

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI**

**CAMPUS DI CESENA**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN**

**SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI**

**TITOLO DELLA TESI**

**ALIMENTI VEGETALI FERMENTATI E RUOLO E IMPORTANZA DEI  
BATTERI LATTICI**

Tesi in

29588-MICROBIOLOGIA AVANZATA E PREDITTIVA (C.I.)

29594- MICROBIOLOGIA DELLE FERMENTAZIONI

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Rosalba Lanciotti

Correlatore:

Dott. Lorenzo Siroli

Candidato: Natale Federica

Matricola N°: 926688

**Anno Accademico 2020/2021**

Sessione unica

## **INDICE**

<b>CAPITOLO 1: I BATTERI LATTICI</b> .....	<b>2</b>
1.1 Classificazione tassonomica dei batteri lattici.....	3
1.2 Metabolismo dei batteri lattici.....	5
1.3 Ruolo dei batteri lattici nei processi fermentativi.....	7
1.4 Potenzialità probiotiche dei batteri lattici .....	11
<b>CAPITOLO 2: RUOLO DEI BATTERI LATTICI NELLA FERMENTAZIONE E NELLA BIOCONSERVAZIONE DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE VEGETALE</b> .....	<b>13</b>
2.1 Batteri lattici e la fermentazione spontanea dei prodotti vegetali .....	15
2.1.1 I parametri ambientali che influenzano la fermentazione .....	18
2.2 L'uso delle colture starter.....	21
2.3 I criteri per la selezione degli starter autoctoni .....	23
2.3.1 Proprietà funzionali associate ai batteri lattici autoctoni di prodotti vegetali .....	25
<b>CAPITOLO 3: VEGETALI FERMENTATI</b> .....	<b>26</b>
3.1 Fermentazione in Oriente: il Kimchi .....	27
3.1.1 Processo fermentativo.....	28
3.1.2 Effetti benefici associati al consumo del Kimchi .....	31
3.2 Pickles: cetriolini e olive da tavola .....	34
3.2.1 Il “Sauerkraut” o crauti e il processo fermentativo.....	38
3.2.2 Effetti benefici dei crauti.....	41
3.3 Aspetti biochimici ed enzimatici legati alla fermentazione dei vegetali .....	42
3.3.1 La conservazione delle verdure fermentate.....	43
3.3.2 Riutilizzo della salamoia .....	44
<b>CAPITOLO 4: CONCLUSIONI</b> .....	<b>46</b>
<b>CAPITOLO 5: BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>48</b>

# CAPITOLO 1

## I BATTERI LATTICI

I batteri lattici sono un gruppo di microrganismi in grado di fermentare diversi substrati, dando origine a numerosi prodotti di interesse per il settore agroalimentare e industriale. Si tratta di batteri Gram-positivi di forma bastoncellare o coccoide, immobili, non sporigeni e non patogeni. Dal punto di vista nutrizionale risultano esigenti e, date le loro limitate capacità biosintetiche, necessitano di molte vitamine, amminoacidi e basi azotate. Sono incapaci di ridurre i nitrati a nitriti se non in particolare condizioni e sono catalasi negativi. Sono batteri anaerobi ossigeno tolleranti, sono infatti privi di citocromi e ottengono l'energia necessaria attraverso la fosforilazione del substrato piuttosto che dal trasporto degli elettroni e dalla fosforilazione ossidativa. Possiedono quindi un metabolismo energetico di tipo fermentativo e sono in grado di produrre acido lattico a partire da uno o più carboidrati attraverso la via omolattica o eterolattica e per questo motivo vengono divisi nei sottogruppi: omofermentanti obbligati, eterofermentanti facoltativi, eterofermentanti obbligati. Le temperature ottimali per la loro crescita variano dai 15-20°C ai 40-45°C; alcune specie crescono anche a temperature di 4°C, altre fino a 50-55°C. Alcuni di essi sono resistenti a trattamenti di pastorizzazione. Sono microrganismi molto versatili, ampiamente diffusi in natura in quanto presenti in differenti condizioni ambientali; si trovano infatti nell'intestino dell'uomo e degli animali, nei vegetali (crauti, cetrioli, olive, foraggi insilati) ed in numerosi prodotti agroalimentari (yogurt, formaggi e salumi in particolare).

(Foschino et al., 1995)

## 1.1 Classificazione tassonomica dei batteri lattici

I batteri lattici appartengono alla sottodivisione dei *Clostridium* che comprende i gram-positivi con G+C < 50 mol. La classificazione sulla base delle sequenze Rna16S fino a Marzo 2020 riconosceva i seguenti generi:

*Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*. (Vandamme et al., 1996).

Il genere *Lactobacillus* prima di marzo 2020 comprendeva 261 specie estremamente diverse a livello fenotipico, genotipico ed ecologico. Per tanto il genere è stato riclassificato sulla base del sequenziamento dell'intero genoma, del profilo amminoacidico, di criteri fisiologici e della nicchia ecologica. Il genere *Lactobacillus* è stato quindi diviso in 25 generi (incluso *Lactobacillus*): *Paralactobacillus*, *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agriolactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus*, *Lentilactobacillus*.

È stata fatta una ri-descrizione della famiglia in modo da includere generi precedentemente inclusi nelle famiglie *Lactobacillaceae* e *Leuconostocaceae*.

*Lactobacillaceae* che comprende il genere *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* e *Pediococcus* e la famiglia *Leuconostocaceae* con i generi *Convivina*, *Fructobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Weissella*.

Le specie del genere *Lactobacillus* sono gram-positivo, omofermentanti, di forma bastoncellare, non sporogene. La maggior parte delle specie non fermenta i pentosi e nessuna codifica geni della via dei pentosi fosfato o la piruvato formato lassi. Nella descrizione rivista sono inclusi tutti i microrganismi appartenenti precedentemente al gruppo di *L. delbrueckii* (*L. delbrueckii bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*)

Molte specie del genere *Lactobacillus* coabitano, soprattutto nell'intestino e svolgono un ruolo positivo nel nostro microbiota intestinale, interagendo con i *Lactobacillus* eterofermentanti (*Leuconostoc*).

I *Lactobacillus* si classificano in microrganismi eterofermentanti e omofermentanti, microaerofili, hanno variabili temperature ottimali di sviluppo e il valore di pH ottimale è compreso tra 5,5-6,2. Il genere comprende differenti specie suddivise in 3 gruppi: Lattobacilli omofermentanti obbligati, Lattobacilli omofermentanti e/o eterofermentanti facoltativi, Lattobacilli eterofermentanti obbligati. Il gruppo 1 comprende i lattobacilli omofermentanti obbligati termofili tra cui: *L. Delbrueckii*; *Lb. delbrueckii subs. lactis*; e *L. Helveticus*. *Lb. acidophilus*. Il *L. delbrueckii subs. bulgaricus* è un importante starter per la produzione di yogurt, ed è spesso utilizzato in associazione al *L. Delbrueckii subsp. lactis*. per la produzione di formaggi. Il gruppo 2 comprende i lattobacilli omofermentanti facoltativamente eterofermentanti tra cui *Lacticaseibacillus casei* e *Lactiplantibacillus.plantarum*; *Latilactobacillus sakei* e *Latilactobacillus curvatus*. Le specie del *L. casei* sono presenti in molti prodotti lattiero caseari, insilati e intestino; viene spesso utilizzato nella lievitazione naturale del pane, fermentazione in salamoia e può causare il deterioramento dei formaggi con la produzione di CO<sub>2</sub> tramite la fermentazione del citrato. Il *Plantarum* è utilizzato come starter nella produzione di carni fermentate e prodotti a base di cereali e vegetali. *L. curvatus* e *Lb. sakei* vengono utilizzati nelle fermentazioni vegetali come crauti, frutta e verdura in salamoia. Il gruppo 3 comprende i lattobacilli eterofermentanti obbligati, il più importante è il *Fructilactobacillus Sanfranciscensis* che converte il maltosio in acido lattico e acetico e produce vari composti aromatici in pane a lievitazione naturale. Si aggiungono poi *L. pontis*, *Limosilactobacillus panis*; *Levilactobacillus brevis* (presente negli impasti acidi, nei crauti e in alcuni latti fermentati) *Limosilactobacillus Fermentum*; *Lentilactobacillus Kefiri* (Jinshui Z. et al., 2020)

I batteri appartenenti al genere *Leuconostoc* appartengono alle *Leuconostocaceae*, ordine *Lactobacillales*, classe *Bacilli*, *phylum Firmicutes*. Le cellule sono sferiche e si presentano sia singolarmente sia in catenelle. Sono gram positivi, non mobili, non sporigeni e facoltativamente anaerobi. La temperatura di crescita ideale è compresa tra 20 e 30 °C, la crescita è influenzata dalla presenza di aminoacidi quali tiamina, biotina e acido pantotenico. Da un punto di vista metabolico sono degli eterofermentanti obbligati in grado di produrre acido lattico (di tipo D), etanolo (o acido acetico) ed anidride carbonica dalla fermentazione degli zuccheri. Il principale è il *Leuconostoc Mesenteroides*, presente in quantità maggiore rispetto ad altri batteri lattici per cui dà avvio al processo fermentativo anche se ben presto viene sostituito da lattobacilli e pediococchi dotati di una maggiore acido-tolleranza. (Ottaviani F. 1996)

I batteri del genere *Pediococcus* appartengono alla famiglia delle *Lactobacillaceae* ordine *Lactobacillales*, classe *Bacilli*, *phylum Firmicutes*. Questi batteri hanno un metabolismo omofermentativo e producono, a partire dagli esosi, acido D (-) lattico o L (+) lattico, a seconda delle

specie. Le cellule si presentano con forma sferica, raggruppate in tetradi, raramente come singole cellule. Sviluppano bene a 30 gradi, ma la temperatura ideale di crescita è tra i 25-40 °C. Il genere comprende 8 specie: *Pc. acidilactici*, *Pc. pentosaceus*, *Pc. Dextrinicus*, *Pc. parvulus*, *Pc. inopinatus*, *Pc. damnosus*, *Pc. urinaeequi*, *Pc. halophilus*. I primi due sono presenti nella fermentazione di substrati vegetali. (Zambonelli et al.,2001)

## **1.2 Metabolismo dei batteri lattici**

I batteri lattici hanno esigenze nutrizionali elevate e complesse (fonti di carbonio, amminoacidi, vitamine, acidi nucleici e sali minerali) e un metabolismo energetico abbastanza semplice. La principale attività metabolica attraverso la quale, i batteri lattici si procurano l'energia necessaria per garantire i processi vitali è la fermentazione dei carboidrati (monosaccaridi e disaccaridi). Questa attitudine varia a seconda del patrimonio enzimatico delle diverse specie e delle condizioni ambientali. Generalmente i batteri lattici possono utilizzare differenti fonti di carbonio, selezionando a seconda delle condizioni esterne la via metabolica di maggior profitto energetico per la crescita e di minor costo cellulare. Due vie fermentative principali differenziano i batteri lattici in omofermentanti ed eterofermentanti. Nel primo caso da un monosaccaride come il glucosio otteniamo due molecole di acido piruvico, che in condizioni normali (presenza di zuccheri e limitata presenza di ossigeno) vengono ridotte ad acido lattico. Nella fermentazione eterolattica avviene la decarbossilazione con liberazione di CO<sub>2</sub>, e produzione di acido lattico, etanolo o aldeide acetica. Rispetto alla concentrazione iniziale di zucchero la resa in acido lattico è dimezzata rispetto alla via fermentativa omolattica. Nel caso dei disaccaridi (es. lattosio), il trasporto a livello di membrana cellulare può prevedere o meno la fosforilazione dello zucchero. Dopo l'idrolisi la fermentazione prosegue come nei monosaccaridi. Molte specie di batteri lattici, non solo eterofermentanti, sono in grado di utilizzare i pentosi. (eterofermentanti facoltativi). In genere sono coinvolte specifiche permeasi a livello di membrana citoplasmatica. Nel citoplasma i pentosi vengono fosforilati e convertiti da epimerasi o isomerasi specifiche in ribulosio-5-fosfato o xilulosio-5fosfato. I batteri lattici possono modificare il loro metabolismo e indirizzare il processo metabolico nei modi energeticamente più favorevoli, è infatti centrale il ruolo dell'acido piruvico, che può essere metabolizzato secondo differenti vie:

- Diacetile-acetoino; comune in differenti specie di batteri lattici
- Piruvato-formico liasi: l'enzima catalizza la reazione tra piruvato e CoA e da aceti coA, che può essere ulteriormente trasformato in etanolo o acetato, tramite aceti fosfato, questa via assume particolare rilievo in condizioni di anaerobiosi.
- Piruvato ossidasi: il sistema enzimatico presente in alcune specie (*L. plantarum*) in presenza di ossigeno trasforma l'acido piruvico in CO<sub>2</sub>, acetil-P e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Piruvato deidrogenasi: l'enzima attivo in alcuni latte Cocchi induce la formazione di acetilCoA, che viene poi trasformato in etanolo o acetato.

Differenti specie sono in grado di utilizzare anche il citrato con produzione di composti aromatici. La fermentazione del citrato porta alla produzione di diacetile e anidride carbonica che possono essere sostanze desiderate per alcuni prodotti. (Bozzetti V. 2011)

Il genere *Lactobacillus* a seconda del metabolismo è suddiviso in tre gruppi:

gruppo 1: omofermentativo; avviene la fermentazione degli esosi e si forma esclusivamente acido lattico. I pentosi non sono fermentati. Le specie facenti parte di questo gruppo sono termofile *L. delbrueckii subsp. delbrueckii*; *L. delbrueckii subsp bulgaricus*; *Lb. delbrueckii subsp. lactis*; *Lb. helveticus*; *L. acidophilus*

gruppo 2: omofermentativo, facoltativamente eterofermentativo. Questi lattobacilli formano solo acido lattico per fermentazione degli esosi, ma talvolta in carenza di zuccheri anche acido acetico, etanolo e acido formico; fermentano i pentosi con formazione di acido lattico e acetico. Il gruppo comprende molte specie mesofile: *Lactobacillus plantarum*; *Sakei*; *casei e rhamnosus*.

