



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI
CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA IN TECNOLOGIE ALIMENTARI

Valutazione dell'attività prebiotica in vitro di sciroppi di carruba (*Ceratonia siliqua* L.)

Tesi di laurea in MICROBIOLOGIA DEGLI ALIMENTI

Relatore

Prof. Lorenzo Nissen

Correlatori

Prof. Andrea Gianotti

Dott. Davide Addazii

Presentata da

Massimo Suozzi

Matr. 1043132

Sessione luglio 2024

Anno Accademico 2023/2024

Sommario

1	Introduzione	4
1.1	Cenni botanici e agronomici del carrubo (<i>Ceratonia siliqua</i> L.)	4
1.2	Diffusione del carrubo	6
1.3	Mercato della carruba	7
1.4	La carruba nel settore alimentare	8
1.4.1	Processi di trasformazione	8
1.4.2	Valori nutrizionali della carruba	10
1.5	Farina di semi di carruba	11
1.5.1	Caratteristiche chimico-fisiche	11
1.5.2	Processo produttivo	12
1.6	Sciroppo di carruba	12
1.6.1	Metodo di produzione tradizionale	13
1.6.2	Applicazione di ultrasuoni	14
1.6.3	Utilizzi	15
1.6.4	Valori nutrizionali	15
1.6.5	Proprietà salutistiche	15
1.6.6	5-HMF e prodotti di Maillard	16
1.6.7	Polifenoli	17
1.6.8	Attività prebiotica	19
1.7	Il progetto GourMed	20
1.7.1	Obiettivi generali del progetto	20
1.7.2	Il consorzio del progetto	20
1.8	Prebiotici	22
1.8.1	GOS	23
1.8.2	Fruttani e FOS	24
1.8.3	Polifenoli	24
1.9	Probiotici ed enterobatteri	25
1.9.1	Probiotici	25
1.9.2	Microflora antagonista: <i>Enterobacteriaceae</i>	28
2	Obiettivo	29
3	Materiali e metodi	30

3.1	Descrizione dei campioni	30
3.2	Valutazione dell'attività prebiotica.....	31
3.3	Indice di attività prebiotica (<i>prebiotic score</i>).....	31
3.4	Conteggio microbico su terreni selettivi	32
3.5	Enumerazione microbica tramite real-time PCR	32
3.6	Microestrazione in fase solida – gascromatografia - spettrometria di massa (SPME-GC-MS)	33
3.7	Potenziale prebiotico	34
3.8	Analisi statistica	34
4	<i>Risultati e discussione</i>	37
4.1	Valutazione Prebiotica	37
4.1.1.	Crescita batterica selettiva sui prodotti pilota	37
4.1.2	Indice di attività prebiotica (<i>prebiotic score</i>).....	39
4.1.3	Volatiloma dell'attività prebiotica	40
5	<i>Conclusioni</i>.....	50
	<i>Bibliografia</i>.....	51

1 Introduzione

1.1 Cenni botanici e agronomici del carrubo (*Ceratonia siliqua* L.)

Ceratonia siliqua L. Sp. Pl.: 1026 (1753), più comunemente conosciuta come carrubo, è una pianta appartenente alla famiglia delle *Fabaceae*. Originaria del bacino meridionale del Mediterraneo e dell'Asia minore, si è diffusa attraverso la coltivazione in tutti i paesi del Mediterraneo andando ad occupare la zona fitoclimatica dell'*Oleo-Ceratonion siliquae* che condivide con *Olea europea* L. ovvero l'olivo (Zepigi, 2009).



Figura 1. Albero di *Ceratonia siliqua* L. nei pressi di Petra, Giordania (KEW Royal Botanic Garden, s.d.)

Il carrubo si presenta come un arbusto o albero robusto e sempreverde che può raggiungere i 15 metri di altezza ed è caratterizzato da un possente apparato radicale (Zepigi, 2009). Le foglie composte si presentano coriacee e lucenti e sono inserite in una chioma ampia e densa (Figura 1). I fiori, ermafroditi o unisessuali (pianta poligama o dioica), sono organizzati in racemi generati da legno vecchio (caulifloria) (Mattei, s.d.). Il frutto (carruba) è un grosso baccello o legume piatto indeiscente, dall'epicarpo coriaceo, di un colore inizialmente verdastro che passa al bruno-nerastro giunto a

maturità. La polpa o mesocarpo carnoso e zuccherino contiene dai 10 ai 15 semi lenticolari bruni molto duri (Figura 2) (Zepigi, 2009). Dal punto di vista agronomico il carrubo presenta caratteristiche piuttosto significative in termini di adattabilità. La specie mostra una grande resistenza a condizioni pedoclimatiche avverse che impedirebbero la coltivazione della maggior parte delle specie vegetali di rilevanza agronomica. Si caratterizza per una buona tolleranza alla salinità e riesce a svilupparsi anche in climi molto siccitosi. Inoltre, è in grado di tollerare suoli scarsamente fertili in quanto estremamente poco esigente in termini nutritivi. Queste caratteristiche permettono la coltivazione del carrubo in aree che non potrebbero essere sfruttate per tipi di colture più esigenti (Rodríguez-Solana et al., 2021).



Figura 2. Baccelli di carruba in fase di maturazione (KEW Royal Botanic Garden, s.d.)

1.2 Diffusione del carrubo

La diffusione della coltivazione del carrubo è storicamente attribuita alle antiche popolazioni greche e arabe che lo hanno introdotto in tutto il bacino del Mediterraneo principalmente con lo scopo di alimentare il bestiame (Dahmani et al., 2023). Una successiva introduzione in età moderna ha portato all'espansione del suo areale al di fuori di quello di provenienza. Ad oggi lo si trova in buona parte degli stati africani subsahariani, California, Cile, Australia, India e Cina (Figura 3) (KEW Royal Botanic Garden, s.d.).

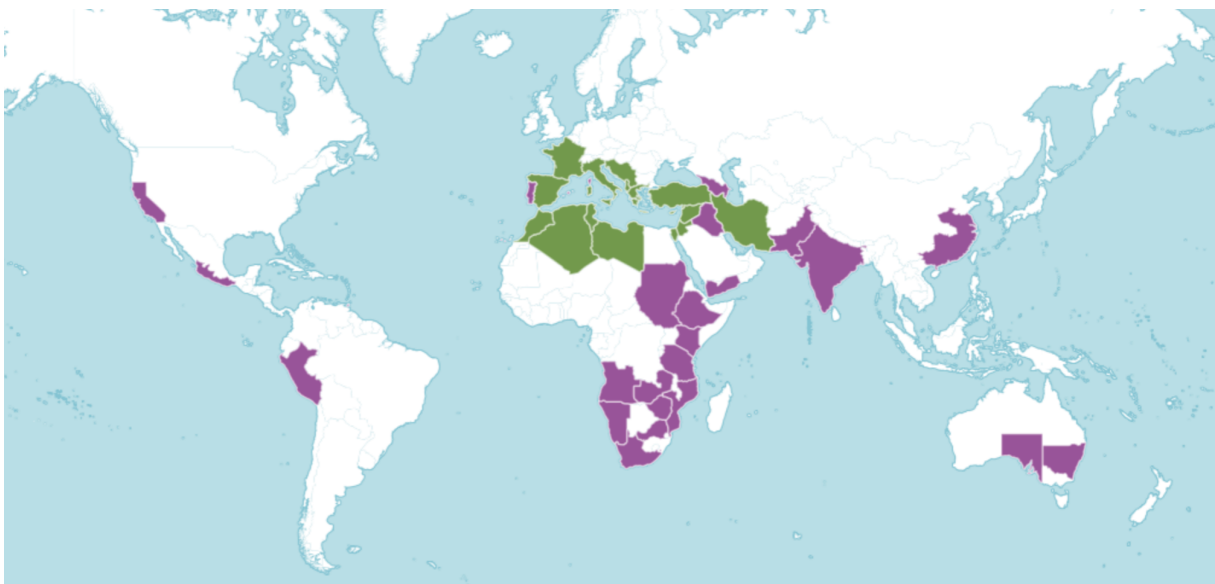


Figura 3. Diffusione geografica del carrubo: in verde le aree di origine e in viola quelle in cui è stato introdotto (KEW Royal Botanic Garden, s.d.)

