nel Consorzio in funzione delle richieste di mercato.
- La costituzione di un archivio dei dati microbiologici chimico-fisici e sensoriali di riferimento, unitamente all'utilizzo di un software appositamente sviluppato, rappresenta uno strumento valido per facilitare e rendere più spedite le procedure di tracciabilità e rintracciabilità dell'impasto acido adottato dal "Consorzio Pane Toscano a Lievitazione Naturale" (CPT).

Infine, è stato sviluppato un innovativo sistema informativo di tracciabilità di filiera a supporto delle aziende coinvolte nella filiera di produzione del "Pane toscano a lievitazione naturale (DOP), in grado di raccogliere e gestire in maniera centralizzata i dati relativi alle materie prime in entrata e ai prodotti in uscita presso ogni singolo operatore della filiera. Si tratta di una soluzione web innovativa altamente personalizzata, nata sulle esigenze specifiche della filiera, grazie alla quale è possibile mappare in modo semplice e sicuro tutte le fasi relative ad un determinato lotto di Pane Toscano DOP.

Lucca (LU), lì 11 dicembre 2014

Molino F.lli Giambastiani S.r.l.