Gruppo 3: eterofermentativo obbligato; questi lattobacilli fermentano gli esosi con formazione di acido lattico, acetico, etanolo e anidride carbonica. Fermentano i pentosi con produzione di acido lattico e acetico. Fanno parte di questo gruppo: *Lactobacillus brevis*; *Lactobacillus buchneri*; *L. sanfranciscensis* ; *Lb. Kefiranofaciens*; *Lactobacillus fermentum*; *Lb. reuteri*. (Zambonelli C. et al.,2001)

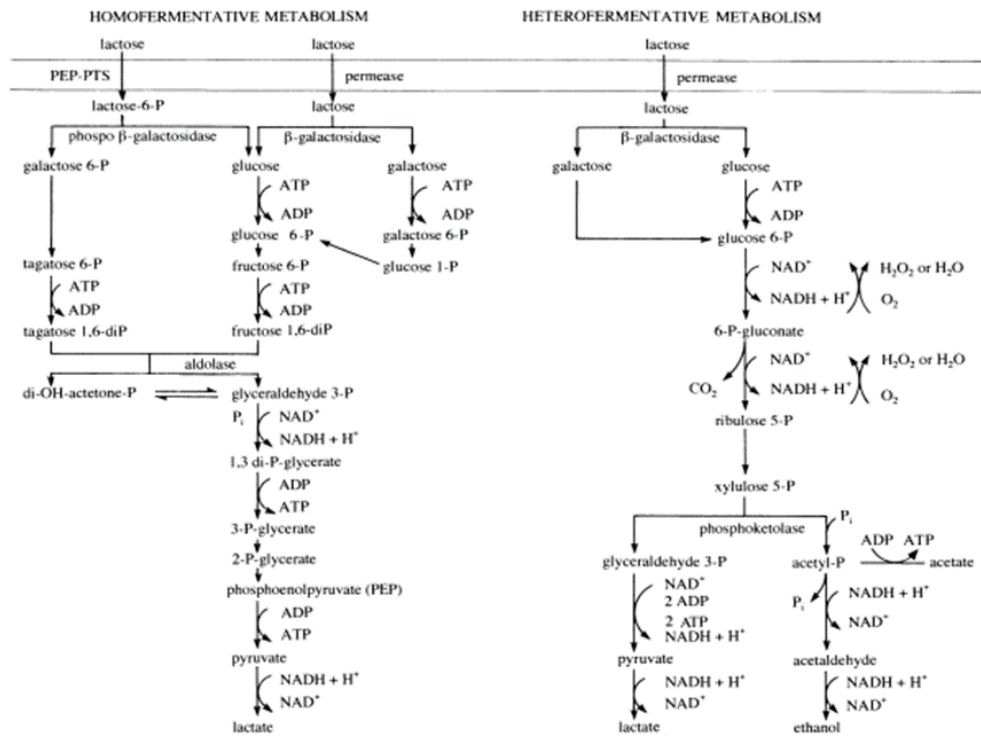


Figura 2 Metabolismo dei carboidrati nei batteri lattici omofermentativi ed eterofermentativi. L.De Vuyst & Erik J. Vandamme (1994)

### 1.3 Ruolo dei batteri lattici nei processi fermentativi

Diverse sono le proprietà metaboliche dei batteri lattici che determinano le caratteristiche qualitative dell'alimento che fermentano. Le principali sono:

- ✓ Fermentazione degli zuccheri e potere acidificante, che esprime la prontezza e la rapidità con cui il ceppo dà luogo alla fermentazione, condizionata dal metabolismo glucidico.
- ✓ Attività proteolitica: i batteri posseggono un sistema proteolitico complesso, intracellulare, che in seguito ad una lisi cellulare, viene rilasciato nel substrato contribuendo alla formazione di metaboliti determinanti le caratteristiche del prodotto finito (consistenza, valore nutrizionale, valore salutistico come i peptidi bioattivi, aroma. I componenti strutturali utilizzati sono proteasi legate alla parete cellulare il cui compito è di demolire le proteine in oligopeptidi; sistemi di trasporto specifici localizzati sulla parete e sulla membrana cellulare consentono l'ingresso dei peptidi nel citoplasma e peptidasi intracellulari che idrolizzano gli oligopeptidi in peptidi più corti



o singoli aminoacidi, i singoli aminoacidi possono essere precursori di composti dell'aroma e gusto, di amine biogene e di composti con attività antibatterica e antifungina.

La capacità proteolitica è un carattere ceppo-specifico e condiziona le caratteristiche chimico-fisiche e strutturali del prodotto.

✓ Attività lipolitica: L'attività lipolitica nei batteri lattici è limitata e riguarda prevalentemente i mono e digliceridi già rilasciati dai trigliceridi, presenti nella materia prima o nella matrice, ad opera delle lipasi endogene o addizionate. Tuttavia, gli acidi grassi possono essere rilasciati nel mezzo, nel prodotto alimentare dai batteri lattici grazie all'attività esterasica.

✓ Produzione di polisaccaridi: molti ceppi di batteri lattici sono in grado di produrre diversi esopolisaccaridi, zuccheri a lunga catena che possono rimanere ancorati alla parete, formando una specie di capsula, oppure essere rilasciati nel mezzo. I polisaccaridi prodotti possono differenziarsi per struttura, peso molecolare e composizione. Il ruolo di queste sostanze è risultato di notevole interesse, in particolare permette di ottenere yogurt e bevande fermentate con diverse caratteristiche reologiche e di viscosità. È stato ipotizzato anche un effetto prebiotico, e un effetto positivo per la salute del consumatore. Le capsule di esopolisaccaridi extra-parietali possono conferire ai ceppi una maggiore resistenza all'attacco fagico, e possono proteggere le cellule dall'essiccazione.

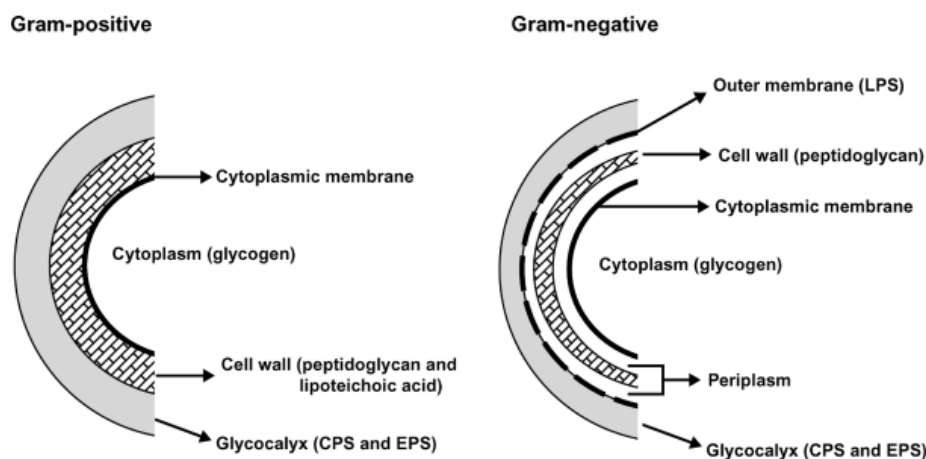


Figura 3: Localizzazione dei polisaccaridi (Ruas M., 2002)

✓ Produzione di batteriocine: molecole di natura proteica, prodotte in quantità maggiore dopo la fase esponenziale di crescita batterica, in grado di inibire la crescita di altri microrganismi. Sono considerate GRAS (generally recognized as safe) e sono relativamente stabili al calore e all'acidità che vengono riscontrati in un prodotto alimentare. Possono essere più o meno inattivate

dalle proteasi, dalle peptidasi che sono presenti nel prodotto alimentare, possono quindi essere più o meno attive in rapporto al pH e alle altre condizioni che si possono trovare nel prodotto in cui vanno ad esplicare la loro attività. Sono attive a bassi valori di pH e per periodi prolungati. Ci sono batteriocine ad ampio spettro di azione con azione nei confronti di microrganismi alterativi e patogeni e batteriocine con ristretto spettro d'azione attive nei confronti dei principali ceppi appartenenti alla stessa specie del ceppo produttore, ma non attive nei confronti del produttore.

Le batteriocine possono essere divise in quattro classi principali:

- Batteriocine di classe I comprendono i lantibiotici, piccoli peptidi cationici, idrofobici, stabili al calore, tra cui Lactocina, Lacticina, Carnocina, Variacina e Nisina
- Batteriocine di classe II sono piccoli peptidi (4-6 KDa) stabili al calore e non-lantibiotici.; un esempio è la sakaicina
- Batteriocine di III classe: peptidi di grandi dimensioni, termolabili che non presentano un'attività antimicrobica specifica, meno studiate rispetto alle precedenti
- Batteriocine di IV classe: molecole complesse, termolabili ed idrofobiche, nella cui struttura si riconoscono componenti sia di natura lipidica che glucidica, anch'esse poco studiate

Un antimicrobico ampiamente utilizzato nell'industria agro-alimentare è la nisina, prodotta da alcuni ceppi di *Lactococcus lactis spp lactis*, formata da 34 amminoacidi di cui uno inusuale che è la lantionina. La nisina, oltre ad essere stabile nei prodotti alimentari, ha uno spettro d'azione abbastanza ampio; infatti, è attiva nei confronti dei batteri Gram + quali *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *botulinum*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, lo spettro d'azione può essere diverso a seconda del ceppo che ha prodotto la nisina stessa. È l'unica batteriocina il cui utilizzo è approvato nel settore alimentare, ed è indicata come E234 nella lista europea degli additivi. Viene utilizzata in prodotti quali cibi in scatola, formaggi, formaggi fusi, dessert pastorizzati preparati con latte, ricotta, prodotti derivati dal latte, preparazioni liquide a base di uovo nelle preparazioni di birra e bevande come succhi di frutta e infine vegetali e gelati. È una molecola termostabile insolubile in condizioni neutre e alcaline, inodore e incolore. Diverse varianti di nisina sono conosciute, le principali sono la A e Z, l'esistenza di più varianti spiega proprio il diverso spettro d'azione che la nisina può esplicare nei confronti dei microrganismi target, la variante più interessante nel settore alimentare è la variante Z poiché è quella che rimane attiva più a lungo, è più stabile nel tempo ed esplica la sua attività nei confronti di un più ampio numero di microrganismi. Analogamente a molte altre batteriocine, la nisina determina una permeabilizzazione della membrana cellulare, la quale genera la formazione di

pori perché c'è una interazione tra la carica positiva del segmento C-terminale della nisina stessa e la carica negativa della membrana fosfolipidica ed una dissipazione della forza proton-motrice. La nisina inibisce la sintesi della parete cellulare, quindi conseguentemente va ad inibire la divisione cellulare, ovvero la moltiplicazione batterica.

Altre batteriocine contenenti lantionina sono Lacticina 481 (prodotta da *Lactococcus lactis spp lactis*, nello specifico dal ceppo CNRZ 481) e Lactocina S (prodotta da *Lb. sakei*). Il numero di batteriocine non contenenti lantionina è molto grande, esse hanno uno spettro d'azione meno ampio di quelle che contengono lantionina, un esempio possono essere le lactococcine prodotte da *Lactococcus lactis spp cremoris*. I microrganismi bersaglio delle batteriocine possono essere microrganismi patogeni ma anche gli stessi batteri lattici, i batteri lattici in alcuni casi possono anche essere agenti di alterazione, per cui l'attività delle batteriocine nei confronti dei batteri lattici può essere una caratteristica ricercata.

(Bozzetti V.,2011)

I batteri lattici appartenenti al genere *Lactobacillus* producono batteriocine che hanno uno spettro di attività ristretto. I principali produttori sono: *L. helveticus*; *L. Acidophilus*; *L. plantarum* starter utilizzato per la fermentazione di olive e in grado di produrre batteriocine attive nei confronti di diversi batteri gram positivi, tra cui clostridi, batteri propionici ed altri batteri lattici; *L.sakei*; quest'ultimo può produrre una batteriocina. Denominata sakacina in grado di inibire la *Listeria monocytogenes*.

È nota la produzione di batteriocine anche in diversi ceppi di *Pediococcus* tra cui *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* isolati da vegetali e carne in grado di inibire sia patogeni come *L. monocytogenes*, sia i clostridi responsabili di fenomeni di deterioramento in diversi prodotti agroalimentari. Anche i ceppi appartenenti al genere *Leuconostoc* sono produttori di batteriocine, molto termostabili e attive nei confronti di batteri lattici e *L. monocytogenes*. (Ottaviani F. 1996)

I batteri lattici hanno numerosi vantaggi nelle fermentazioni industriali:

- non sono patogeni
- non formano tossine o prodotti tossici
- sono microaerofili e aereo tolleranti
- crescono rapidamente, richiedono un breve processo di fermentazione
- capacità di utilizzare diversi substrati alternativi agli zuccheri a fini energetici

- adattamento alla temperatura: temperatura ottimale di crescita e capacità di metabolizzare a temperature non ottimali
- resistenza all'acidità: capacità di tollerare valori di acidità elevata
- capacità acidificante
- resistenza a differenti concentrazioni di sale
- resistenza e sensibilità all'infezione fagica
- sensibilità a differenti sostanze ad attività battericida o batteriostatica  
(L. De Vuyst & Erik J. Vandamme 1994)

## 1.4 Potenzialità probiotiche dei batteri lattici

Si sta assistendo ad un crescente interesse da parte dei consumatori e delle industrie alimentari verso gli alimenti probiotici funzionali, cioè quei prodotti contenenti batteri probiotici con caratteristiche positive e in grado di conferire al prodotto sostanze benefiche per la salute dell'uomo. Gli alimenti considerati probiotici devono contenere un numero sufficientemente elevato di tali microrganismi vivi ed attivi (in genere lattobacilli e bifidobatteri) e quindi in grado di raggiungere l'intestino umano ed esercitare i loro benefici effetti tramite colonizzazione diretta. I microrganismi probiotici devono avere origine intestinale; devono essere assolutamente sicuri per l'impiego umano; resistenti a bassi valori di pH bile e succhi pancreatici; persistenti, nell'intestino umano; facilmente riproducibili e devono rimanere vitali durante la conservazione.

I principali batteri lattici con potenzialità probiotica sono:

- ❖ *Lactobacillus acidophilus*
- ❖ *Lactobacillus crispatus*
- ❖ *Lactobacillus gallinarum*
- ❖ *Lactobacillus casei*
- ❖ *Lactobacillus rhamnosus*
- ❖ *Lactobacillus salivarius*
- ❖ *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus*
- ❖ *Lactobacillus gasseri*

- ❖ *Lactobacillus amylovorus*
- ❖ *Lactobacillus johnsonii*
- ❖ *Lactobacillus paracasei*
- ❖ *Lactobacillus reuteri*
- ❖ *Lactobacillus plantarum*
- ❖ *Streptococcus thermophilus*
- ❖ *Enterococcus faecium*
- ❖ *Enterococcus faecalis*

Per garantire la vitalità di questi microrganismi sono state messe in atto diverse strategie tra cui, l'alta pressione di omogeneizzazione che permette di mantenere e incrementare la vitalità dei microrganismi probiotici che vengono impiegati nel processo fermentativo o come starter della fermentazione, questo trattamento modifica l'attività dei microrganismi, attività enzimatiche, accelera le attività peptidasiche e proteolitiche, incrementa la produzione di determinati aromi. (Tabanelli G. 2009)

I potenziali benefici apportati dai batteri lattici probiotici sono:

- ✓ Soppressione dei patogeni presenti nel nostro intestino causa di diarrea o altre problematiche gastrointestinali
- ✓ Rafforzare e stimolare il sistema immunitario per prevenire infezioni causate da diversi patogeni e virus.
- ✓ benefici ipoglicemizzanti
- ✓ Miglioramento della tollerabilità del lattosio grazie alla produzione di beta-galattosidasi.
- ✓ Riduzione della produzione di sostanze mutagene e tossiche nell'intestino
- ✓ Riduzione dei fattori di rischio
- ✓ Produzione di acidi grassi a corta catena; vitamine
- ✓ Attività antipertensiva
- ✓ Attività antitrombotiche

Ogni ceppo probiotico ha specifiche caratteristiche, e riesce ad esplicare un effetto positivo se riesce a colonizzare l'intestino. La dose giornaliera raccomandata dipende dalle caratteristiche e funzioni del ceppo. La via d'azione è attribuita a diversi composti bioattivi prodotti durante la fermentazione come polifenoli, peptidi bioattivi, acido linoleico coniugato, acido gamma amino-butirrico e vitamine. (Belal J. M., 2001)

## CAPITOLO 2

### **RUOLO DEI BATTERI LATTICI NELLA FERMENTAZIONE E NELLA BIO CONSERVAZIONE DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE VEGETALE**

L'interesse verso gli alimenti fermentati è in forte crescita, si sta assistendo ad una vera e propria riscoperta della fermentazione e degli alimenti fermentati, per quanto la fermentazione è una delle più antiche tecniche di trasformazione e conservazione degli alimenti. Le trasformazioni che avvengono a seguito del processo fermentativo hanno tre principali conseguenze e avvengono ad opera dei microrganismi:

- Permettono di conservare i cibi a medio e lungo termine.
- Sviluppano diversi composti che cambiano in parte il sapore e la consistenza della materia prima.
- Modificano la disponibilità di alcune sostanze presenti negli alimenti, migliorandone aspetti nutrizionali e salutistici e possono in alcuni casi arricchire microbiota intestinale con microrganismi probiotici.