Tuttora la regione mediterranea rappresenta ancora l'area di maggiore produzione. Degli 87.485 ha coltivati a livello mondiale 74.174 ha (85%) sono concentrati tra Spagna, Marocco, Italia e Portogallo, dove si coltivano sia varietà selvatiche che cultivar selezionate. I dati fissano la produzione media mondiale di carruba a 315.000 tonnellate, di cui il 60% localizzata in Europa e il 21% in Africa. Il maggior produttore è il Portogallo, seguito da Italia, Marocco, Grecia, Turchia e Cipro (Figura 4) (Dahmani et al., 2023).

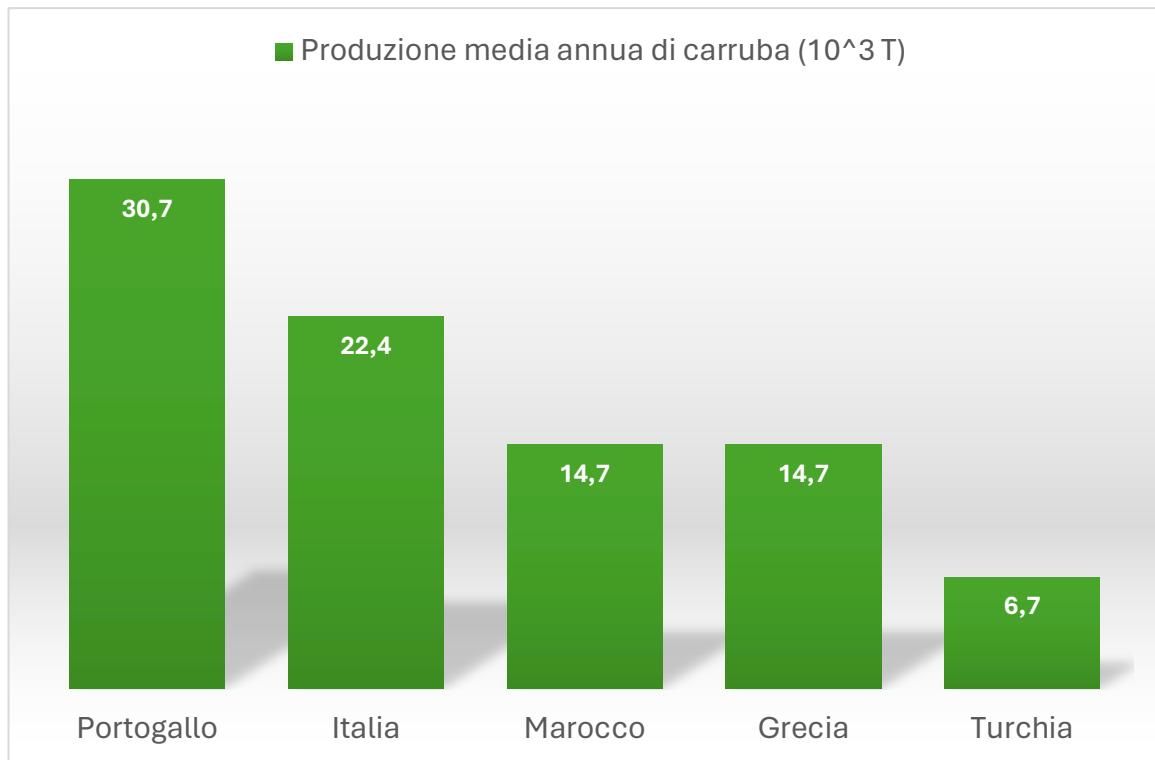


Figura 4. Produzione media annua di carruba dei maggiori produttori a livello mondiale (Dahmani et al., 2023)

1.3 Mercato della carruba

La diffusione del carrubo a livello mondiale è sostanzialmente dovuta ai molteplici utilizzi dei suoi frutti nel settore alimentare ma anche in campo zootecnico e farmaceutico. Alcune peculiarità del baccello di carruba rendono la specie sempre più attraente per i mercati, che vedono una crescita costante dei suoi volumi produttivi e degli scambi commerciali (Future Market Insights Inc., 2023).

Gli *highlights* del prodotto apprezzati dai mercati si possono così riassumere:

- Rappresenta un'alternativa valida all'utilizzo della polvere di cacao nell'industria alimentare (Allied Market Research, 2021);
- Il frutto è privo di caffeina e teobromina (Papaefstathiou et al., 2018), caratteristica apprezzabile sia per le diete umane che per quelle animali (da reddito e da compagnia) (Future Market Insights Inc., 2023);
- È largamente utilizzabile come additivo addensante e gelificante ed è particolarmente apprezzato nell'industria *plant based* (Allied Market Research, 2021). L'incremento della produzione mondiale di cibi *gluten free* porta ad una

maggior richiesta di addensanti che sostituiscano le funzioni tecnologiche del glutine. Uno su tutti è l'E-410 ottenuto dai semi della carruba, che risulta estremamente ricercato nei comparti produttivi biologici (Papaefstathiou et al., 2018);

- È utilizzabile dall'industria dolciaria come aroma naturale sostitutivo del caffè (Future Market Insights Inc., 2023).

Le analisi di mercato prevedono in maniera unanime un incremento dei volumi degli scambi commerciali della carruba (tabella 1). Questa tendenza è destinata ad aumentare considerevolmente nelle proiezioni di mercato al 2030.

Tabella 1. Dati relativi ai volumi degli scambi commerciali di carruba a livello mondiale (Future Market Insights Inc., 2023)

Mercato e previsioni	Valore (US\$)
Valore del mercato (2022)	732,3 milioni (US\$)
Valore del mercato (2023)	761,6 milioni (US\$)
Previsione del valore del mercato (2033)	1.129,3 milioni (US\$)
Proiezioni del tasso di crescita (2023 - 2033)	4.0% CAGR (<i>Compounded Average Growth Rate</i>)

1.4 La carruba nel settore alimentare

1.4.1 Processi di trasformazione

Della pianta del carrubo è il frutto (legume) la parte che ricopre una valenza nel settore alimentare, anche se il suo utilizzo tal quale è scarsamente diffuso. La maggior parte del valore economico, infatti, risiede nei semi destinati alla trasformazione, mentre la polpa seppur nutrizionalmente non trascurabile è tuttora considerata un prodotto secondario.

I semi rappresentano dal 5 al 27% del peso totale del frutto e di conseguenza la polpa dal 73 al 95%. Risulta quindi evidente l'utilità economica della valorizzazione del sottoprodotto polpa (Rodríguez-Solana et al., 2021).

La prima fase della lavorazione della carruba è la separazione del seme dalla polpa. La natura estremamente coriacea del seme ne permette un'estrazione con mezzi meccanici senza particolari accorgimenti.

A sua volta il seme viene ulteriormente separato nelle sue tre componenti: germe, endosperma e tegumento esterno. L'operazione solitamente avviene con mezzi chimici (es. acido solforico). È dalla molitura dell'endosperma che si ricava l'additivo alimentare E-410, noto come *farina di semi di carruba*, largamente utilizzato come addensante e stabilizzante nell'industria alimentare (Rodríguez-Solana et al., 2021). Per le caratteristiche chimiche e per i metodi produttivi si rimanda al paragrafo 1.5.

La polpa, una volta separata, può essere destinata a diversi scopi. I processi di lavorazione variano in funzione del fine produttivo. Di seguito si elencano i principali processi di trasformazione:

- **Molitura:** a seconda dell'utilizzo la polpa (che si presenta come una sostanza secca) può essere molita più o meno finemente. Una frangitura grossolana genererà un prodotto principalmente destinato all'alimentazione animale, mentre gli sfarinati più sottili possono avere impieghi anche nell'industria alimentare (Rodríguez-Solana et al., 2021);
- **Tostatura:** al fine di incrementare gli attributi sensoriali della carruba, questa può subire una tostatura. Tale processo coinvolge la frazione zuccherina che, subendo una caramellizzazione e l'insieme delle reazioni di Maillard, causa la formazione di melanoidine. Il conseguente imbrunimento del prodotto sarà tanto più spiccato quanto più elevati saranno i parametri tempo/temperatura applicati (Rodríguez-Solana et al., 2021). Questo trattamento, ad esempio, conferisce alla farina di polpa di carruba delle caratteristiche sensoriali assimilabili alla polvere di cacao (Cantalejo, 1997). È bene evidenziare che l'esposizione alle alte temperature dell'operazione porterà inevitabilmente alla formazione di alcuni composti ritenuti potenzialmente nocivi per la salute umana, quali idrossimetilfurfurale (HMF: 5-(idrossi-metil)-2-furaldeide) e acrilammide (2-propenamamide) (Rodríguez-Solana et al., 2021).