Attualmente oltre agli alimenti fermentati tradizionali che sono alla base della nostra alimentazione (pane, vino, birra...), si sono diffusi alimenti fermentati poco conosciuti come kombucha, kefir e verdure fermentate non pastorizzate. Questi alimenti presentano un valore aggiunto rispetto ai tradizionali alimenti fermentati, poiché rispetto a questi ultimi non sono generalmente prodotti con microrganismi starter commerciali, ma dai batteri lattici, batteri acetici e lieviti indigeni che fermentano spontaneamente la materia prima apportando miglioramenti della funzionalità del prodotto finale. Tra gli altri possono sviluppare anche microrganismi probiotici in grado di influenzare positivamente il microbiota intestinale. (Sacco F., 2021)

Le verdure fermentate rappresentano un serbatoio di differenti generi di batteri lattici tra cui *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Pediococcus*. Questi LAB di origine vegetale, possiedono caratteristiche probiotiche, Molti sono i vegetali sottoposti a processo di fermentazione. In particolare, crauti, cetrioli, olive, carote, cavolfiori, sedano, cipolle, peperoni dolci o piccanti o pomodori verdi. La loro commercializzazione è ad oggi inferiore rispetto ai prodotti carnei e lattiero caseari. La minore diffusione di questi prodotti è legata principalmente alle stringenti condizioni geografiche e meteorologiche che richiedono; tuttavia, la loro disponibilità e reperibilità è in continua espansione (Peres et al.,2012).



Figura 1 Verdure fermentate (Riccardo Lautizi.,2016)

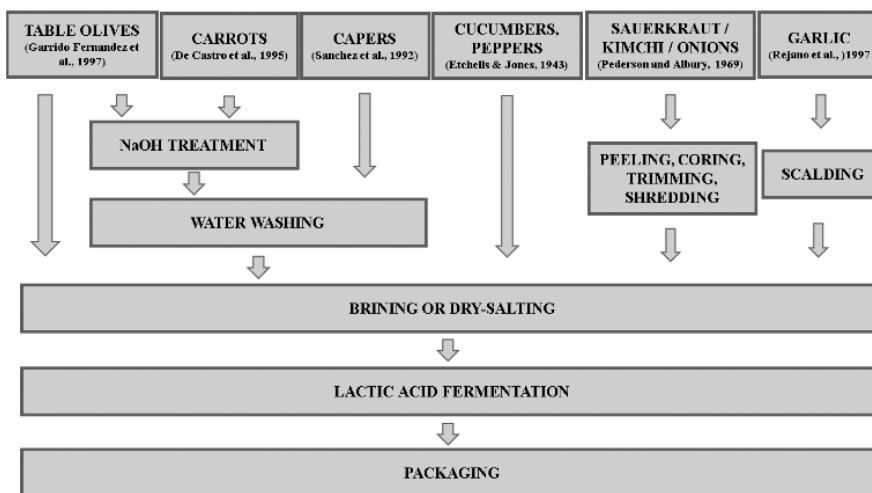
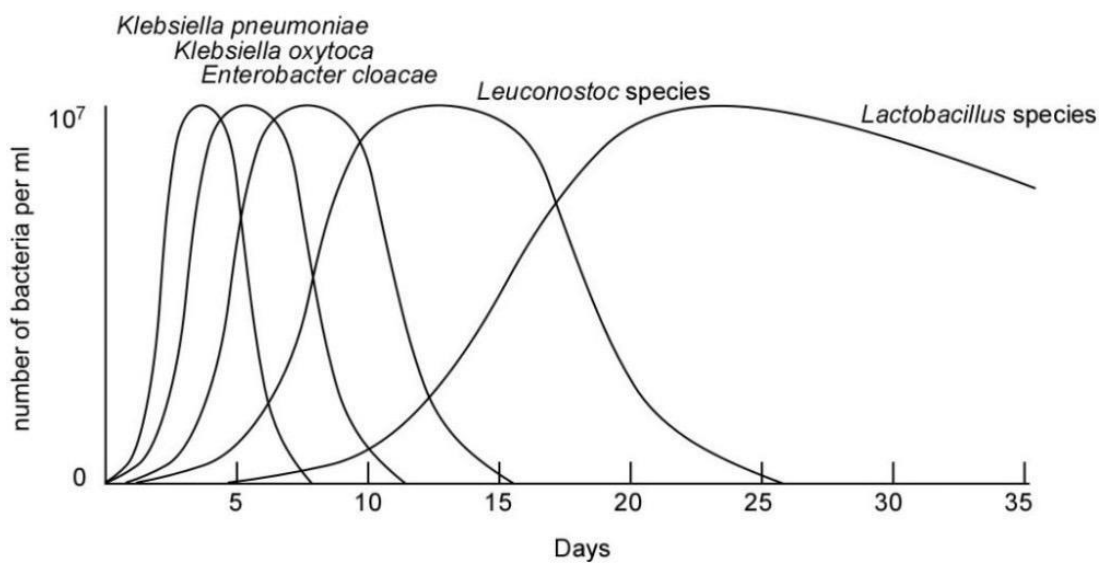


Figura 2 Diagramma di flusso dei diversi processi di lavorazione dei vegetali fermentati (J. bautista -Gallego et al., 2020)

## 2.1 Batteri lattici e la fermentazione spontanea di prodotti vegetali

La fermentazione spontanea è generalmente una fermentazione lattica, che si basa sulla microflora lattica naturalmente presente sui prodotti e nell'ambiente. Sulla superficie fogliare di tutti i vegetali sono presenti numerosi microrganismi, anche degradativi, ma è fondamentale che questi alimenti non vengano sottoposti a trattamenti termici intensi pre-fermentazione, poiché a seguito della pastorizzazione i prodotti vegetali perderebbero componenti ad elevato valore nutrizionale oltre alla riduzione della microflora potenzialmente utile al processo fermentativo. La microflora presente sui prodotti vegetali si modifica e differisce in seguito alle differenti fasi di processo quali lavaggio, raccolta e taglio sul prodotto in campo infatti sono dominanti numerose specie Gram-negative e/o Gram-positive sporigene, ma in misura minore c'è anche la presenza di lieviti e muffe. In seguito alla raccolta, per effetto delle operazioni di taglio e all'azione plasmolitica del sale si ha la rottura dei tessuti vegetali, e la fuoriuscita del contenuto cellulare ricco di nutrienti, che favorisce lo sviluppo di microrganismi, differenti dalle specie inizialmente presenti sul prodotto in campo. (Ottaviani F. 1996). L'ossigeno presente viene eliminato per respirazione endogena dalle cellule vegetali e dai microrganismi aerobi presenti sul prodotto vegetale. Si ha in seguito un lieve aumento della temperatura e l'inizio di una seconda fase in cui: le specie aerobie Gram-negative vengono soprafatte dai batteri Gram-positivi anaerobi o anaerobi facoltativi del genere *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Enterobacter* e *Clostridium*. Gli enterobatteri, presenti in maggior numero rispetto ad altri gruppi, sono estremamente sensibili alla presenza di NaCl; infatti, la loro possibilità di moltiplicazione è molto limitata, e dipende dalle concentrazioni impiegate di cloruro di sodio. (Zambonelli C. et al.). I batteri lattici anche se non numerosi, sono gli attori principali del processo fermentativo, essi essendo microaerofili o anaerobi, possono sviluppare all'interno della massa del vegetale che viene posta in tank o tini ,ambienti in cui l'ossigeno diminuisce progressivamente, consentendo la selezione ,nei primi giorni , di batteri lattici, eterofermentanti ( *Leuconostoc mesenteroides*), che avviano la fermentazione, sostituiti poi da specie omofermentanti ( *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus damnosus*) e eterofermentanti facoltativi ( *Lactobacillus brevis* ). Questi ultimi molto più acido-tolleranti e capaci di fermentare anche i pentosi rispetto agli omofermentanti. Se la concentrazione salina non è troppo alta e se ci sono zuccheri residui, al termine della fermentazione lattica possono svilupparsi dei lieviti. Perciò è richiesto il consumo da parte dei batteri lattici di tutti i carboidrati fermentescibili in modo da evitare la fermentazione alcolica ad opera dei lieviti, considerata negativa per questa categoria di prodotti.





**Figura 3** Dinamiche di crescita tra differenti specie microbiche durante la fermentazione di vegetali (Sacco F. 2021)

genere <i>Lactobacillus</i> :	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. plantarum</i>
genere <i>Leuconostoc</i> :	<i>Ln. mesenteroides</i>
genere <i>Pediococcus</i> :	<i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus</i>
genere <i>Lactococcus</i> :	<i>Lc. lactis</i>
genere <i>Enterococcus</i> :	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>

**Figura 4** I principali batteri lattici presenti sui vegetali nel post-raccolta. (Ottaviani F. 2001)

Vegetable Matrix	Specie	Reference
Table olives	<i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. parafarraginis</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>Pediococcus</i> sp., <i>Lc. mesenteroides</i>	(Abriouel <i>et al.</i> , 2011; Hurtado <i>et al.</i> , 2012; Bautista-Gallego <i>et al.</i> , 2013; Benítez-Cabello <i>et al.</i> , 2016, 2019)
Kimchi	<i>L. curvatus</i> , <i>L. sakei</i> , <i>Lc. mesenteroides</i> , <i>Lc. gelidum</i> , <i>Lc. carnosum</i> , <i>Lc. gasicomitatum</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>W. soli</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>W. koreensis</i> , <i>W. cibaria</i>	(Jung <i>et al.</i> , 2013; Jang <i>et al.</i> , 2014; Hong <i>et al.</i> , 2015; Ji, Jang and Kim, 2015; Kyung <i>et al.</i> , 2015; Kim <i>et al.</i> , 2017)
Sauerkraut	<i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>Lc. mesenteroides</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. coryniformis</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Lc. citreum</i> , <i>Lc. argentinum</i> , <i>Weissella</i> sp.	(Johanningsmeier <i>et al.</i> , 2007; Plengvidhya <i>et al.</i> , 2007; Qing Yue <i>et al.</i> , 2013; Yan <i>et al.</i> , 2015)
Cucumbers	<i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. paracasei</i> ; <i>Weissella</i> spp., <i>P. ethanolidurans</i> , <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp	(Breidt <i>et al.</i> , 2013a; Medina <i>et al.</i> , 2016a; Pérez- Díaz <i>et al.</i> , 2016)
Other fermented vegetables	<i>Enterococcus thailandicus</i> E. <i>casseliflavus</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. mesenteroides</i> , <i>W. hellenica</i> . <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. citreum</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>P. ethanolidurans</i>	(Breidt <i>et al.</i> , 2013b; Tamminen <i>et al.</i> , 2004; Chen <i>et al.</i> , 2012; Yu <i>et al.</i> , 2012; Wouters <i>et al.</i> , 2013; Elmaci <i>et al.</i> , 2015; Reina <i>et al.</i> , 2015)

Figura 5 Specie di LAB identificate nei principali vegetali fermentati durante la fermentazione spontanea (J. bautista -Gallego *et al.*, 2020)

I batteri lattici eterofermentanti che operano nelle prime fasi della fermentazione, sono in grado di utilizzare gli zuccheri presenti nel substrato e metabolizzarli con produzione di acido lattico, acido acetico, etanolo e CO<sub>2</sub>. La fermentazione porta alla formazione di acidi che abbassano il pH del mezzo, e rallentano lo sviluppo delle specie acido-sensibili. Essi, infatti, nella loro forma in dissociata, penetrano nel citoplasma della cellula, si dissociano, abbassano il pH al di sotto di 4,6 e inibiscono l'attività enzimatica e la vitalità dei microrganismi gram- negativi e altri indesiderati, e creano le condizioni selettive ideali per la proliferazione di altri LAB. Si susseguono dunque nel tempo differenti specie di LAB, infatti, Raggiunte concentrazioni di NaCl superiori al 3% si sviluppano omofermentanti e eterofermentanti facoltativi; Gli omofermentanti, fermentano gli zuccheri presenti producendo esclusivamente acido lattico. Gli eterofermentanti facoltativi invece, dalla fermentazione degli zuccheri producono esclusivamente acido lattico in caso di presenza di esosi e acido lattico ed acetico in presenza di zuccheri pentosi. Alcune specie di eterofermentanti e eterofermentanti facoltativi sono in grado di produrre acidi volatili (acido formico e succinico). Per il processo fermentativo è possibile seguire due vie: uso delle colture starter, inoculando lattobacilli selezionati, oppure la fermentazione spontanea, creando un ambiente selettivo affinché i LAB prendano il sopravvento sugli altri microrganismi presenti.

### 2.1.1 I parametri ambientali che influenzano la fermentazione spontanea

Nella maggior parte dei casi per la fermentazione dei vegetali si predilige una fermentazione spontanea svolta da microrganismi indigeni intrinseci delle materie prime; pertanto, avremo un maggiore biodiversità del microbiota risultante a fine processo. Il microbiota responsabile del processo fermentativo è influenzato dagli ingredienti, dalle tecniche utilizzate e dai fattori ambientali.

I parametri che condizionano la microflora microbica presente e l'andamento del processo fermentativo sono:

- **Alimento.** Ogni vegetale possiede una microflora unica.
- **Taglio e lavorazione.** Fermentare una verdura intera o sottoposta a processi di taglio porta ad un risultato differente. Più si processa un prodotto vegetale, più sarà veloce la fermentazione perché aumenta la superficie su cui possono lavorare i microrganismi. La velocità della fermentazione è inoltre strettamente correlata al sapore, più è veloce più il sapore sarà forte.
- **Ossigeno.** È importante creare condizioni di anaerobiosi.
- **Salinità.** La scelta della concentrazione di sale è un fattore importantissimo; crea una condizione ambientale tollerata da numerosi LAB e inospitale per tanti altri microrganismi indesiderati. Diversi sono i metodi di salatura; a secco nel caso in cui la verdura da fermentare rilasci sufficiente liquido da essere ricoperta; salamoia nel caso in cui la verdura venga fermentata in una soluzione di acqua e sale.
- **Temperatura.** Attraverso la temperatura di fermentazione si vanno a creare condizioni più o meno favorevoli a seconda della classe microbica considerata. Maggiore è la temperatura, più veloce sarà il processo di fermentativo, è opportuno però fermentare ad una temperatura di 20-22 gradi, temperature alte di 28-30 gradi portano a fermentati dal sapore molto forte e non sempre piacevole.
- **Zucchero.** Possono essere fermentati o i soli zuccheri naturalmente presenti nel vegetale, o se ne aggiungono di ulteriori. Bisogna però prestare attenzione all'aggiunta degli zuccheri, perché maggiore è la quantità presente, più le condizioni saranno favorevoli ai lieviti che possono entrare in competizione con i batteri lattici e ciò porta ad un risultato fermentativo non ottimale.
- **Tempo.** Il tempo di fermentazione determina le caratteristiche del prodotto.

Tuttavia, si hanno differenti risultati in funzione della temperatura di fermentazione:

- ❖ **4-10°C:** Temperatura ottimale per creare le stringenti condizioni selettive.

- ❖ **10-18°C:** La bassa temperatura porterà la verdura a fermentare molto lentamente. Se si fermenta a queste temperature, bisogna attendere fino a 2-3 mesi per una stabilizzazione della microflora; il sapore ottenuto solitamente è molto delicato. Per quanto riguarda la salinità, è consigliabile abbassare leggermente il contenuto di sale.
- ❖ **20-22°C** Temperatura ideale per fermentare qualunque verdura, sono sufficienti 14-21 gg per ottenere una microflora stabile e un sapore acido ma non troppo pungente o complesso.
- ❖ **24-26 °C** A queste temperature la fermentazione risulterà molto rapida, ci sarà una proliferazione incontrollata anche di molti gruppi microbici indesiderati, ad esempio i lieviti di Kahm. Il sapore può essere troppo intenso, aumentare significativamente la salinità può aiutare a mantenere sotto controllo il processo fermentativo.
- ❖ **28-30 ° C** Temperatura molto alta per fermentare le verdure. La fermentazione è molto veloce e si raggiunge un'elevata acidità in 7-10 gg. Sono spesso presenti sapori pungenti e complessi, sapore di fermentato.

È possibile modulare la salinità in funzione della temperatura di fermentazione:

- ✓ Aumento della temperatura di 1-2°C, aumentare la salinità di 0.2-0.3%
- ✓ Aumento della temperatura di 3-5 °C, aumentare la salinità di 0.4-0.8%
- ✓ Diminuzione della temperatura di 1-2 ° C, diminuire la salinità di 0.2-0.3%
- ✓ Diminuzione della temperatura di 3-5° C, diminuzione della salinità di 0.4-0.5 %

La scelta del tipo e della concentrazione di sale è un fattore fondamentale per la riuscita del processo fermentativo in quanto va ad influenzare la fuoriuscita del liquido cellulare proveniente dalle cellule del prodotto vegetale. Le verdure, infatti, sono composte principalmente da acqua, che in molti casi per la struttura del vegetale stesso è difficile estrarre, il fenomeno che provoca il rilascio dell'acqua nei vegetali è l'osmosi, ovvero un processo di diffusione di un solvente (acqua), da un ambiente meno concentrato ad un ambiente più concentrato di soluti, attraverso una membrana semipermeabile (che fa passare l'acqua). Per favorire la fuoriuscita dei tessuti vegetali, si può procedere o con taglio e poi salatura o aumentare la superficie di contatto del sale con la verdura. Il sale presente sulla superficie dell'ortaggio richiamerà l'acqua all'esterno e creerà la salamoia sufficiente a ricoprire le verdure durante la fermentazione. Uno dei fattori che influenza il rilascio del liquido da parte di una verdura è la concentrazione di sale, maggiore è la concentrazione di sale, più acqua verrà estratta e maggiore sarà la salinità finale. Il taglio della verdura in pezzi molto piccoli può aumentare la superficie di contatto fra il sale e la verdura, facilitando l'osmosi e rendendo il processo più veloce. Anziché tagliare la verdura si può procedere applicando una pressione, es. mettendo sottovuoto la verdura, la pressione di contatto aumenta notevolmente e il fenomeno è più veloce. Il sale, dunque oltre a creare

un ambiente selettivo per favorire la fermentazione lattica, permette di mantenere la struttura delle verdure che altrimenti diventerebbero troppo morbide e molli. Al fine di fermentare le verdure si possono applicare due principali metodi di salatura:

- Salatura a secco, nel caso in cui la verdura rilascia sufficiente liquido
- Salamoia, in una soluzione di acqua e sale.

In funzione della natura del vegetale e della sua capacità di rilasciare acqua si prediligerà la salatura a secco o in salamoia. Se è una verdura che per natura è già propensa a cedere acqua possiamo sfruttare il metodo a secco, altrimenti salamoia.

(Sacco F. 2021)

La conoscenza di ogni variabile ecologica, che possa influenzare la flora microbica del vegetale, è essenziale per il controllo dei processi fermentativi. Le colture starter, la temperatura, il pH, l'atmosfera controllata, concentrazione di NaCl, costituiscono i fattori che attualmente ci consentono di guidare la fermentazione lattica dei vegetali.

Considerando il processo fermentativo nel suo complesso non deve essere sottovalutata la presenza di lieviti, microrganismi in grado di competere con i batteri lattici; infatti, se nel substrato c'è disponibilità di zuccheri, essi possono sviluppare e condurre una seconda fermentazione. Come i batteri lattici anche i lieviti vengono selezionati durante tutto il processo fermentativo e i fattori di selezione sono la concentrazione di NaCl e la tecnologia applicata. Le specie più diffuse sono *Candida*, *Pichia*, *Debaryomyces*, e *Saccharomyces*. I lieviti degradano parzialmente l'acido lattico e producono etanolo, anidride carbonica ed aromi, quali diacetile ed acetoino nel mezzo. La loro presenza può in alcuni casi dar luogo ad alterazioni, quali rammollimenti, dovuti alla rottura enzimatica dei tessuti, e rigonfiamenti, dovuti alla formazione di gas. (Cocolin L.S.et al., 2007). Per ottenere una fermentazione ottimale è opportuno favorire l'attività dei microrganismi che svolgono un ruolo positivo nel processo, bloccando la crescita dei microrganismi patogeni o degradativi. Le prime fasi fermentative non a caso, sono le più importanti per la selezione dei microrganismi e l'avvio della corretta fermentazione. Per molti vegetali è essenziale che il processo fermentativo sia condotto esclusivamente da batteri lattici. (Ottaviani F. 2001)

## 2.2 L'uso delle colture starter

È difficile mantenere sotto controllo la fermentazione spontanea dei vegetali, poiché bisogna tener conto delle dimensioni, della variabilità, del contenuto di nutrienti, della microflora naturalmente presente nei vegetali. Non potendo intervenire con trattamenti di risanamento termico si tende a ricorrere all'utilizzo di colture starter, colture microbiche selezionate e dotate di caratteristiche fermentative maggiormente desiderabili, e caratterizzate da un'efficiente capacità di colonizzare nella matrice vegetale e prendere rapidamente il sopravvento. Gli starter ricercati sono colture produttrici di sostanze antimicrobiche come batteriocine, colture che abbiano un metabolismo omofermentativo che comporti un rapido consumo degli zuccheri fermentescibili e colture che si adattino alle condizioni di temperatura, pH e concentrazioni di NaCl. (Ottaviani F 2001)

Caratteristiche	Crauti	Cetrioli	Olive	Succhi vegetali*
Crescita rapida	++	++	++	+
Eterofermentanti	++	-	-	-
Omofermentanti	-	++	++	++
Tolleranza al sale	+	++	++	0
Attività acidificante e resistenza all'acidità	++	++	++	+
Crescita a basse temperature	++	++	++	0
Ridotta richiesta fattori di crescita	0	0	+	0
Riduzione di nitrati e nitriti	+	0	0	++
Produzione di L (+) lattato	+	0	0	+
Produzione di bioammine	-	-	-	-
Produzione di destrani	-	-	-	-
Attività pectinolitica	-	-	-	-
Formazione precursori di aroma	++	++	+	0
Produzione batteriocine	+	+	+	0
Resistenza ai batteriofagi	0	0	0	++

Legenda: ++ = importante, + = utile, 0 = irrilevante, - = dannoso, \*escluso succo di crauti

Figura 6 Caratteristiche di rilevante importanza tecnologica ricercate in colture starter da impiegare nella fermentazione dei vegetali (Ottaviani F. 2001)

Una coltura starter deve essere in grado di prevalere sulla microflora autoctona, e di resistere al congelamento o alla liofilizzazione, processi impiegati per produrre le colture starter stesse. Molte di queste colture starter appartengono al genere *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. Tra le caratteristiche ricercate, i ceppi selezionati non devono produrre amine biogene, non sviluppare sapori

e odori sgradevoli e non possedere attività pectinolitica. Tra le attività tecnologiche ricercate, la coltura starter deve preferibilmente avere caratteristiche funzionali come quella di esercitare attività biologiche benefiche per l'uomo, come riduzione del colesterolo, attività inibitoria verso microrganismi degradativi, capacità di resistere e sopravvivere alle condizioni acide del tratto gastro-intestinale, attività fitasica, capacità di produrre esopolisaccaridi, grande attività immunomodulatoria e capacità di produrre biofilm. L'utilizzo di colture starter multifunzionali (tecnologiche + probiotiche) può portare ad un migliore controllo del processo fermentativo, minori perdite economiche, minori sprechi causati da un rapido deterioramento dei vegetali, qualità, sicurezza del prodotto e alto valore funzionale. I microrganismi selezionati devono essere naturalmente in grado di colonizzare la matrice vegetale fermentata e dominare il microbiota indigeno presente in diverse condizioni ambientali e di conservazione, garantendo il livello minimo raccomandato di cellule vitali alla fine della shelf-life del prodotto stoccato ( $10^6 - 10^7$  UFC/ml). I microrganismi selezionati devono garantire al consumatore un miglioramento delle caratteristiche sensoriali del prodotto fermentato e devono essere economicamente sostenibili per le aziende, quindi, devono garantire una rapida acidificazione della matrice alimentare a basse temperature. È stato dimostrato come l'utilizzo di queste colture permette di accelerare i processi di fermentazione, e di raggiungere un corretto livello di acidità nel prodotto fermentato in modo da inibire i microrganismi indesiderati, in particolare, *Enterobacteriaceae* il cui sviluppo è percepito come deterioramento. (Bautista-Gallego J. 2020 et al.,).

Possono essere impiegate due tipologie di colture starter autoctoni o alloctoni; per starter autoctoni si intende ceppi isolati precedentemente dalla stessa matrice vegetale cruda o fermentata e riutilizzati nella fermentazione della stessa matrice vegetale. Gli starter alloctoni invece sono isolati da matrici differenti da quelle in cui sono successivamente utilizzati come starter di fermentazione. (Di Cagno R. 2013 et al.,)

Tra le specie autoctone più isolate e selezionate, come potenziali starter c'è sicuramente il *Lactobacillus plantarum* microrganismo dotato di ottime caratteristiche tecnologiche e di resistenza a condizioni avverse.

Generalmente è preferibile utilizzare degli starter autoctoni. Infatti, sono state riscontrate delle differenze nelle prestazioni nei ceppi autoctoni e alloctoni:

In diversi studi sono stati confrontati gli starter alloctoni di *L. plantarum* isolati da olive verdi e utilizzati per fermentare succo di pomodoro e gli starter autoctoni selezionati, e si è notato come gli starter alloctoni hanno fasi di crescita e acidificazione molto più lunghe.

In altri vegetali (carote, zucchine ecc..) l'utilizzo di starter autoctoni selezionati e appartenenti alle specie *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Pediococcus pentosaceus*; ha mostrato una rapida acidificazione e un rapido consumo di carboidrati con una spiccata inibizione di lieviti e *Enterobacteriaceae*. Si sono riscontrate delle differenze anche per quanto riguarda il contenuto di Vitamina C, il colore, texture e proprietà sensoriali. I ceppi autoctoni, infatti, hanno influenzato positivamente il colore e la texture dei prodotti. Inoltre, hanno mostrato una maggiore adattabilità alle stringenti condizioni ambientali, sono rimasti vitali durante 60 giorni di conservazione, mantenendo anche un elevato carico cellulare, in linea con quanto richiesto per potenziali bevande probiotiche. Specie autoctone come *Lactobacillus pentosus* e *Lactobacillus plantarum* sono state utilizzate come starter per la fermentazione delle olive e si è notato come rispetto alla normale fermentazione spontanea portassero ad una rapida inibizione delle *Enterobacteriaceae*. L'impiego di un ceppo autoctono di *Lactobacillus pentosus* come starter fermentativo ha portato ad una rapida acidificazione nella salamoia a differenza di una fermentazione spontanea che per raggiungere gli stessi di valori di pH ha richiesto circa 14 giorni di fermentazione. Ceppi autoctoni di *Lactobacillus sakei* sono invece stati selezionati per la loro caratteristica di produrre una minore quantità di acidi organici. (Di Cagno R. et al., 2013).

### **2.3 I criteri per la selezione degli starter autoctoni**

Numerosi sono i vantaggi nell'impiego di starter autoctoni nella fermentazione di frutta e verdura. È possibile, infatti, ottenere prodotti con spiccate proprietà tecnologiche (shelf-life prolungate, caratteristiche sensoriali migliori) e funzionali (i microrganismi autoctoni possono avere caratteristiche probiotiche e possono produrre postbiotici ovvero i metaboliti con effetti benefici per la salute del consumatore tra cui acidi grassi a corta catena, composti polifenolici, vitamine, enzimi, acido gamma-ammino-butyrico, peptidi e endo, eso polisaccaridi). I criteri adottati per la selezione degli starter autoctoni sono quelli stabiliti dall'organizzazione mondiale della sanità (OMS), e sono generalmente divisi in 3 categorie: tecnologici, sensoriali, nutrizionali. Ovviamente i ceppi selezionati devono possedere come prerequisito quello della sicurezza. Tuttavia, i batteri lattici data la loro lunghissima storia d'uso nelle preparazioni alimentari sono generalmente riconosciuti come sicuri (GRAS) dai principali enti regolatori come EFSA e FDA. Deve comunque essere dimostrato che non producano ammine biogene e che non abbiano acquisito antibiotico resistenza. Tra i requisiti tecnologici, l'adattamento ambientale, rappresenta quello principale, segue poi la tolleranza ad alte concentrazioni di fenoli che sono particolarmente abbondanti in alcuni vegetali. Devono essere in grado di abbassare rapidamente il pH fino a valori di almeno 4.5, questo è indispensabile per inibire



i microrganismi indesiderati fin dall'inizio della fermentazione. La produzione di perossido di idrogeno è un altro criterio da tenere in considerazione poiché è un forte agente ossidante che può reagire con materiale organico, come i tessuti vegetali, e causare una perdita del colore del prodotto. La sintesi di EPS è un'altra caratteristica importante in quanto migliora la texture al prodotto. Per alcuni vegetali fermentati è richiesta una lieve acidificazione es. il kimchi (Di Cagno R et al., 2013).