1.4.2 Valori nutrizionali della carruba

Il contenuto medio di nutrienti della carruba può subire variazioni rilevanti a seconda della varietà, del territorio di provenienza e della stagione (Dahmani et al., 2023). Si riportano pertanto alcune caratteristiche nutrizionali significative in grado di fornire una visione generale di tali aspetti:

- **Frutto intero essiccato** (Avallone et al., 1997):

- Acqua (6–10%)
- Ceneri (1–6%)
- Proteine (1–5%)
- Lipidi (0,4–0,8%)
- Carboidrati di cui:
 - Saccarosio (27–40%)
 - Glucosio (3–5%)
 - Fruttosio (3–8%)
 - Amidi (0,1–1,3%)

- **Polpa** (Dahmani et al., 2023):

- Zuccheri totali: 30-60% di cui: saccarosio (65-75%), glucosio (25%), fruttosio (15%)
- Fibre: 30-40% di cui: lignina (50-65%), cellulosa (15-25%), pectina (0,5-2%), tannini (3-7%)

- **Semi** (Fidan et al., 2020):

- Zuccheri di cui:
 - Mannosio (54%)
 - Galattosio (15,5%)
 - Saccarosio (8,1%)
 - Glucosio (2,2%)
 - Arabinosio (1%)
 - Xilosio (0,4%)
- Proteine: 18-25% formate principalmente da arginina, alanina e lisina. In quantità inferiore sono presenti acido aspartico, asparagina, glicina, triptofano, prolina, acido glutammico e isoleucina, che sommati rappresentano però il 57% della frazione aminoacidica.

1.5 Farina di semi di carruba

La farina di semi di carruba (E 410, CAS 9000-40-2, *Carob bean gum*, *loctus bean gum* o carrubina) è ottenuta dall'endosperma dei semi ed è costituita da un polisaccaride ad alto peso molecolare formato da galattomannani. È un additivo alimentare largamente utilizzato come addensante, stabilizzante ed emulsionante nella preparazione di molti cibi e di alcuni alimenti per l'infanzia. Il suo utilizzo è approvato nella maggior parte del mondo. È attualmente inserito nel *Combinated Compendium of Food Additive Specifications* della FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) (FAO, 2016).

1.5.1 Caratteristiche chimico-fisiche

La sostanza si presenta come una polvere bianco-giallastra quasi inodore, insolubile nella maggior parte dei solventi organici, incluso l'etanolo. È parzialmente solubile in acqua a temperatura ambiente e solubile in acqua calda (85°C per 10 min.).

Il polisaccaride è caratterizzato da una catena lineare di unità di β -D-mannopiranosil (1 \rightarrow 4) β -D-mannopiranosio e un residuo laterale di (1 \rightarrow 6) α -D-galattopiranosio. Il rapporto mannosio/galattosio è circa 4:1 (73-86% mannosio e 14-27% galattosio) (Figura 5).

Il composto forma soluzioni molto viscosi anche a concentrazioni relativamente basse. Non risente particolarmente delle condizioni di pH, salinità o temperatura della soluzione. L'utilizzo in combinazione a carragenina e agar è in grado di interferire con il potere gelificante di quest'ultimi (FAO, 2016).

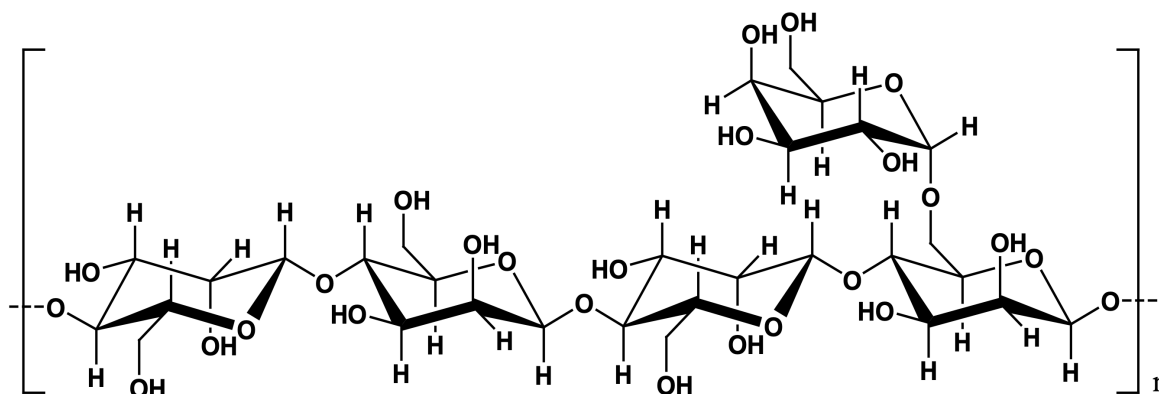


Figura 5. Unità di base di galattomannano (FAO, 2016)

1.5.2 Processo produttivo

Sul mercato la farina di semi di carruba è presente in due forme: la farina di semi di carruba tal quale e la sua forma chiarificata.

In entrambi i casi il processo produttivo parte dai semi della pianta precedentemente separati meccanicamente dalla polpa (si veda paragrafo 1.4.1).

Ottenuto il seme questo deve essere decorticato senza intaccarne l'endosperma. Data la sua natura estremamente coriacea questa operazione prevede due possibilità di approccio:

- **Decorticazione acida:** si utilizza acido solforico (H_2SO_4) ad una certa concentrazione e temperatura. Il trattamento causa la carbonizzazione del tegumento che ricopre il seme. I semi trattati vengono successivamente lavati e spazzolati liberando così l'endosperma;
- **Decorticazione termica:** il seme viene esposto ad un'alta temperatura per un tempo ridotto (*roasting*). Il tegumento carbonizzato viene allontanato mediante azione meccanica e getti di aria. In questo caso il prodotto può assumere una colorazione più scura rispetto al trattamento con acido.

A questo punto il processo si divide a seconda che si voglia ottenere il prodotto tal quale o chiarificarlo:

- **Farina di semi di carruba tal quale:** l'endosperma subisce una fine molitura e viene così confezionato;
- **Farina di semi di carruba chiarificata:** l'endosperma viene finemente molito e disperso in acqua calda. Attraverso un coadiuvante di filtrazione viene separata la frazione insolubile. La restante parte in soluzione viene fatta precipitare mediante isopropanolo o etanolo. Il precipitato viene separato dalla fase acquosa mediante un'ulteriore filtrazione. Quest'ultimo viene successivamente essiccato e finemente polverizzato ottenendo il prodotto pronto per il confezionamento (FAO, 2016).

1.6 Sciroppo di carruba

Lo sciroppo di carruba si presenta come un liquido denso e scuro ottenuto dalla solvatazione degli zuccheri del frutto e dalla loro successiva concentrazione.

Tradizionalmente il processo di preparazione prevede lunghi tempi di estrazione e concentrazione attraverso la bollitura della polpa in acqua. Un'esposizione così lunga alle temperature di ebollizione porta all'ossidazione e alla degradazione di alcuni componenti bioattivi presenti nel frutto. Lo studio di Clodoveo et al. (2022) mostra come sia possibile utilizzare la tecnologia degli ultrasuoni al fine di migliorare la resa estrattiva, ottimizzare le risorse e limitare i fenomeni degradativi dei composti bioattivi. Tutt'oggi il processo produttivo maggiormente utilizzato si rifà a quello praticato tradizionalmente in ambiente casalingo dalle popolazioni del bacino del Mediterraneo.

1.6.1 Metodo di produzione tradizionale

Il processo produttivo parte dalla polpa del frutto privata dei semi. Questa viene tritata in piccoli pezzi e immersa in acqua in rapporto 1:3 (massa/volume). Dopo una fase di "ammollo" si procede alla bollitura per permettere il trasferimento degli zuccheri dalla polpa al solvente acquoso. Una successiva pressatura separa il liquido dalla parte solida. L'operazione può essere ripetuta una seconda volta per massimizzare l'estrazione degli zuccheri. La soluzione ottenuta subisce una lunga bollitura che per evaporazione concentra gli zuccheri fino a formare uno sciroppo a circa 70 °Brix. L'operazione di concentrazione può durare fino a quattro ore e causerà anche l'imbrunimento del composto che assumerà il caratteristico colore scuro (Figura 6) (Dhaouadi et al., 2014).