Criteria	Metabolic traits
Pro-technological	Growth rate Acidification rate Salt tolerance Growth at low values of pH Tolerance to low values of pH Growth at low temperature Completeness of fermentation Malolactic fermentation Tolerance to phenols Synthesis of antimicrobial compounds Synthesis of hydrogen peroxide Pectinolytic activity
Sensory	Hetero-fermentative metabolism Synthesis of aroma compounds or their precursors
Nutritional	Synthesis of biogenic compounds Synthesis of exo-polysaccharides Increase of the antioxidant activity Synthesis of biogenic amine

Figura 7 Principali criteri per la selezione di starter autoctoni da utilizzare per la fermentazione di prodotti vegetali. (Di Cagno R. et al., 2013)

Bisogna tener conto anche delle trasformazioni chimiche che avvengono nel prodotto vegetale durante il processo fermentativo condotto da questi starter autoctoni (Torres S. et al., 2020). Durante la fermentazione il vegetale subisce una serie di trasformazioni biochimiche ad opera dei microrganismi: c'è un accumulo di prodotti finali del metabolismo microbico: principalmente acidi organici e alcoli. Tra gli acidi organici troviamo acido lattico, acetico, malico, succinico, propionico che sono responsabili dell'abbassamento del pH. A fine processo nel substrato è possibile trovare composti organici volatili in piccole quantità, prodotti non solo dai microrganismi ma anche dagli enzimi nativi del vegetale, tra questi diacetile, acetaldeide e composti volatili solforati. I composti volatili solforati derivano dai prodotti di idrolisi dei tioglicosidi ad opera della mirosinasi un enzima presente nei tessuti vegetali che idrolizza i tioglicosidi in D-glucosio, solfati e agluconi che a loro volta vengono degradati in composti volatili come isotiocianati, tiocianati, nitrili e tioni contenenti azoto e zolfo. Questi composti volatili sono spesso responsabili del carattere amaro di molti vegetali. (Cocolin L. S. et al., 2007)

### 2.3.1 Proprietà funzionali associate a batteri lattici autoctoni di prodotti vegetali

Un gran numero di batteri lattici autoctoni, isolati dai vegetali presentano molteplici proprietà funzionali. Ceppi autoctoni appartenenti alle specie come, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*; sono in grado di superare agevolmente la barriera gastrica e di arrivare vitali all'intestino. Aderendo alla mucosa intestinale, riescono a combattere gli agenti patogeni riequilibrando la flora microbica, producendo composti antimicrobici e esercitando effetti benefici per la salute del consumatore. Sono importanti produttori di EPS, che migliorano la colonizzazione gastrointestinale dei batteri probiotici e svolgono quindi anche un ruolo di prebiotici. Diversi batteri probiotici producono idrolasi degli acidi biliari (BSH) che aiutano a ridurre il colesterolo. (Patel A. et al., 2014). Questi starter contribuiscono ad incrementare il contenuto di Vitamina C negli alimenti e all'aumento di composti antiossidanti come composti fenolici e betalaine. Gli starter autoctoni possono favorire la produzione di composti ad attività benefica ed antitumorale come nei broccoli fermentati in cui è stato riscontrato un aumento della concentrazione di glucosinolati (glucoiberina, progoitrina e glucorafanina) a seguito di processo fermentativo. È stata associata a batteri lattici autoctoni di vegetali anche una, ceppo dipendente, capacità ipoglicemizzante e ipolipidemizzante. È stato dimostrato come i microrganismi probiotici possono esercitare i loro effetti metabolici attraverso la produzione di metaboliti attivi quali (acidi grassi a catena corta, composti fenolici, peptidi) che siano in grado di modulare il sistema immunitario e il microbiota intestinale. (Di Cagno R. et al., 2013) Inoltre i batteri lattici proteggono gli alimenti dal deterioramento, grazie alla produzione di acido lattico, acetico, acqua ossigenata, diacetile. grassi, acidi grassi a corta catena, acido fenilattico e batteriocine, ottimi bioconservanti. Le batteriocine (nisina, diplococcina, acidofilina, bulgarican, Elveticina, Lattacina e Plantaricina). sono peptidi a rilascio extracellulare, con azione battericida e batteriostatica principalmente verso batteri gram positivi (Sukirah A. R. et al., 2017)

## CAPITOLO 3

### VEGETALI FERMENTATI

Le verdure fermentate hanno da sempre ricevuto attenzione da parte dei consumatori, soprattutto nei paesi sviluppati, grazie al riconoscimento dei loro effetti benefici. In realtà già in passato gli alimenti fermentati erano parte della nostra cultura gastronomica, la fermentazione era principalmente utilizzata come metodo di conservazione, per preservare quei vegetali non sempre disponibili a causa delle condizioni climatiche e per assenza di tecniche di refrigerazione, pastorizzazione o congelamento. Successivamente la fermentazione divenne una strategia vincente, adoperata per garantire una maggiore sicurezza al prodotto. I prodotti vegetali fermentati furono considerati dei veri e propri prodotti tradizionali. Nella cultura moderna con l'impiego di mezzi per la conservazione degli alimenti, non si fermenta più per conservare ma per migliorare la funzionalità degli alimenti arricchendo anche il nostro microbiota intestinale. Numerosi studi scientifici affermano che è consigliabile avere un microbiota vario e ricco di batteri lattici vivi per migliorare il proprio stato di salute e il consumo di vegetali fermentati è in grado di favorire ciò. Mancano fonti storiche certe sulle origini delle verdure fermentate, ma si ipotizza una prima scoperta in Oriente e una successiva diffusione in Occidente. Al giorno d'oggi, il prodotto tradizionale coreano, il kimchi rappresenta l'alimento vegetale fermentato più popolare in assoluto. I prodotti vegetali fermentati più comuni in Europa e Nord America (Canada e Stati Uniti) sono i crauti, cetrioli e olive. Molte delle verdure fermentate condividono un processo generale che richiede fasi di salatura e acidificazione. Tra i microrganismi responsabili della fermentazione, i batteri lattici sono i più rilevanti con importanti benefici organolettici, qualitativi e di sicurezza. Oggi è possibile acquistare verdure fermentate non pastorizzate anche in alcuni negozi, si tratta infatti di una novità molto recente che sta iniziando a prendere piede anche in Italia. (Varzakas T. al., 2017).



*Figura 8 Esempi di cavolo intero e fermentato*

Product	Main ingredients	Main lactic acid bacteria involved	Country
Sauerkraut	Cabbage, salt	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Europe, USA
Cucumbers	Cucumbers, vinegar, salt	<i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>L. plantarum</i>	USA, Asia
Capers	Capers, water, salt	<i>L. plantarum</i> , <i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Lactobacillus paraplantarum</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>P. pentosaceus</i>	Mediterranean Countries (Greece, Italy, Spain, Turkey, Morocco)
Kimchi	Cabbage, radish, salt, spices and other vegetables (ginger, pepper, garlic, onion)	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc kimchii</i> , <i>Leuconostoc citreum</i> , <i>Leuconostoc gasicomitatum</i> , <i>Leuc. pseudomesenteroides</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus maltaromicus</i> , <i>Lactobacillus bavaricus</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Weissella confusa</i> , <i>Weissella kimchii</i> , <i>Weissella koreensis</i>	Turkey, Morocco) Korea
Dhamuoi	Cabbage and other vegetables	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>L. plantarum</i>	Vietnam
Burong mustala	Mustard	<i>L. brevis</i> , <i>Pediococcus</i> sp.	Philippine
Dakguadong	Mustard leaf, salt	<i>L. plantarum</i>	Thailand
Gundruk	Local cabbages, mustard leaves, cauliflower leaves,	<i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> , <i>Leuc. pseudoplantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>P. pentosaceus</i>	Eastern Himalaya
Sinki	Radish roots	<i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuconostoc fallax</i>	Eastern Himalaya
Khalpi	Cucumber	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuc. fallax</i> , <i>Pediococcus</i> sp.	Eastern Himalaya
Pak-Gard-Dong	Mustard leaves	<i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i>	Thailand
Turşu	Cucumbers, cabbage, green tomatoes, green peppers and other vegetables	<i>L. plantarum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>L. brevis</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>E. faecalis</i>	Turkey
Şalgam	Black/violet carrots, turnip, bulgur flour, sourdough, salt and water	<i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i>	Turkey
Hardaliye	Red grape juice, black mustard seeds	subsp. <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>L. caseipseudoplantarum</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. acetotolerans</i> , <i>L. sanfranciscensis</i>	Turkey
Jiang-gua	Cucumbers, salt, sugar, vinegar, soy sauce	<i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Weissella hellenica</i> , <i>Weissella cibaria</i>	Republic of China

Figura 9 Esempi di frutta e verdura fermentata emergenti e tradizionali, principali batteri lattici coinvolti nel processo fermentativo e aree di produzione ( Di Cagno R. 2012)

### 3.1 Fermentazioni in oriente: il kimchi

Con kimchi non si intende un solo alimento ma un gruppo di alimenti, che trova la sua origine in Corea del Sud. È prodotto solitamente con cavolo cinese (*Brassica rapa* subs. *Chinensis*) o altri tipi di cavolo a cui possono essere aggiunti altri ingredienti facoltativi come ravanelli e cetrioli e ingredienti che devono essere assolutamente presenti come peperoncino, cipolla o cipollotto ed aglio (ingredienti che oltre ad insaporire forniscono una serie di oli essenziali e di molecole ad attività antimicrobica che riescono a mantenere sotto controllo la flora microbica alterativa), zenzero, salsa di pesce e soprattutto il sale che guida il processo fermentativo ed è fondamentale per la conservazione del prodotto. L'elevato e non controllato contenuto di sale nel kimchi così come in altre verdure fermentate potrebbe essere associato ad un aumento del rischio di ipertensione, la Corea però da maggio 2017 ha messo in atto un piano per ridurre il contenuto di sodio, etichettando gli alimenti con le informazioni nutrizionali e indirizzando i consumatori nella scelta del prodotto. (Hwang J. et al., 2017) I metodi di preparazione del kimchi differiscono a seconda della varietà del cavolo, della raccolta, delle condizioni climatiche e degli ingredienti utilizzati. Il profilo aromatico finale è determinato dagli ingredienti, i condimenti, l'aggiunta di sale e spezie e la fermentazione. In generale ha un sapore aspro, dolce, pungente e viene servito freddo. Considerando anche le produzioni a livello domestico, in Corea vengono prodotti circa 190 diversi tipi di kimchi. La produzione annuale di kimchi in Corea supera 1,5 miliardi di tonnellate, questo perché è un prodotto spesso prodotto a livello domestico da consumatori con metodi casalinghi, con l'utilizzo di materiale non sterile, che rende

molto difficile la standardizzazione. Questo può essere sia un aspetto svantaggioso per il consumatore in quanto non si avrà mai la stessa qualità di prodotto, poiché il prodotto risentirà molto delle condizioni ambientali; ma anche un aspetto vantaggioso per il consumatore in quanto con una fermentazione non standardizzata e non guidata si avrà una microflora molto più complessa, da cui si possono trarre numerosi effetti benefici per la salute. La produzione di questo alimento non necessita di un trattamento termico, non è quindi prevista la pastorizzazione; zenzero, aglio e peperoncino fungono da antimicrobici naturali. Il consumo pro-capite si attesta intorno ai 150-250 g al giorno. Di recente è stato inserito tra i 5 alimenti più salutari al mondo. (E. Özgül et al., 2012).



Figura 10 Brown Lynn N. (2014) "Uno dei cibi sani, il kimchi"

### 3.1.1 Processo fermentativo

La fermentazione del kimchi è un processo piuttosto complesso, si tratta di una fermentazione lattica fortemente dipendente dalla temperatura, nella fermentazione del kimchi è preferita la bassa temperatura, per prevenire la produzione di un'elevata quantità di acidi e una maturazione eccessiva che comporta caratteristiche organolettiche non ottimali. I microrganismi che si sviluppano per primi sono le *Enterobacteriaceae*, indici di una possibile contaminazione oro-fecale, sviluppano per prime ma poi scompaiono poiché sono poco resistenti agli stress, in particolare alla diminuzione del pH. Utilizzano gli zuccheri e abbassano il pH creando un ambiente che è via via sempre più favorevole per lo sviluppo di altri batteri, tra cui i microrganismi del genere *Leuconostoc* (*Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc lactic*) che sono generalmente più resistenti agli acidi delle *Enterobacteriaceae* ma non così tanto da riuscire a guidare la fermentazione

nel lungo periodo. *Leuconostoc* è in grado di sviluppare, e in condizioni di anaerobiosi produce acido lattico e acetico e anidride carbonica; l'assenza di ossigeno aiuta a preservare il colore delle verdure fermentate e stabilizza l'acido ascorbico (vitamina C) presente nelle verdure. Quando il pH scende tra 4,6 e 4,9 il genere *Leuconostoc* viene inibito ma la fermentazione continua ad opera dei lattobacilli (*Lactobacillus brevis*, *Lactilactobacillus sakei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*) che sono fortemente acidofili; quindi, resistono bene agli acidi e prendono il controllo del processo fermentativo. Durante tutta la fermentazione sono presenti microrganismi del genere *Weissella*, vantaggioso perché molti microrganismi appartenenti a questo genere sono in grado di produrre molti componenti con effetti benefici per la salute e in grado di migliorare la consistenza del prodotto.

I fattori che influenzano la fermentazione del kimchi sono i microrganismi endogeni presenti nei vegetali, i carboidrati fermentabili, pH, temperatura e sale. La salatura è un passaggio fondamentale per il gusto, consistenza, fermentazione e conservazione. La salatura a basse temperature conferisce un sapore migliore rispetto alla salatura a temperature più elevate. È preferibile nel prodotto finale una concentrazione di sale del 3%, una concentrazione di sale inferiore al 2,2% comporta una fermentazione troppo rapida che porta a una rapida acidificazione e tessuti troppo molli nel cavolo. Dal punto di vista nutrizionale, il kimchi fermentato diventa una fonte di macro e micronutrienti, antiossidanti, flavonoidi, fibre alimentari, vitamine e altri nutrienti.

Il processo di produzione del kimchi prevede:

- Preparazione della salamoia al 6%
- Taglio del cavolo
- Immersione del cavolo in salamoia con il 15% di sale per 5-10h.
- Lavaggio del cavolo per regolare il contenuto di sale
- Aggiunta degli ingredienti essenziali come aglio, zenzero, peperoncino
- Aggiunta degli ingredienti facoltativi come ravanelli e cetrioli
- Mescolare e distribuire il condimento tra le foglie.
- Arrotolare il cavolo condito e posizionarlo sul fondo del vaso Oggi o in un vaso di terracotta dove avverrà la fermentazione.



*Figura 11 Vaso Onggi e vasi di terracotta utilizzati nella preparazione del kimchi*

- Aggiungere sul vaso di terracotta un peso in modo da garantire condizioni anaerobiche.
- Pressatura e copertura del vaso di terracotta

L'utilizzo dell'Onggi in terracotta per le fermentazioni ha mostrato un risultato migliore dal punto di vista organolettico e della presenza dei microrganismi benefici, rispetto all'uso di altri materiali. Infatti, la porosità della terracotta crea le condizioni ideali per la crescita dei batteri lattici responsabili della fermentazione, facilitandone il processo e potenziando gli effetti salutari. (Kozo I. et al., 1998)

- Fermentazione per 1-2 mesi in inverno a basse temperature 2-6 ° C (il prodotto fermentato avrà un gusto ottimale a un pH di 4-4.5 e un'acidità di 0.5-0.6 (espresso come % equivalenti di acido lattico)
- consumo per 3-4 mesi fino a primavera

Dopo la fermentazione il kimchi viene lasciato maturare per diverse settimane sotto condizioni di refrigerazione. Non esiste una sola ricetta, processo di produzione, ma ogni famiglia coreana, ha una sua ricetta specifica che trasmette di generazione in generazione. In Corea, esistono più di 200 ricette diverse di kimchi, a dimostrazione che è impossibile determinare un procedimento unico e riconosciuto da tutti. (Varzakas T. et al., 2017).





Figura 12 Faith Y. et al., (2016) Diagramma di flusso della fermentazione del kimchi.

### 3.1.2 Effetti benefici associati al consumo del kimchi

Il Kimchi contiene vari componenti che promuovono la salute, tra cui  $\beta$ -carotene, clorofilla, vitamina C e fibra alimentare. Il kimchi, infatti, contiene carboidrati non digeribili che passano attraverso l'intestino crasso, fibre come cellulosa, pectine, emicellulosa, polifruuttosio e lignine che costituiscono la parete cellulare del vegetale e possono considerarsi prebiotici che stimolano la crescita e l'attività dei batteri benefici presenti nell'intestino. Il consumo di kimchi comporta l'introduzione nella dieta di moltissimi batteri lattici potenzialmente in grado di colonizzare l'intestino e diventano parte integrante del microbiota intestinale svolgendo effetti benefici per la salute.

Al kimchi e ai microrganismi responsabili della fermentazione sono associate molteplici attività:

- Attività **anti-mutagenica** (*L. plantarum* nei confronti dell'aflatossina B1.)



- Attività **antiossidante** (*Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella confusa* e *cibaria*) producono esopolisaccaridi che hanno proprietà antinfiammatorie. Uno studio effettuato sui topi ha rilevato che l'assunzione di 200 mg per kg al giorno per 2 settimane ha abbassato i livelli di enzimi correlati all'infiammazione. (Snyder C. 2021).