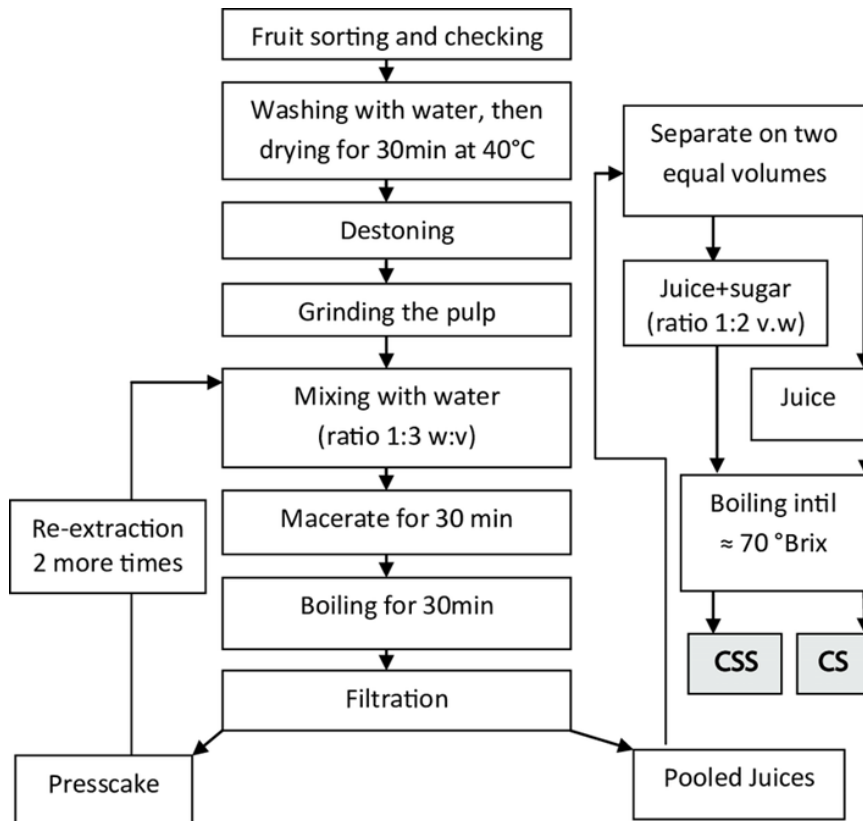


Figura 6. Esempio di diagramma di flusso per l'ottenimento dello sciroppo di carruba. Da notare come in un caso la metodologia di preparazione preveda l'aggiunta di zucchero al succo ottenuto dalla bollitura. Tale opzione non è prevista nel metodo tradizionale ed è stata inserita ai fini dello studio (Dhaouadi et al., 2014)

1.6.2 Applicazione di ultrasuoni

La tecnologia ad ultrasuoni che coadiuva il processo estrattivo è definita UAE (*Ultrasonic Assisted Extracion*). Tale processo, sfruttando il fenomeno della cavitazione, è in grado di migliorare le performance estrattive sia in termini di tempo che di risorse impiegate. Non di meno la tecnologia UAE permette di minimizzare i processi degradativi e ossidativi dei composti bioattivi presenti nella matrice alimentare riducendo il tempo necessario alla concentrazione degli zuccheri. Applicando gli ultrasuoni ad una frequenza di 37 kHz e una potenza di 100 W è possibile diminuire il rapporto solvente/massa e ottenere un succo ad una concentrazione zuccherina maggiore. Lo studio di Clodoveo et al. (2022) dimostra come questa tecnologia sia in grado di migliorare il processo produttivo dello sciroppo di carruba riducendo i tempi di concentrazione e di conseguenza sottoponendo il prodotto ad un minore stress

termico. Un trattamento termico meno marcato riduce la formazione di composti della caramellizzazione e delle reazioni di Maillard.

1.6.3 Utilizzi

Lo sciroppo di carruba trova impiego principalmente nella preparazione di prodotti dolciari. Più raramente è utilizzato come dolcificante o conservante per conserve di frutta. Si riportano di seguito alcune preparazioni tipiche (Papaefstathiou et al., 2018):

- **Cioccolato di carruba:** farina di carruba 60%, grassi vegetali, sciroppo di carruba 2%;
- **Praline con sciroppo di carruba:** zucchero, oli vegetali, proteine del siero di latte, nocciole, sciroppo di carruba 8%, farina di carruba, cacao;
- **Crema spalmabile di carruba:** sciroppo di carruba 53%, grassi vegetali, glucosio, latte, lecitine;
- **Crema di carruba tradizionale:** sciroppo di carruba 50%, tahini 50%;
- **Caramelle alla carruba:** sciroppo di carruba, glucosio, zucchero.

1.6.4 Valori nutrizionali

Lo sciroppo di carruba è composto per il 50% da zuccheri, di cui il 30% saccarosio e il 20% zuccheri riducenti (principalmente fruttosio e glucosio). Le proteine sono presenti in quantità molto modeste (< 0,5%) mentre i lipidi in quantità trascurabili. Interessante invece è il contenuto di minerali che si attesta attorno al 3%. Tra i macroelementi spiccano potassio (2%), calcio, magnesio e sodio, mentre ferro e zinco prevalgono fra i microelementi (Tounsi et al., 2020).

1.6.5 Proprietà salutistiche

Nello sciroppo di carruba sono presenti dei componenti bioattivi ai quali sono attribuite attività antiossidanti e antimicrobiche per l'organismo umano. Questi composti sono rappresentati principalmente da polifenoli, molecole derivanti dall'imbrunimento non enzimatico (HMF, melanoidine) e sostanze volatili (terpeni). Lo studio di Tounsi et al. (2020) indaga la presenza di tali composti e valuta la loro bioattività benefica *in vitro*:

- **Attività antiossidante:** Attraverso la valutazione della capacità anti-radicalica (*DPPH radical-scavenging ability*) e del saggio del potere antiossidante nelle

reazioni di riduzione del ferro (*FRAP: Ferric reducing antioxidant power*) emerge che lo sciroppo possiede elevate capacità antiossidanti e antiradicaliche paragonabili al BHT (antiossidante sintetico) utilizzato come standard;

- **Attività antibatterica:** lo sciroppo si è dimostrato capace di inibire la proliferazione di batteri patogeni e alteranti, tra i quali *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*. La sua attività è risultata comparabile o talvolta superiore a quella della gentamicina utilizzata come standard.

1.6.6 5-HMF e prodotti di Maillard

Come detto in precedenza l'esposizione della matrice alimentare ai trattamenti termici prolungati comporta la formazione di sostanze frutto di reazioni di imbrunimento non enzimatico. L'HMF (5-(idrossi-metil)-2-furaldeide) è considerato un parametro qualitativo del prodotto, dato che la sua presenza eccessiva è indice di trattamenti termici troppo spinti. La composizione iniziale del prodotto è in grado di comportare variazioni significative della concentrazione di tali composti. Il grado di maturazione, ad esempio, causa una diversa presenza amminoacidica, che viene in seguito coinvolta nelle reazioni. Anche la tipologia di zuccheri riducenti presenti determina una diversa reattività, basti pensare che il fruttosio possiede una capacità di reagire circa 40 volte superiore a quella del glucosio. L'analisi quantitativa di HMF può essere effettuata per via diretta (es: HPLC) ma spesso si utilizza la spettrofotometria, essendo la concentrazione del composto correlata ai valori colorimetrici L^*, a^*, b^* (*Browning Index*, assorbanza: 420 nm). Alti valori di rosso del parametro a^* sono sintomo di eccessivo imbrunimento dello sciroppo con una conseguente produzione di HMF. L'utilizzo di metodi analitici diversi può quindi influire sulla concentrazione rilevata (Tabella 2) (Tounsi et al., 2020).

Tabella 2. Concentrazioni di HMF in diversi campioni di sciroppo e diversi metodi analitici (Tounsi et al., 2020)

Tipologia di sciroppo di carruba	Concentrazione di HMF (mg/100g)
Sciroppo <i>homemade</i> (origine: Tunisia)	33,46 (HPLC)
Sciroppo industriale (origine: Tunisia)	31,98 (HPLC)
Sciroppo industriale (origine: Turchia)	2,13 (<i>Browning index</i>)

1.6.7 Polifenoli

Il contenuto in polifenoli dello sciroppo di carruba risulta notevole. Tuttavia, durante la fase di concentrazione il prodotto viene sottoposto ad una prolungata esposizione al calore, tale processo è in grado di ossidare i polifenoli presenti riducendone la concentrazione finale (Tounsi et al., 2020). I dati relativi al profilo polifenolico sono piuttosto discordanti in letteratura e differiscono tra loro principalmente in base al metodo analitico utilizzato (cromatografia o spettrofotometria). Altri fattori in grado di determinarne una variazione possono essere le caratteristiche del frutto di partenza e il processo produttivo. In generale, più della metà della frazione è costituita da acido gallico, mentre la presenza di altri composti fenolici è piuttosto variabile a seconda dello studio preso in considerazione. Si ritiene comunque opportuno riportare alcuni dati (Tabella 3).

Tabella 3. Dati sul profilo fenolico dello sciroppo di carruba. a: analisi spettrofotometrica, b: LC-ESI-MS, c: HPLC-DAD-ESI-MS, d: HPLC-UV-ESI-MS

Composti	Articoli scientifici			
	(Tounsi et al., 2020)	(Toufeili et al., 2022) ^b	(Dhaouadi et al., 2014) ^c	(Papagiannopoulos et al., 2004) ^d
Fenoli totali	16356 mg GAE/kg ^a	7290 mg GAE/kg ^a	6990 mg GAE/kg ^a	1084,9 mg/kg
Acido gallico	ND	1166 mg/kg	2746,83 mg/kg	1012,6 mg/kg
Acido cinnamico	ND	15 mg/kg	109,11 mg/kg	24,2 mg/kg
Acido cumarico	ND	12,9 mg/kg	13,88 mg/kg	9,9 mg/kg
Acido caffeico	ND	0,8 mg/kg	39,77 mg/kg	2,5 mg/kg
Acido siringico	ND	1,1 mg/kg	403,1 mg/kg	ND
Acido ferulico	ND	ND	ND	14,6 mg/kg
Quercetina	ND	1,3 mg/kg	447,64 mg/kg	0,9 mg/kg
Catechina	ND	0,7 mg/kg	447,86 mg/kg	9 mg/kg
Epicatchine	ND	ND	211,04 mg/kg	ND
Miricetina	ND	ND	71,27 mg/kg	11,2 mg/kg

1.6.8 Attività prebiotica

L'attività prebiotica dello sciroppo di carruba è attribuibile ai polifenoli e fruttoligosaccaridi (FOS) riscontrabili al suo interno. Nello specifico è stata rilevata la presenza di **1-kestosio** in una concentrazione che oscilla tra 0,2-0,3 g/100g (sostanza secca), il che ne presuppone una valenza prebiotica (Fidan et al., 2020). Sebbene questo FOS sia naturalmente presente nel prodotto, è possibile aumentarne la quantità permettendo la formazione di kestosio *in situ* (sottoforma di **6-kestosio**) grazie al corredo enzimatico (levansucrasi) ottenuto da batteri selezionati. È altrettanto possibile sintetizzare FOS separatamente attraverso l'idrolisi di **inulina** mediante un processo enzimatico (fruttosiltransferasi) per poi aggiungerli al prodotto in un secondo momento (Taştan et al., 2019). L'1-kestosio (noto anche come 1-kestotriosio) è un trisaccaride formato da una molecola di D-fruttosio legata ad una molecola di saccarosio mediante un legame $\beta(1\rightarrow2)$ glicosidico (Figura 7). La molecola è tra i FOS più diffusi in natura (National Center for Biotechnology Information, 2024).

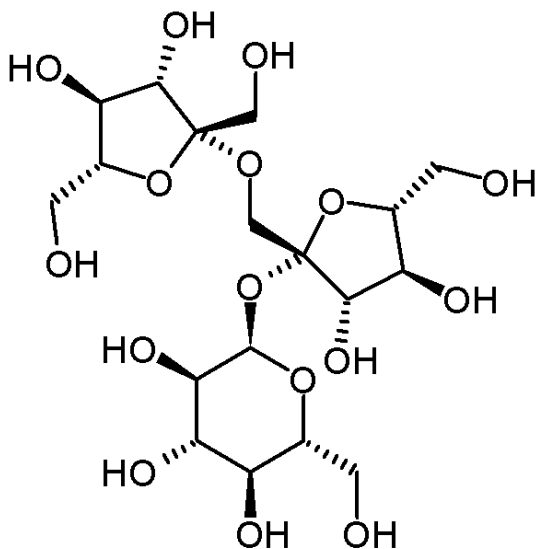


Figura 7. Molecola di 1-kestosio. Fonte: By akane700 - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=13359911>

1.7 Il progetto GourMed

Il presente lavoro di tesi è incentrato su un lavoro di ricerca inserito in un più ampio progetto europeo: GourMed PRIMA. Il progetto GourMed mira a fornire nuovi modelli di *governance* (e operativi) ottimizzati e innovativi per le filiere agroalimentari, con uno sguardo attento alla qualità alimentare, alla redditività e alla sostenibilità. Il fine è quello di potenziare la *value chain* delle filiere del Mediterraneo (specialmente nei confronti delle importazioni a basso costo) e per bilanciare potere e appropriazione del valore tra gli attori delle filiere del Mediterraneo.

1.7.1 Obiettivi generali del progetto.

Il progetto mira al raggiungimento di quattro scopi generali (Figura 8):

1: Comprendere i meccanismi della *value chain* e del giusto valore dei piccoli attori nelle filiere alimentari; **2:** Fornire una strategia multi-attore e i suoi strumenti di implementazione per aumentare la competitività delle filiere agroalimentari; **3:** Implementare e utilizzare nella vita reale progetti pilota per valutare gli impatti del progetto generale e convalidare i risultati; **4:** Fornire linee guida e criteri che consentano l'implementazione di filiere agroalimentari sostenibili nel Mediterraneo.

Le filiere agroalimentari sulle quali si focalizza il progetto sono quella dei cereali, del pomodoro e della carruba.

1.7.2 Il consorzio del progetto.

Il progetto è gestito e coordinato da un consorzio di cinque paesi (tre europei e due africani):

- Centro di ricerca e tecnologia Hellas – Istituto ellenico dei trasporti (CERTH/HIT) - **Grecia**
- Università dell'Egeo – Dipartimento di Scienze dell'Alimentazione e della Nutrizione (UoA – FSN) - **Grecia**
- Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari (UNIBO – DISTAL) - **Italia**
- Università di Biskra, Dipartimento di Scienze Agrarie (DASUB) - **Algeria**
- Istituto per la ricerca energetica e ambientale Heidelberg gGmbH (ifeu) - **Germania**

- Institute Supérieur de Biotechnologie de Monastir (ISBM), Laboratorio di ricerca Biorisorse: Biologia Integrativa e Valorizzazione (BIOLIVAL) - **Tunisia**