- Migliora l'attività immunosoppressoria; in uno studio condotto sui topi si è notato come nei topi a cui è stato inoculato un ceppo specifico di *Lactobacillus plantarum* isolato dal kimchi e in altri alimenti fermentati, questi avevano livelli più bassi del fattore di necrosi tumorale marcatore infiammatorio alfa (TNF alfa) rispetto al gruppo di controllo. Da questo si è evinto come la presenza di questi batteri benefici hanno effetti di potenziamento immunitario (Snyder C. Et al., 2021).

- Previene o diminuisce dei **sintomi allergici**
- Inibisce la crescita di *Helicobacter pylori*
- Attività **antidiabetica** (*Weissella confusa* che riduce il contenuto di colesterolo)
- Effetto **antiobesità**, da uno studio effettuato su ventiquattro donne obese a cui è stato fornito quotidianamente per un certo periodo, kimchi, si è rilevato l'impatto benefico del kimchi sui parametri metabolici e gli effetti antiobesità. Il pirosequenziamento del microbiota fecale e le analisi di microarray di campioni di sangue hanno rilevato l'effetto positivo del kimchi sul metabolismo. (Han K. Et al.,2015)

- **Attività antitumorale** (*Weissella cibaria*); inoltre ingredienti presenti nel kimchi come la capsaicina presente nel peperoncino, composti solforati dell'aglio esercitano un effetto antitumorale.

- Produzione di **vitamine** del gruppo B e K (biotina, acido pantotenico, folati, riboflavina, cobalamina e vitamina k). I crauti contengono 5–21 µg / 100 g di folato. I folati sono una serie di composti con l'attività dell'acido folico., È molto importante soprattutto in gravidanza perché protegge il nascituro da malformazioni a carico del sistema nervoso. La carenza di folati è spesso osservata in soggetti con problemi di malassorbimento (legati a morbo celiaco, abuso di alcol, diabete mellito) è stata anche associata a diversi disturbi di salute, come il morbo di Alzheimer, scarse prestazioni cognitive, malattie coronariche, osteoporosi, carcinoma del colon-retto, carcinoma mammario e perdita dell'udito. Il folato aumenta fino a due volte nella produzione del pane e nella fermentazione delle verdure. (Bohkyung K. et al., 2018).

Il kimchi mostra livelli, anche se bassi di cobalamina (vitamina B12), questa vitamina è coinvolta nel metabolismo degli aminoacidi e degli acidi nucleici, ricoprendo quindi un ruolo di rilievo nei processi metabolici del nostro organismo. (Watanabe F.,2014).

- Produzione di **batteriocine** utili per combattere infezioni batteriche (un particolare ceppo A164 presente nelle verdure fermentate produce una batteriocina con effetti molto simili alla nisina, è attivo contro alcuni agenti patogeni di origine alimentare, tra cui *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium*, molto conosciuti e temuti in quanto principali agenti di malattie trasmesse dagli alimenti). (HJ Choi et al., 2000)
- Ceppi di batteri lattici (*Pediococcus pentosaceus*, *Weissella cibaria*, *Lactobacillus sakei* e *Lactobacillus curvatus*) presenti nel kimchi hanno attività **anti-norovirali**; sono in grado, infatti, di ridurre la presenza di murine norovirus-1 (MNV-1), che hanno caratteristiche molto simili al norovirus umano, agente più diffuso e responsabile di gastroenteriti acute di origine batterica (Seo Dong J. et al., 2020).

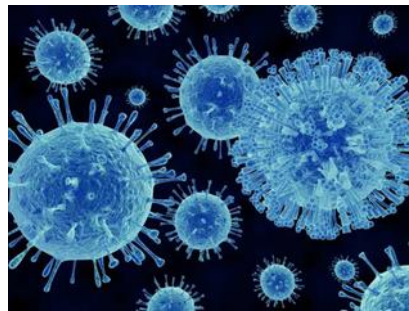


Figura 13 I norovirus responsabili di epidemie di gastroenterite acuta

- **Capacità antivirali** del kimchi che sembrerebbero essere il motivo per il quale non ci furono molti casi di influenza aviaria in Corea durante l'epidemia scoppiata nel 2003 in Sud-Est asiatico. ( <https://www.prnewswire.com>).

## 3.2 Pickeles

Quando si parla di pickeles, si intende una famiglia eterogenea di vegetali fermentati e conservati in salamoia. La fermentazione può coinvolgere diverse parti della pianta. Fanno parte di questa famiglia: cetriolini, melanzane Almagro, peperoncini, olive da tavola e crauti. Questi prodotti sono ottenuti mediante fermentazione lattica da parte dei LAB.

I metodi produttivi prevedono uno schema comune come:

- Preparazione (lavaggio, taglio...)
- Salagione o immersione in salamoia e spurgo dei succhi vegetali ricchi di nutrienti che fanno da substrato per i batteri lattici
- Fermentazione (generalmente di breve durata)
- Immersione in salamoia
- Conservazione

I cetriolini (*Cucumis sativus*) sono tipici dell'area balcanica, ma diffusi in Africa, Asia ed America latina. La diffusione molto ampia permette di avere dei prodotti più o meno standardizzati. Per effetto della salagione o immersione in salamoia (5-7% di NaCl), i cetriolini iniziano ad essudare i loro succhi vegetativi, i nutrienti vengono liberati nel mezzo e questo permette ai batteri lattici di svilupparsi e di iniziare la fermentazione. I cetriolini vengono tagliati, essiccati al sole per 2 giorni e messi in un recipiente di bambù a fermentare per 2-3 settimane e alla temperatura di 20-27°. I LAB indigeni portano il pH a 4.7, vengono poi inoculati *L. plantarum* e/o *P. pentosaceus* e *L. brevis* che acidificano in maniera molto più spinta e portano il pH a 3.5 conferendo una nota acida al prodotto. Per la produzione di cetriolini fermentati si tratta per lo più di una fermentazione spontanea; tuttavia, oggi si ricorre anche all'utilizzo di colture starter per migliorare la consistenza del prodotto. Di solito alla salamoia viene aggiunto cloruro di calcio per garantire croccantezza ai cetrioli. (Di Cagno R. et al., 2012)

I cetriolini subiscono una fermentazione omolattica, tuttavia però può essere prodotta anidride carbonica dalla respirazione dei cetriolini e dalla fermentazione malolattica condotta da *L. plantarum*; la produzione di CO<sub>2</sub> può portare alla formazione di gonfiore indesiderato. Nel tentativo di prevenire la formazione di rigonfiamenti, i cetrioli possono essere spurgati con aria per rimuovere CO<sub>2</sub>. Questa pratica però, può aumentare il rischio di crescita di muffe e lieviti. Durante la fermentazione si producono acidi organici (acido lattico, acetico ecc..) ma anche batteriocine, molecole prodotte dai batteri che hanno un effetto inibente su altri batteri. La velocità con cui avviene la fermentazione

dipende da due fattori importanti la concentrazione di sale e la temperatura. L'aggiunta di sale pone fine alla fermentazione. e i cetriolini vengono conservati nei serbatoi di fermentazione per un anno o oltre, a temperature non al di sotto di 0 ° C. Durante la conservazione si aggiungono concentrazioni di NaCl fino al 10-15% per prevenire i danni da congelamento e mantenere la consistenza desiderata. Prima della vendita, i cetriolini vengono lavati per eliminare il sale in eccesso e poi confezionati in contenitori con apposita soluzione di copertura che contiene acido acetico e spezie in aggiunta alla quantità residua di acido lattico. (Breidt F. et al., 2013).



*Figura 14 Cetriolini fermentati*

Complessi cambiamenti biochimici avvengono durante e dopo la fermentazione;

Le **Olive fermentate** sono considerate un alimento naturalmente funzionale per la loro composizione ricca di composti fenolici. L'oliva è una drupa con mesocarpo carnoso e amaro ed un endocarpo legnoso e spesso, contenente un singolo seme; l'epicarpo è liscio, di modesto spessore e di colore inizialmente verde che evolve con il procedere della maturazione. Il mesocarpo, o polpa, rappresenta il 70-80% dell'intera drupa e presenta un contenuto in acqua del 70%; 14-30% di sostanze grasse; zuccheri (monosaccaridi) 3-6 %; polisaccaridi 3-6 %; azoto proteico (N x 6.25) 1,5-2,2; tannini 1,5-2%; sostanze pectiche 1,5%. Le olive sono naturalmente non edibili per due ragioni principali: 1) la scarsa concentrazione di zuccheri 2) la presenza nel mesocarpo del frutto, di un glicoside, caratterizzato da uno sgradevole sapore amaro l'oleuropeina. La cui idrolisi è indispensabile per rendere commestibili i frutti. Esistono diverse tipologie di olive fermentate, olive verdi da tavola,

olive nere in salamoia e olive mature in scatola. Le tecniche di produzione possono variare, ma l'obiettivo comune è quello di ridurre il quantitativo di oleuropeina e tannini, andando ad effettuare una deamarizzazione. La deamarizzazione delle olive da tavola denominato sistema Sivigliano; viene condotto trattando le olive con (NaOH), prima della fermentazione. Le Olive nere subiscono una lenta fermentazione naturale senza lisciviazione o ulteriore trattamento. Nel sistema sivigliano, l'NaOH idrolizza l'oleuropeina con formazione di glucosio, acido alenolico e diidrossifeniletanolo, composti che vengono eliminati durante i lavaggi. Dopo i lavaggi, le olive vengono salate con NaCl; raggiungendo una concentrazione finale di circa 5-6%, importante per la fermentazione. Il pH a seconda del numero di lavaggi effettuati può essere superiore a 7, di conseguenza la microflora presente comprende, batteri gram-positivi (principalmente del genere *Bacillus*) e batteri enterici gram-negativi. L'uso dell'idrossido di sodio comporta la formazione di acidi organici (ossalico, citrico e malico), i quali hanno una notevole influenza sulla fermentazione poiché, passando in soluzione, originano un sistema tampone, che regola l'andamento del pH durante il processo fermentativo. I LAB che dominano la fermentazione sono *L. plantarum* ma anche alcune specie di lieviti appartenenti ai generi *Candida*, *Pichia*, e *Saccharomyces*. A fermentazione ultimata le olive vengono confezionate tal quali o denocciolate.

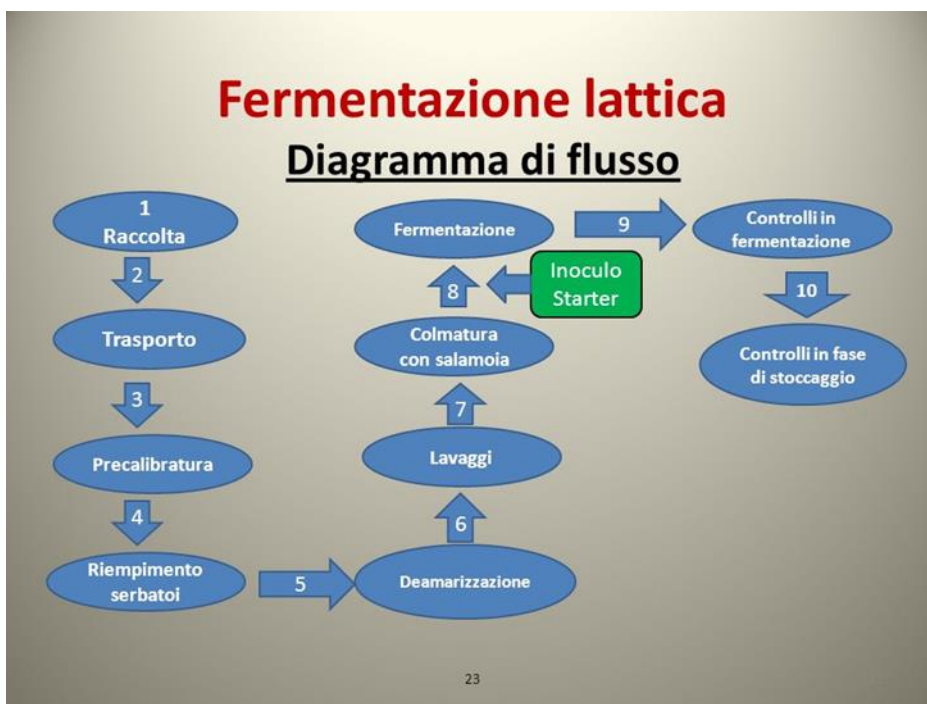


Figura 15 Diagramma di flusso per la produzione di olive fermentate secondo il metodo Sivigliano

La fermentazione naturale delle olive nere, è un processo molto più lento, poiché non prevede il trattamento con NaOH. La fase iniziale, dalla durata di 2-3 giorni, prevede l'immissione delle olive in salamoia, e la fuoriuscita dei soluti, il pH è in genere compreso tra 9 e 11 ed inizia lo sviluppo dei microrganismi. Per azione selettiva del sale, sono i batteri lattici più alotolleranti, omofermentanti ed eterofermentanti, rappresentati da *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis*, a prendere il sopravvento, dando via alla fermentazione primaria che dura circa 15 giorni. Al termine di questa fase il pH raggiunge valori compresi tra 4.5 e 5.0. L'esaurimento degli zuccheri avviene lentamente, e il processo fermentativo si completa dopo 30-60 giorni, portando il pH fino a 3.5. In questa fase la specie più attiva è *L. plantarum* per la sua maggiore acido-tolleranza. Nelle diverse fasi del processo fermentativo, possono svilupparsi anche i batteri propionici, del genere *Propionibacterium*, provocando un aumento dell'acidità volatile, e del pH e la formazione di acido propionico e CO<sub>2</sub>. A fermentazione ultimata possono sviluppare anche i lieviti di tipo ossidativo in grado di utilizzare gli acidi presenti, determinando un aumento del pH e lo sviluppo di specie del genere *Clostridium*. (Breidt F. et al., 2013).

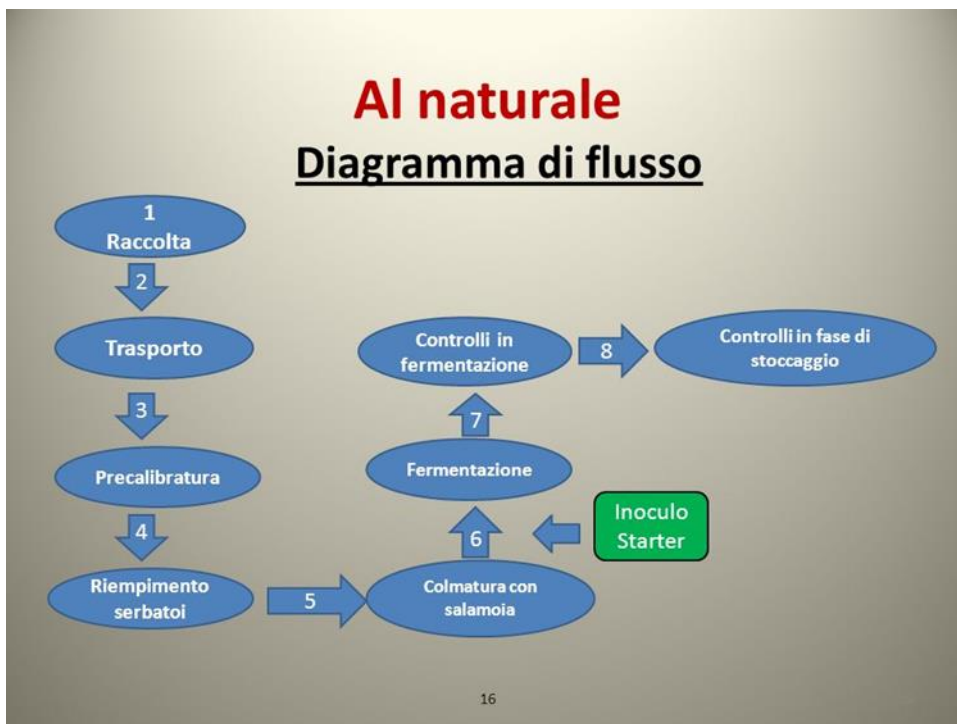


Figura 16 Diagramma di flusso per la produzione di olive nere con fermentazione naturale

### 3.2.1 Il processo fermentativo dei crauti

Il “Sauerkraut” o “crauti” è un prodotto molto simile al kimchi, nei crauti però non si parla di formulazione con altri ingredienti ma solo ed esclusivamente di cavoli cappucci, tipici della Germania, ma diffusi in tutta l’Asia, sottoposti a fermentazione lattica. Questo prodotto è largamente consumato nel Nord Europa, in Francia, negli Stati Uniti, e ben noto anche in Italia. La materia prima per la produzione dei crauti è rappresentata dalle foglie di cavolo (*Brassica oleracea* var. *capitata*) che vengono tagliate in strisce di 2-5 mm e lunghe fino a 20 cm e salate.