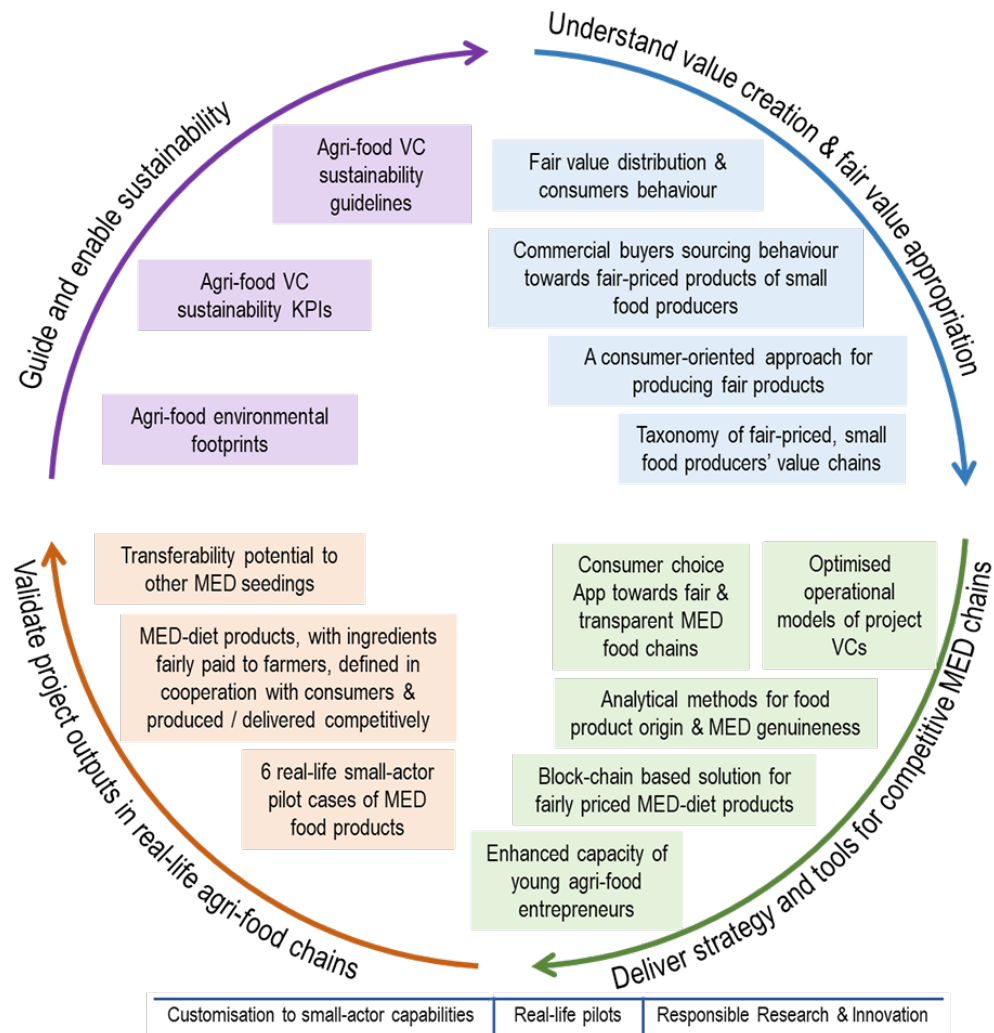


Figura 8. Obiettivi generali del progetto GourMed. Fonte: <https://www.gourmed-prima.com/>

1.8 Prebiotici

Gibson & Roberfroid (1995) definiscono come prebiotici: “*gli ingredienti alimentari non digeribili che influiscono positivamente sull'ospite stimolando selettivamente la crescita e/o l'attività di una o un numero limitato di specie batteriche già residenti nel colon e tentando quindi di migliorare la salute dell'ospite*”. In particolare, sono ritenuti prebiotici i composti in grado di supportare la crescita di batteri intestinali appartenenti ai generi *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (*Lactiplantibacillus* secondo la nuova classificazione tassonomica, non ancora introdotta all'epoca dello studio citato. n.d.r.). Con il progredire della ricerca si è arrivati ad aggiornare la definizione di alimento prebiotico attribuendo a tali alimenti tre principali criteri: 1) resistenza all'acidità gastrica, all'idrolisi enzimatica dei secreti digestivi e all'assorbimento del tratto intestinale; 2) fermentescibilità da parte della microflora intestinale dell'ospite; 3) capacità di promuovere una crescita selettiva dei microrganismi reputati positivi per il benessere generale dell'ospite. Grazie a questo tipo di approccio sistematico è possibile valutare con criteri oggettivi la capacità prebiotica dei composti presenti negli alimenti. L'analisi della capacità prebiotica di un alimento può essere eseguita *in vitro* o *in vivo*. Le indagini *in vitro* possono essere condotte su singole colture pure o su complessi di colture batteriche di origine fecale. In entrambi i casi risulta difficile attribuire capacità prebiotiche ad un composto con queste tecniche. Dimostrare l'efficacia del terzo criterio, infatti, risulta particolarmente ostico, in quanto né il complesso di batteri fecali né tantomeno le colture singole sono in grado di rappresentare l'enorme complessità di interazioni batteriche che avvengono al livello della popolazione microbica intestinale. È per questo motivo che l'azione prebiotica dovrebbe essere valutata con tecniche di microbiologia molecolare al fine di valutare i cambiamenti della composizione microbica (Gibson et al., 2004). Nel corso degli anni la comunità scientifica ha dibattuto a lungo sui criteri che un composto deve soddisfare per poter essere ritenuto un prebiotico. Si è infine giunti nel 2016 (attraverso un *Consensus Statement*) alla definizione che attualmente è possibile utilizzare per descrivere un prebiotico: “*un substrato che viene utilizzato selettivamente dai microrganismi dell'ospite conferendo un beneficio alla salute*”. Il concetto di prebiotico non è pertanto più limitato alla popolazione microbica intestinale ma viene esteso anche alle

1.8.2 Fruttani e FOS

I **fruttani** sono polimeri formati da catene di β -D-fruttosio uniti tra loro da legami $\beta(1\rightarrow2)$ glicosidici e presentano un'estremità di α -D-glucosio legata alla catena tramite un legame $\alpha(1\rightarrow2)$ glicosidico (lo stesso presente nel saccarosio). Più formalmente sono definiti come: α -D-glucopiranosil-[- β -D-fruttofuranosil]_{n-1}- β -D-fruttofuranoside, in generale GF_n (G: glucosio; F: fruttosio; n: numero di molecole). La lunghezza n della catena è variabile, da n=3 (GF₃: kestosio) fino a n=30 e prendono il nome di frutto-oligosaccaridi (FOS, o talvolta oligo-fruttani). Le catene di lunghezza maggiore sono comunemente chiamate inuline. I FOS possono essere ottenuti mediante idrolisi enzimatica dell'inulina utilizzando l'inulinasi (β -fruttosidasi, EC 3.2.1.7), tipicamente estratta da *Aspergillus niger*. Questi enzimi sono in grado di idrolizzare il legame β -glicosidico della catena e formare sub-unità di lunghezza minore (Gibson et al., 2004). Questi composti sono tipici del mondo vegetale: se ne riscontra la presenza in *Liliaceae* e *Brassicaceae* e sono abbondantemente presenti in *Asteraceae* come la cicoria (*Cichorium intybus* L.) e il carciofo (*Cynara cardunculus scolymus* (L.) Hayek). I FOS (insieme ai GOS) sono i composti prebiotici maggiormente studiati e la loro attività prebiotica è robustamente dimostrata in letteratura scientifica. I FOS hanno la capacità di superare la barriera gastrica intatti e di non subire l'idrolisi da parte degli enzimi digestivi. Sono collocati infatti all'interno della categoria nutrizionale delle fibre alimentari. Giunti nel tratto enterico sono fermentati selettivamente dai batteri intestinali, specialmente dal genere *Bifidobacterium*, che mostra una particolare predilezione per questo tipo di fibra fermentescibile (Gibson et al., 2004).

1.8.3 Polifenoli

I polifenoli sono una classe di composti organici presenti in natura all'interno di un'ampia varietà di vegetali. I polifenoli hanno una struttura piuttosto eterogenea strettamente legata alla fonte dalla quale provengono, ma tutti sono accomunati dalla presenza di unità strutturali fenoliche (anelli aromatici idrossilati). Sono classificati in gruppi quali: acidi fenolici, cumarine e flavonoidi. Sono ben note le loro proprietà potenzialmente benefiche per l'organismo, principalmente attribuite all'attività antiossidante e antinfiammatoria. L'attività prebiotica dei polifenoli è invece legata alla loro capacità di essere un substrato metabolico per alcuni batteri intestinali. Questi

composti, pur essendo in parte assorbiti nel primo tratto enterico, giungono in quantità considerevole nel colon e quindi possono essere disponibili per il microbiota. L'assunzione media stimata di polifenoli nella dieta è di 900/1000 mg/die, che rappresenta una quantità considerevole, anche se strettamente legata alle abitudini alimentari individuali. All'acido gallico, ad esempio, è stata attribuita la capacità di incrementare l'attività del microbiota, ma anche alla quercetina, alla miricetina e al kaempferolo (Plamada & Vodnar, 2022).

1.9 Probiotici ed enterobatteri

Il microbiota umano è rappresentato dall'insieme di microrganismi, soprattutto batteri, che vivono in simbiosi con l'organismo umano. È composto da una grande varietà biologica. Si contano circa 50 phyla differenti, tra cui si identificano più di 1500 specie. I phyla predominanti sono *Firmicutes* e *Bacteroidetes* che da soli rappresentano il 90% del totale, seguiti da *Proteobacteria* e *Actinobacteria*. Il colon è l'area del corpo con la maggiore carica microbica, circa 10^{13-14} UFC/g. La colonizzazione del tratto intestinale da parte dei microbi ha inizio al momento della nascita quando il neonato passa dall'ambiente sterile intrauterino a quello esterno ricco di microrganismi. La composizione del microbiota è solitamente piuttosto stabile ma può modificarsi in parte durante il corso della vita a seconda di molteplici fattori come età, alimentazione, ambiente e stile di vita, rendendo l'ecosistema microbico colonizzante un tratto distintivo dell'individuo. Questa modificazione del microbiota può avere effetti positivi o negativi sulla salute, se si favorisce rispettivamente la crescita di organismi benefici o antagonisti (Kerry et al., 2018; Gul et al., 2024)

1.9.1 Probiotici

La comunità scientifica internazionale ha definito come probiotici i microrganismi vivi che, se somministrati in quantità adeguate, conferiscono un beneficio alla salute dell'ospite. Alcune definizioni introdotte in seguito specificano criteri più selettivi includendo anche la necessità di indicare il meccanismo e sito di azione. La tendenza generale però è quella di non applicare criteri così selettivi per non escludere le interazioni di cui non sono ancora noti i meccanismi di azione (Sanders, 2008). Nel

corso degli ultimi anni sono stati compiuti significativi progressi nella selezione e caratterizzazione di colture probiotiche in grado di apportare benefici per il consumatore. La maggior parte dei probiotici sono batteri e i più rilevanti e studiati si insediano e si sviluppano nell'intestino crasso, soprattutto a livello del colon. I più importanti generi batterici a cui sono attribuite funzioni probiotiche sono: *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium*. Tra questi i più utilizzati sono i batteri lattici e i bifidobatteri (Gul et al., 2024; Kerry et al., 2018). Nella tabella 4 sono riportate le principali specie e altri generi di probiotici.

Tabella 4. Generi e specie di probiotici (Kerry et al., 2018)

Genere	Specie
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. bulgaricus</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. jensenii</i> , <i>P. freudenreichii</i>
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>P. productus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. laterosporus</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. sanguis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. salivarius</i>

<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. longum, B. catenulatum, B. breve, B. animalis, B. bifidum</i>
<i>Bacteroides</i>	<i>B. uniformis</i>
<i>Akkermansia</i>	<i>A. muciniphila</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardii</i>

L'introduzione di probiotici provoca una parziale modificazione del microbiota locale, soprattutto a livello intestinale, favorendone l'eubiosi. Questo può comportare molteplici benefici per la salute, specialmente a livello del colon ma non solo; gli effetti variano in funzione sia dell'individuo sia della quantità e dei ceppi di microrganismi utilizzati. Tra i probabili effetti positivi spiccano i seguenti, molti dei quali legati tra loro attraverso diversi possibili meccanismi biochimici:

- Aumento della biodisponibilità di vitamine e minerali e miglioramento dello stato nutrizionale;
- Mantenimento della salute intestinale, orale e urogenitale grazie all'inibizione dei microrganismi patogeni o dannosi attraverso la competizione, la produzione di composti bioattivi e la stimolazione dei sistemi di difesa dell'ospite;
- Mantenimento e promozione della funzionalità del sistema immunitario;
- Attività antinfiammatoria e angiogenica;
- Influenza sull'attività del sistema nervoso.

Questi effetti sono ritenuti coinvolti nel processo di guarigione delle ferite e nel prevenire, ostacolare o aiutare il trattamento di diverse condizioni patologiche come il diabete mellito, l'obesità, l'osteoporosi, le allergie, le malattie autoimmuni, il cancro e l'autismo. Tuttavia, mancano ancora sufficienti evidenze scientifiche a conferma delle ipotesi proposte (Kerry et al., 2018; Gul et al., 2024).

1.9.2 Microflora antagonista: *Enterobacteriaceae*

Questa famiglia di batteri ricopre un ruolo importante nell'ecosistema microbico intestinale. Sebbene siano sempre presenti all'interno del microbiota fin dalla nascita, la loro presenza è tenuta sotto controllo dall'azione della microflora positiva. Nello stato di eubiosi, infatti, rappresentano una quota marginale rispetto al totale. In numerosi studi si osserva come la disbiosi si manifesti in primo luogo con una crescita incontrollata di questi batteri a discapito dei batteri lattici e bifidobatteri. Sono state studiate le correlazioni tra la crescita incontrollata degli enterobatteri e il manifestarsi di stati infiammatori del tratto intestinale che possono sfociare anche in sintomi acuti gravi. La specie più rappresentativa di questa famiglia è *Escherichia coli* AIEC (aderente invasiva), la cui sovrappopolazione è ritenuta responsabile di stati infiammatori intestinali come il morbo di Chron (Baldelli et al., 2021).

2 Obiettivo

L'obiettivo del presente lavoro è quello di valutare l'attività prebiotica di tre diversi campioni di sciroppi di carruba prodotti in Tunisia, ottenuti mediante processi artigianali in contesti rurali. La valutazione prebiotica verrà condotta confrontando i prodotti pilota con tre campioni *benchmark* recuperati nel mercato della grande distribuzione europea. La comparazione ha lo scopo di evidenziare la presenza di modificazioni dell'attività prebiotica degli sciroppi in funzione del contesto nel quale sono stati prodotti. Nel processo di analisi verranno prese in considerazione anche la presenza di composti volatili per valutare le possibili correlazioni con l'attività prebiotica degli sciroppi.

3 Materiali e metodi

3.1 Descrizione dei campioni

Il set di campioni oggetto di studio è composto da sei sciropi. Tre di questi sono prodotti pilota provenienti da zone rurali della Tunisia ottenuti con processi domestici che si rifanno alla tradizione gastronomica locale. Nello specifico sono: **CARS1**, **CARS2**, **CARS3**. I restanti tre rappresentano il *benchmark*, reperiti sul mercato della grande distribuzione di Italia, Grecia, Cipro e sono rispettivamente: **CARIT**, **CARGR**, **CARCY**. La tabella 5 riassume il set di campioni descritto.

Tabella 5. Descrizione del set di campioni oggetto di studio

Categoria	Codice	Provenienza
Prodotti pilota <i>(origine rurale)</i> 	CARS1	Teboulba (Tunisia)
	CARS2	Bekalta (Tunisia)
	CARS3	Moknine (Tunisia)
<i>Benchmark</i> <i>(grande distribuzione)</i> 	CARIT	Sicilia (Italia)
	CARGR	Creta (Grecia)
	CARCY	Cipro

3.2 Valutazione dell'attività prebiotica

La valutazione dell'attività prebiotica è condotta applicando tre protocolli diversi, all'occorrenza adattati alle diverse matrici alimentari dei prodotti pilota. Il primo protocollo è l'indice prebiotico quantitativo nei confronti dei lattobacilli (Fissore et al., 2015; Nissen et al., 2020) e l'attività bifidogenica quantitativa (Candela et al., 2005) mentre il terzo è il potenziale prebiotico (Nissen et al., 2021; Casciano et al., 2021). Tutti i ceppi microbici testati sono commerciali o di proprietà della collezione microbica del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-alimentari dell'Università di Bologna e sono stati precedentemente isolati da prodotti a base vegetale e ampiamente studiati. I ceppi oggetto di studio sono: *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* 98 b, *Limosilactobacillus fermentum* MR13, *Lacticaseibacillus rhamnosus* C1112, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 700795, *Bifidobacterium lactis* BL-04, *Bifidobacterium bifidum* BB-06, *Bifidobacterium breve* BB-03, *Bifidobacterium longum* BL-05, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *E. coli* 555, coltivati da stock di glicerolo conservati a -80 °C e propagati in terreni selettivi (Oxoid, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in condizioni specifiche (Nissen et al., 2020).