(Zambonelli C. et al., 2001).



Figura 17 Sauerkraut o crauti

I primi microrganismi a svilupparsi sono i lieviti, poiché c’è la presenza di aria tra le varie fette di cavolo precedentemente tagliate, questi lieviti producono anidride carbonica. I lieviti hanno un ruolo rilevante nel processo produttivo perché producono un film superficiale sulla massa che impedisce la crescita di muffe e inoltre dalla lisi di questi lieviti si liberano fonti azotate e vitamine che rappresentano fattori nutrizionali essenziali per lo sviluppo dei batteri lattici. I LAB, che dominano la fermentazione dei crauti, sono: *L. plantarum* (eterofermentante facoltativo); *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides/dextranicum* (eterofermentante obbligato); *L. crispatus*; *L. pentosus* (omofermentante) ; *L. brevis* ( eterofermentante obbligato).

I ceppi omofermentanti producono l’85% di acido lattico; mentre gli eterofermentativi producono acido lattico, CO<sub>2</sub>, etanolo e/o acido acetico. (Lihua Fan et al., 2020).



I cavoli cappucci sono preliminarmente sottoposti a mondatura e cernita, vengono lavati e privati del torsolo e delle foglie esterne. Durante queste operazioni la temperatura viene mantenuta tra i 18 e i 25°C. Le strisce di cavolo vengono quindi disposte a strati in tini di legno, alternati con sale (1-3% NaCl), i contenitori vengono chiusi con coperchi di legno in modo non ermetico, in modo che la CO<sub>2</sub> prodotta possa fuoriuscire all'esterno. È possibile applicare una pressione meccanica sul coperchio per facilitare la fuoriuscita di aria e l'estrazione dei liquidi cellulari che contengono gli zuccheri fermentescibili e altri nutrienti utili per la fermentazione. Il processo di fermentazione ha la durata di circa 1-2 mesi. Nei primi tre giorni vi è lo sviluppo di lieviti, funghi, bacilli gram/- negativi come: *Acinetobacter*, *Acetobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Gluconobacter*, *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas*. Il metabolismo di questi microrganismi è di tipo ossidativo fino al completo esaurimento dell'ossigeno presente nella massa. In seguito dopo il 3° giorno parte la fermentazione lattica, inizialmente guidata da specie eterofermentanti rappresentate principalmente da *Leuconostoc mesenteroides* specie in grado di sviluppare più rapidamente alle elevate concentrazioni di sale impiegate e di utilizzare principalmente glucosio e fruttosio, producendo acido lattico, acetico, etanolo, mannitolo e CO<sub>2</sub>. La produzione di acidi permette l'abbassamento del pH, limitando l'attività di microrganismi patogeni ed enzimi pectinesterasici che potrebbero produrre rammollimenti nel vegetale. L'anidride carbonica sostituisce l'aria e crea una condizione di anaerobiosi che contribuisce a prevenire sia l'ossidazione dell'acido ascorbico che l'imbrunimento del cavolo tagliato. Non appena il pH raggiunge valori uguali o inferiori a 4, si sviluppano le specie omofermentanti, appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Pediococcus* che portano a termine la fermentazione fino a raggiungere valori di pH 3.5-3.8. Nella produzione mediante fermentazione spontanea, sono necessari 4-6 giorni prima che il pH si stabilizzi. A volte però la fermentazione spontanea non garantisce la qualità organolettica e igienico sanitaria desiderata perciò si ricorre all'utilizzo di colture starter selezionate. La selezione di questi starter avviene in funzione dell'assenza di competizione tra le stesse e la microflora naturalmente presente e in funzione delle caratteristiche organolettiche e nutrizionali richieste nel prodotto. Questo permette di controllare e accelerare il processo, ottenendo una riduzione del rischio di deterioramento e un prodotto di qualità. (Cocolin L.S. et al., 2007).

Generalmente crauti fermentati devono avere un valore di pH di circa 3.5 e un'acidità totale espressa come acido lattico compresa tra 1.8 e 2.25 % ed un rapporto acido lattico/acido acetico di 4/1 (in peso). Il rapporto 4/1 fra l'acido lattico e acetico non è ottenibile affidando la fermentazione ad una sola coltura starter, necessariamente gli starter devono essere costituiti da una miscela di omo-eterofermentativi che vengono aggiunti in maniera scalare: *Leuconostoc mesenteroides* inizialmente che deve sviluppare rapidamente e viene inoculato in modo più massiccio, seguito da *Lactobacillus*



*plantarum* e *Lactobacillus brevis* successivamente. Tuttavia, oggi la fermentazione guidata da colture starter non è molto utilizzata per la produzione dei crauti poiché è considerato ancora come un prodotto artigianale. (Zambonelli C. et al., 2001).

I fattori che influenzano la tecnologia di produzione dei crauti e che selezionano naturalmente i microrganismi responsabili della fermentazione sono: la temperatura, la concentrazione salina, l'assenza di ossigeno. Il controllo della temperatura è uno dei fattori più importanti. La temperatura ottimale per la fermentazione dei crauti è di circa 21°C. È preferibile un intervallo di temperatura compreso tra 18°C e 22°C. Il sale deve essere aggiunto con una concentrazione di 2,0-2,5% (Fatih Y. e al., 2016).

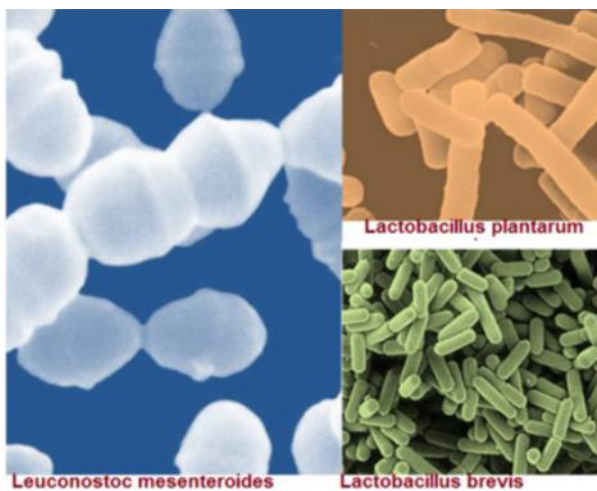


Figura 18 Batteri lattici responsabili della fermentazione dei crauti

### 3.2.2 Effetti benefici dei crauti

I Sauerkraut, o crauti, hanno mostrato alte potenzialità come alimenti funzionali e benefici, tanto che molte iniziative si sono orientate alla ottimizzazione della produzione di crauti incrementando la presenza di ceppi specifici, per potenziarne i singoli effetti. Durante il processo di fermentazione la composizione del prodotto cambia, nel prodotto fermentato si accumulano, in quantità rilevanti, i principali prodotti finali del metabolismo della flora lattica rappresentati da acidi organici (lattico, acetico, malico, succinico) ma anche acidi propionici, etanolo, acetato di etile, acetaldeide CO<sub>2</sub> e fibre, composti fenolici e vitamina C. (Trail A. C et al., 1996). I Sauerkraut sono considerati una fonte particolarmente ricca di antiossidanti, come la vitamina C, il cui contenuto varia da 14,7 a 75 mg / 100 g e composti fenolici (0,44–1,06 mg di acido gallico equivalenti / 100 g) che svolgono attività antiossidante prevenendo il danno cellulare causato dai radicali liberi. (Podsędek A. 2007).

I crauti sono una buona fonte di glucosinolati (GLS) e presentano alti livelli di prodotti di degradazione di questi; composti bioattivi come isotiocianati, indolo-3-carbinolo, indolo-3-acetonitrile, ascorbigeno, che è il più abbondante. Questi composti hanno proprietà antitumorali (Ciska E. et al., 2021).

Studi sul consumo di crauti fermentati riportano che questi possano migliorare la digestione, prevenire stati infiammatori, fortificare le ossa e ridurre il livello di colesterolo. Durante la fermentazione si produce anche una sostanza “colina” che agisce da una parte migliorando e regolando la circolazione sanguigna e dall’altra equilibrando l’apporto delle sostanze nutritive nel sangue. La colina inoltre è una sostanza che agisce abbassando la pressione. Apportando sufficienti quantità di colina si riduce il deposito di grassi nel corpo. All’interno dei crauti vi è la presenza di inibitori della amminoossidasi (MAOIs) ovvero composti che vanno ad inibire l’ossidazione delle ammine, questi prodotti tramite il trasporto ematico arrivano alla barriera ematoencefalica e fungono da barriera metabolica, riducendo il numero di scorie e tossine che entrano nel liquido celebrale. Sono inoltre riduttori degli stati depressivi e possono essere utili per combattere le dipendenze da sostanze. (Raak C. et al., 2014).

### 3.3 Aspetti biochimici ed enzimatici legati alla fermentazione dei vegetali

Complessi cambiamenti biochimici si verificano a seconda delle condizioni ambientali durante e dopo la fermentazione. La fermentazione è un processo anaerobico. Durante la fermentazione dei cetrioli, cavoli e olive; il glucosio e il fruttosio vengono convertiti in acido lattico, acido acetico, etanolo e CO<sub>2</sub> dai LAB e lieviti. I LAB omofermentativi utilizzano il glucosio e producono 2 molecole di acido lattico. Gli eterofermentanti utilizzano un metabolismo più complesso, il glucosio viene convertito in CO<sub>2</sub> e in un pentoso, che viene ulteriormente degradato in acido lattico, etanolo e acido acetico. Nel prodotto fermentato si accumulano, in quantità rilevanti, i principali prodotti finali del metabolismo dei batteri lattici; rappresentati da acidi organici e alcoli. Tra gli acidi organici ritroviamo: acido lattico, acido acetico, acido malico, acido succinico, e acido propionico. Nei crauti ottenuti mediante fermentazione spontanea l'acido lattico è presente nelle forme L (+) e D (-) complessivamente in concentrazioni tra 10.61 e 18.93 g/L, l'acido acetico è in concentrazioni tra 1.86 e 4.98 g/L, gli acidi malico, succinico e propionico sono presenti in basse concentrazioni (<0.05 g/L). Gli acidi prodotti dalla fermentazione dei carboidrati si accumulano nel substrato, determinando l'abbattimento del pH. Dopo la fermentazione nel substrato possono accumularsi composti organici volatili in piccole quantità, prodotti non solo dai microrganismi presenti, ma anche dalle reazioni autocatalitiche ed enzimi nativi del vegetale. Nei crauti sono presenti diacetile e acetaldeide, e una grande varietà di composti volatili solforati che sono i principali componenti aromatici del cavolo cappuccio fresco e dei crauti. I composti volatili solforati derivano dai prodotti di idrolisi dei tioglicosidi ad opera della mirosinasi. I tioglicosidi sono presenti in molti vegetali ed in particolare in quelli appartenenti alla famiglia delle *Brassicaceae*. L'enzima catalizza l'idrolisi dei tioglucosidi in D-glucosio, solfati e in una serie di agluconi che sono a seconda del substrato e delle condizioni di reazione, degradati in modo non enzimatico in composti volatili contenenti azoto e zolfo, quali isotiocianati, tiocianati, nitrili e tioni. Questi composti sono responsabili del sapore amaro di molti vegetali freschi.

Dalla fermentazione dei cetriolini ad opera del *L. plantarum* si ottengono composti volatili che conferiscono le caratteristiche organolettiche al prodotto, 2,6-nonadienale, 2-nonenale e l'acido trans e cis-4-esenoico che definiscono il caratteristico aroma di salamoia. Ci può essere inoltre la formazione non enzimatica di aldeidi; esanale e aldeidi insature trans, indici dell'ossidazione dei lipidi presenti nei cetrioli.

I tessuti vegetali presentano inoltre enzimi nativi, che durante la fermentazione degradano i componenti delle pareti cellulari e modificano la texture del vegetale. Nei cetrioli sono state riconosciute attività di pectinesterasi, exopoligalatturonasi ed endopoligalatturonasi. La pectinesterasi

rimuove i gruppi metilici dalla pectina, favorendo un intenerimento dei cetrioli fermentati. Ci sono inoltre, enzimi in grado di degradare altri polisaccaridi della parete cellulare, nei cetrioli vi è l'attività endo- $\beta$ -1,4-gluconasi che viene inattivata durante la fermentazione a pH al di sotto di 4.8. Come nei cetrioli anche in altri vegetali l'attività degli enzimi  $\alpha$ -d-galattosio,  $\beta$ -d-galattosio,  $\beta$ -d-glucosio,  $\beta$ -d-xilosio,  $\alpha$ -d-mannosio e  $\alpha$ -l-arabinosio diminuisce durante la prima settimana di fermentazione in salamoie al 2% di NaCl. (Breidt F. et al., 2013).

### **3.3.1 La conservazione delle verdure fermentate**

I vegetali fermentati devono essere conservati in modo da preservare la vitalità dei microrganismi positivi presenti. La conservazione, "shelf life" di un prodotto è quel periodo di tempo entro il quale l'alimento non deve subire cambiamenti significativi, deve mantenere le caratteristiche organolettiche e può essere consumato senza comportare un rischio per la salute del consumatore.

Ci sono diversi parametri che influenzano la shelf-life di un prodotto vegetale fermentato:

- la sicurezza dell'alimento
- le proprietà organolettiche
- la quantità di microrganismi presenti e il tipo di microrganismi presenti.

L'alimento deve essere sicuro, nei vegetali fermentati per accertarsi la sicurezza del prodotto è opportuno controllare 3 parametri fondamentali: salinità, pH e controllo visivo. La concentrazione del sale è il fattore più importante, senza un'adeguata concentrazione di sale si può andare incontro a situazioni indesiderate. Con l'aggiunta di sale alla lavorazione delle verdure fermentate, i microrganismi sensibili al sale non riescono a sviluppare e riprodursi (Qiannan P. et al., 2018). Bisogna inoltre controllare durante la conservazione di quanto e come varia il pH; e le proprietà organolettiche legate al sapore che possono cambiare nel tempo, sia a livello di gusto (acidità), che di aromi e consistenza. La temperatura di conservazione gioca anch'essa un ruolo fondamentale per la stabilità del prodotto. Le verdure fermentate possono essere conservate in diversi modi:

- Conservazione in frigorifero (da 4°C a 8°C) anche per mesi, dai 3-6 mesi ai 12 mesi. Con questo metodo di conservazione a freddo è possibile preservare al meglio la vitalità dei prodotti, mantenendo a distanza di 6 mesi i fermenti vivi e una consistenza e sapore ottimale.
- Conservazione in cantina (da 10°C a 14 °C) a queste temperature i processi sono abbastanza rallentati e le verdure si conservano per un buon periodo che va da 1 fino a 3-6 mesi.

- Conservazione a temperatura ambiente 20° C per pochi fermentati, per 1-2 mesi.

Il più importante dei fattori è la quantità di microrganismi vivi e vitali che permangono fino al momento del consumo, il modo migliore per garantire la sopravvivenza a lungo termine dei batteri lattici presenti nelle verdure fermentate è mantenerle ad una temperatura di refrigerazione. (Sacco F., 2022).

### 3.3.2 Riutilizzo della salamoia

Il liquido rimasto nel vasetto dopo aver consumato le verdure fermentate, contiene sale, ma anche un'elevata quantità di post-biotici, metaboliti dei microrganismi che hanno proprietà utili al nostro organismo.



*Figura 19 Salamoia di vegetali fermentati*

Di solito la salamoia fermentata viene eliminata, in realtà è possibile riutilizzare questo scarto per interessanti scopi:

- **Starter per altre fermentazioni:** la salamoia già fermentata è ricca di microrganismi attivi, è possibile quindi utilizzarla per fermentare nuove verdure, velocizzando il processo e garantendo una maggiore sicurezza sulla riuscita del processo. Di solito si usa 1-2% di salamoia già

fermentata. Questa pratica prende il nome di back-slopping. L'applicazione di tale tecnologia comporta il trasferimento continuo di popolazioni microbiche, in condizioni ambientali specifiche, determinandone, a lungo termine, l'adattamento genetico e la differenziazione genica (Caggia C., 2018).

- **Shot ricchi di fermenti vivi**
- **Come condimento;** essendo ricca di sale ma anche acidi organici e una serie di composti organolettici, è possibile usarla come base per le salse.
- **Uso in miscelazione** secondo la rivista del 2022 di SR76; la salamoia può essere utilizzata in miscelazione per la preparazione di drink, il Bloody Mary, la salamoia di kimchi già piccante e saporita sostituirà la combo di tabasco e salsa Worcester utilizzati per la realizzazione del drink. Allo stesso modo anche per la realizzazione del Dirty Martini. Ogni salamoia può dare una sfumatura diversa.
- **Marinature potenziate** le salamoie fermentate sono un'ottima base per marinare qualunque alimento, apportano sale ma anche enzimi e microrganismi vivi che aiutano alla trasformazione dell'alimento.

## CAPITOLO 4

### CONCLUSIONI

La fermentazione degli alimenti è una tecnica tradizionale ma che si è evoluta nel tempo, in passato veniva principalmente utilizzata come tecnica di conservazione, poi con l'avvento delle nuove tecnologie di conservazione (pastorizzazione e sterilizzazione) è stata accantonata. Oggi la maggior parte degli alimenti vengono sottoposti a diversi metodi di processamento che, pur consentendo moltissimi vantaggi dal punto di vista della sicurezza alimentare, incidono negativamente sul valore nutrizionale e organolettico degli alimenti, riducendone la disponibilità in vitamine, fibre, minerali, acidi grassi essenziali, aminoacidi, ed eliminano eventuali microrganismi probiotici presenti. (Bell, V. et al., 2017). Recentemente si è assistito ad una riscoperta delle tecniche di fermentazione tradizionali degli alimenti, poiché diversi studi scientifici, dimostrano gli effetti benefici degli alimenti fermentati. Gli alimenti fermentati sono spesso fonte di microrganismi probiotici, microrganismi che possono colonizzare l'apparato gastrointestinale e svolgere numerosi ruoli benefici, tra cui favorire la capacità di assorbimento delle sostanze nutritive e combattere le infezioni potenziando il sistema immunitario e inibendo la crescita di microrganismi patogeni. (Mahasneh, A.M et al., 2017). La ricerca scientifica ha dimostrato come gli alimenti fermentati vegetali rappresenteranno il futuro di una dieta sana e salutare. Una dieta ricca di alimenti fermentati aumenta la diversità del microbiota intestinale, riduce l'insorgenza di stati infiammatori, migliora la risposta immunitaria.

Tutto ciò è dimostrato anche dal numero di pubblicazioni scientifiche sugli alimenti fermentati che negli ultimi anni è in forte crescita.

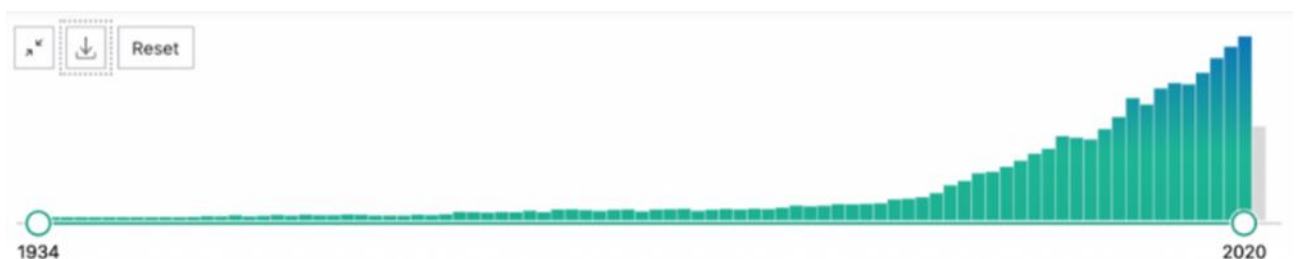


Figura 20 Andamento delle pubblicazioni scientifiche sugli alimenti fermentati negli ultimi anni. (pubMED)

La globalizzazione e la crescita incessante della domanda di prodotti alimentari fermentati da parte dei consumatori hanno portato a una standardizzazione industriale con l'utilizzo di colture starter, che garantiscono una sicurezza fisico-chimica, ottime caratteristiche organolettiche ma riducono la biodiversità microbica. (Andrea Galimberti et al., 2021).

Gli alimenti fermentati spontaneamente potrebbero essere una valida risorsa per il futuro, in quanto è l'unica che è in grado garantire una certa biodiversità microbica. I microrganismi tipici dei prodotti fermentati spontanei si selezionano in base alla loro resistenza agli stress. Una migliore resistenza agli stress vuol dire un maggior numero di batteri che raggiungono l'intestino. La selezione spontanea di ceppi permette anche di tenere sotto controllo la flora microbica patogena o degradativa che comunque continua ad essere presente nell'alimento.

In conclusione, questo elaborato ha messo in evidenza come ci sia stata una riscoperta degli alimenti fermentati negli ultimi anni, ed in particolare verso la categoria dei vegetali fermentati. Ciò è attribuibile ai dimostrati benefici di questa categoria di alimenti che possono essere fonte non solo di microrganismi probiotici ma anche di fattori nutrizionali di grande importanza quali vitamine, fibre, antiossidanti, polifenoli ecc. La direzione intrapresa è quella di privilegiare gli aspetti nutrizionali e salutistici delle produzioni garantendo al contempo shelf-life e sicurezza alimentare.

Per queste ragioni negli ultimi anni sono state svolte anche numerose ricerche per che includono la modellazione matematica della crescita batterica e della competizione microbica, lo studio dell'ecologia molecolare delle fermentazioni vegetali, tecnologie di fermentazione in contenitori chiusa per ridurre sprechi di sale, l'uso di sostanze naturali per rimuovere gli enzimi causa di rammollimento dalle salamoie riciclate, studi per migliorare la percezione sensoriale dei prodotti vegetali in salamoia e studi sulla sicurezza degli alimenti acidificati.



## CAPITOLO 5

### BIBLIOGRAFIA

1. Bautista-Gallego J., Medina E., Sánchez B., Benítez-Cabello A., & Arroyo-López FN. (2020) "Ruolo dei batteri lattici nelle verdure fermentate". *Grasas Aceites* 71 (2) ISSN-L: 0017-3495 DOI: 10.3989/gya.0344191
2. Belal J. Muhialdin, Zawawi N., Razis A. , Bakar J. & Zarei M. (2021) Antiviral activity of fermented foods and their probiotics bacteria towards respiratory and alimentary tracts viruses; *Food control*.
3. Bell V, Ferrão J, & Fernandes, T. (2017). Nutritional guidelines and fermented food frameworks. *Foods*, 6(8), 65
4. Bohkyung K., Eun-Gyung M., Doyeon K., Young P., Yongsoon L., & Hae-Jeung C.(2018). A survey of research papers on the health benefits of kimchi and kimchi lactic acid bacteria. *Journal of Nutrition and Health*, 51(1), 1-13
5. Bozzetti V. (2011) *Manuale lattiero caseario*. Volume 1: Tecniche nuove cp.7
6. Breidt F., McFeeters R. F., Perez-Diaz I., Lee Cherl-Ho (2013) Fermented Vegetables; *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 4th Ed.* (33)
7. Broughton. J. (1990) Nisin and its uses as a food preservative. *Food technol.* 44(11), 100-117.
8. Buckenhüskes H.J. (1993). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starters cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol Rev*, 12: 253-272.
9. Caggia C. (2018) La fermentazione, il più antico sistema di conservazione degli alimenti: quali i benefici e le criticità? *Biodiversità 2018 XII convegno nazionale*
10. Ciska E., Honke J., Drabińska N. (2021) Changes in glucosinolates and their breakdown products during the fermentation of cabbage and prolonged storage of sauerkraut: Focus on sauerkraut juice. *Food chemistry* vol.365
11. Cocolin L. S., Comi G. (2007) La microbiologia applicata alle industrie alimentari. "Microbiologia dei prodotti vegetali fermentati" 416- 420.
12. De Vuyst L. & Vandamme E.J. (1994) *Bacteriocins of lactic acid bacteria* p.5-6
13. Devriese, L.A., Pot, B. & Collins, M.D. (1993) Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Appl. Bacteriol.* 75, 399-408.
14. Di Cagno R., Coda R., De angelis M., & Gobbetti M. (2013) "Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation": a review of *Food Microbiology*, 33, 1-10.

15. Fatih Y., Robert C. W. (2016) Sauerkraut, “*Minimally processed refrigerated fruits and vegetables*” 545-550
16. Foschino R., Galli A., Perrone F. & Ottogalli G. (1995). Prodotti da forno ottenuti da impasti a lievitazione naturale: studio e caratterizzazione della microflora tipica. *Tecnica Molitoria*, 485-510.
17. Galimberti A., Bruno A., Agostinetto G., Casiraghi M., Guzzetti Lorenzo; Labra M. (2021). Fermented food products in the era of globalization: tradition meets biotechnology innovations. *Current Opinion in Biotechnology*, 70, 36–41
18. Hammes, W.P., Weiss N., and Holzapfel.W. (1991). The genera *lactobacillus*. Vol.II 2nd edition *springer-Verlag*, 1535-1594.
19. HJ Choi, CI Cheigh , Sai B., Pyun Y.R.(2000). Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. *Journal of Applied Microbiology*, 88(4), 563-571
20. Hui Y.H., Evranuz E.O. (2012). *Handbook of Plant- Based Fermented food and Beverage Technology* ; Second edition
21. Ishizaki K., Koomarneni, S. & Nanko, M. (1998). Porous Materials: Process Technology and Applications. *Dordrecht: Kluwer Academic Publishers*. Pp. 181–224
22. Joo S.D., Jung D.; Jung S., Daesul Y. (2020) Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *Journal of virology* , 80 (11),5104-5112
23. Kang B.K., Cho M.S. & Park D.S. (2016) Red pepper powder is a crucial factor that influences the ontogeny of *Weissella cibaria* during kimchi fermentation. *Scientific reporter*.
24. Kyungsun H., Shambhunath B., Wang J.; Kim Bong-Soo K., Mi Jeong K., Eun-Jung K. Hojun (2015). Contrasting effects of fresh and fermented kimchi consumption on gut microbiota composition and gene expression related to metabolic syndrome in obese Korean women. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(5)
25. Lihua F., Truelstrup H.L., Deana V. S., Si Chen, & Zhang H. (2020) “Role of Lactic Acid Bacteria in the Fermentation and Biopreservation of Plant-Based Foods” *Handbook of Vegetable Preservation and Processing* 783-785
26. Mahasneh, A.M., Abbas M.M. Probiotics and traditional fermented foods: The eternal connection (mini-review). *Jordan J. Biol. Sci.* 2010, 3, 133–140
27. Ottaviani F. (1996) *Microbiologia dei prodotti di origine vegetale* p 137-146
28. Patel A., Prajapati J.B., Holst O., Ljungh A. (2014). Determining probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from vegetables and traditional Indian fermented food products. *Food Bioscience*, v.5, 27–33.

29. Peres C.M., Peres C., Hernández-Mendoza A., Malcata X. (2012). Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria – With an emphasis on table olives., 26(1)
30. Podsędek Anna (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. 40(1), 0–11.
31. Qiannan P., Shuaiming J.; Chen Jieling; Chenchen M., Dongxue H.; Shao Y., Zhang J. (2018). Unique Microbial Diversity and Metabolic Pathway Features of Fermented Vegetables From Hainan, China. *Frontiers in Microbiology*.
32. Raak, C., Ostermann T.; Boehm K.; Molsberger F. (2014). Regular Consumption of Sauerkraut and Its Effect on Human Health: A Bibliometric Analysis. *Global Advances in Health and Medicine*, 3(6),
33. Sacco F. (2021). *Fermentare le verdure*. 13-55
34. Stiles M., Holzapfel W.H. (1997). *Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy*. 36(1), 1–29
35. Sukirah A. R., Kahar A., Mansor A., Murni D.L., Hussin A.; Sharifudin S.A., Hun T.G., Rashid N.Y.A.; Othaman1 M.A.& Long K. (2017) Identification Of Potential Indigenous Microbe From Local Fermented Vegetables With Antimicrobial Activity. *Science Heritage Journal / Galeri Warisan Sains (GWS)*.
36. Tabanelli G. (2009) Miglioramento delle proprietà funzionali di prodotti contenenti batteri lattici probiotici.
37. Torres S., Contreras L., Isla M.I. (2020). An overview of plant-autochthonous microorganisms and fermented vegetable foods. *Food Science and Human Wellness*
38. Trail, A. C., Fleming, H. P., Young, C. T., & McFeeters, R. F. (1996). Chemical and sensory characterization of commercial sauerkraut . *Journal of food quality*, 19(1), 15-30
39. Vandamme P. Pot, Gillis.M.B., De Vos P., Kersters.K. & Swings J. (1996) Polyphasie taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics *Microbiol. Rev.*60 407-438
40. Varzakas T., Zakyntinos G., Proestos C., Radwanska M. (2017) Fermented vegetables ; *Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables* 537-584.
41. Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg NR, Ludwig W., Rainey FA., Schleifer K.H. &Whitman W.B.(2009) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 3: *The Firmicutes*. Williams & Wilkins. p. 693.
42. Watanabe F, Yabuta Y, Bito T, & Teng, F. (2014). Vitamin B12-containing plant food sources for vegetarians. *Nutrients*, 6(5), 1861-1873

43. Y. H. Hui, E. Özgül Evranuz (2012) Plant-Based Fermented Foods and Beverages of Asia; Handbook of *plant-Based Fermented food and Beverage Technology*; 2nd Edition
44. Zambonelli C., Tini V., Giudici P. & Grazia L. (2001) *Microbiologia degli alimenti fermentati*. “la fermentazione naturale” p. 190
45. Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C., Hugh M.B., Mattarelli P., Paul W., Pot B., Vandamme P., Jens W., Watanabe K., Wuyts S., Felis G.E., Gänzle M.G. & Lebeer S. (2020) A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* Volume 70.

## SITOGRAFIA

- <https://it.sr76beerworks.com/>
- <https://www.prnewswire.com/>