3.3 Indice di attività prebiotica (*prebiotic score*)

L'indice prebiotico è stato calcolato con formula e metodo precedentemente descritti da Fissore et al. (2015) e Nissen et al. (2020) (Figura 11). È stato inserito 1 mL di campioni di sciroppo in 9 mL di terreno di coltura. Il FOS dalla cicoria (Sigma, USA) è stato utilizzato come controllo positivo prebiotico. I terreni utilizzati come controllo per calcolare i punteggi prebiotici sono stati invece addizionati di 1 g/dL di glucosio. I ceppi batterici sono stati tutti utilizzati a una concentrazione finale di 6 log UFC/mL (Fissore et al., 2015; Nissen et al., 2020). La formula per l'attività bifidogenica è stata precedentemente pubblicata (Candela et al., 2005).

Att. Prebiotica

$$= \left(\frac{\text{Probiotico (log UFC/mL) in prebiotico @48h} - \text{Probiotico (log UFC/mL) in prebiotico @0h}}{\text{Probiotico (log UFC/mL) in glucosio @48h} - \text{Probiotico (log UFC/mL) in glucosio @0h}} \right) - \left(\frac{E. coli \text{ (log UFC/mL) in prebiotico @48h} - E. coli \text{ (log UFC/mL) in prebiotico @0h}}{E. coli \text{ (log UFC/mL) in glucosio @48h} - E. coli \text{ (log UFC/mL) in glucosio @0h}} \right)$$

Figura 11. Formula per il calcolo dell'attività prebiotica

3.4 Conteggio microbico su terreni selettivi

Per tutti i batteri, 1 mL di ciascun campione è stato trasferito asepticamente in un tubo sterile con 9 mL di soluzione fisiologica (0,9 g/dL NaCl) per essere diluito serialmente (1/10) e piastrato in duplicato tecnico. I lattobacilli e il pool sono stati contati su agar MRS (Oxoid, Thermo Fisher Scientific, USA) dopo incubazione per almeno 24 ore a 37 °C in contenitori con catalizzatore anaerobico (Oxoid, Thermo Fisher Scientific, USA). Il *B. bifidum* NCIMB 700795 è stato contato su agar MRS integrato con 0,005 g/dL di L-cisteina (Sigma, USA) dopo incubazione nelle stesse condizioni dei lattobacilli (Tabella 6). *E. coli* ATCC 25922 è stato contato su agar BHI (Oxoid, Thermo Fisher Scientific, USA) a 37 °C per 24 ore (Figura 10).

Tabella 6. Composizione dei terreni di coltura utilizzati

Terreno	Ingredienti (g/L)
MRS (Thermo Fisher Scientific, USA)	Peptone 10.0; 'Lab-Lemco' polvere 8.0; Estratto di lievito 4.0; Glucosio 20.0; Sorbitano oleato 1.0; Dipotassio idrogeno fostato 2.0; Sodio acetato 3H ₂ O 5.0; Triammonio citrato 2.0; Magnesio solfato 7H ₂ O 0.2; Manganese solfato 4H ₂ O 0.05
BHI (Thermo Fisher Scientific, USA)	Cervello suino (infuso solido) 12.5; Cuore bovino (infuso solido) 5.0; Peptone 10.0; Glucosio 2.0; Sodio cloruro 5.0; Disodio fosfato 2.5

Fonte: Thermo Scientific™: <https://www.thermofisher.com/>

3.5 Enumerazione microbica tramite real-time PCR

Il DNA batterico dai brodi per il saggio di attività prebiotica è stato estratto con il kit di estrazione del DNA Nucleo Spin Food (Macherey-Nagel, Germania). Gli standard

genetici per la qPCR sono stati preparati da prodotti PCR diluiti serialmente (1/10) ottenuti amplificando bersagli genici con primer specifici utilizzando il sistema ProFlex PCR (Thermo Fisher Scientific, USA) e SuperFi Platinum Taq (Thermo Fisher Scientific, USA), e purificati con il kit di purificazione GeneJet PCR (Thermo Fisher Scientific, USA). La qPCR è stata eseguita con un QuantStudio 5 (Applied Biosystem, USA) e il software QuantStudio Design and Analyse 2.1 (Applied Biosystem, USA). Le coppie di primer, le reazioni PCR e qPCR sono state utilizzate secondo protocolli precedentemente pubblicati (Nissen et al., 2020).

3.6 Microestrazione in fase solida – gascromatografia - spettrometria di massa (SPME-GC-MS)

La valutazione dei composti organici volatili (VOCs) è stata effettuata utilizzando un gascromatografo Agilent 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) accoppiato ad uno spettrometro di massa Agilent Technologies 5975 che opera in modalità di impatto elettronico (energia di ionizzazione di 70 eV) dotato di una colonna capillare Chrompack CP-Wax 52 CB (lunghezza 50 m, ID 0,32 mm) (Chrompack, Middelburg, Paesi Bassi). Il protocollo SPME-GC-MS (*Solid Phase Micro-Extraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) e l'identificazione di composti volatili sono stati eseguiti come indicato in precedenti rapporti, con piccole modifiche (Taneyo-Saa et al 2014; Nissen et al., 2020). Brevemente: 3 mL di campione sono stati collocati in flaconcini di vetro da 10 mL e sono stati aggiunti 10 µL di 4-metil-2-pentanololo (concentrazione finale: 4 mg/L) come standard interno. I campioni sono stati quindi equilibrati per 10 min a 45°C. La fibra SPME rivestita con carboxen-polidimetilsiloxano (85 µm) è stata esposta a ciascun campione per 40 minuti. Le fasi di pre-condizionamento, assorbimento e desorbimento dell'analisi SPME-GC e tutte le procedure di elaborazione dei dati sono state condotte secondo precedenti pubblicazioni (Taneyo-Saa et al., 2014). Prima di ogni campionamento dello spazio di testa, la fibra è stata esposta all'ingresso del gascromatografo per 10 minuti per il desorbimento termico a 250 °C in un campione vuoto. I campioni sono stati poi equilibrati per 10 min a 40 °C. La fibra SPME è stata esposta ad ogni campione per 40 min ed infine è stata inserita nella porta di iniezione del gascromatografo per un desorbimento del campione di 10 minuti. Il programma di temperatura è stato: 50°C

per 1 min, successivamente programmato a 1,5°C/min fino a 65 °C, ed infine a 3,5°C/min fino a 220 °C, temperatura che è stata mantenuta per 25 minuti. Le temperature dell'iniettore, dell'interfaccia e della sorgente ionica erano rispettivamente di 250, 250 e 230°C. Le iniezioni sono state effettuate in modalità *splitless* e l'elio (3 mL/min) è stato utilizzato come gas vettore. L'identificazione delle molecole è stata effettuata ricercando spettri di massa nei database disponibili (versione NIST). Ogni VOC è stato quantificato relativamente in percentuale. Alla linea di base, invece, i principali metaboliti microbici legati all'attività prebiotica sono stati quantificati assolutamente in mg/kg. Tutti i risultati sono stati espressi come valori medi normalizzati ottenuti da due esperimenti indipendenti ripetuti due volte. Il protocollo SPME-GC-MS e l'identificazione dei composti volatili sono stati pubblicati precedentemente (Belletti et al., 2004). L'identificazione delle molecole è stata effettuata confrontando i loro tempi di ritenzione con quelli dei composti puri nei database disponibili (versione NIST 2011).

3.7 Potenziale prebiotico

Il potenziale prebiotico è stato ottenuto mediante confronto statistico dei risultati ottenuti dalle analisi microbiche e metaboliche, nonché di alcuni dati fisiologici, come pH e a_w , o nutrizionali. Questo studio è stato condotto impiegando dataset normalizzati di entrambi i tipi di variabili significative (microbiche e fisiologico-nutrizionali) in un'analisi di correlazione di rango di Spearman, poi visualizzata nell'ambiente R con una *heatmap* bidirezionale che descrive anche la gerarchia del dendrogramma (Casciano et al., 2021).

3.8 Analisi statistica

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando Statistica 8.0 (Tibco Inc., USA). La normalità è stata verificata con il test di Shapiro-Wilk e l'omoschedasticità è stata valutata con il test di Levene. Le differenze tra tutti i campioni sono state valutate con l'analisi della varianza (ANOVA), mentre le correlazioni di rango di Spearman e la *heatmap* bidirezionale sono state utilizzate per studiare la relazione tra le variabili. Per il test *post-hoc* è stato impiegato il test HSD di Tukey. Per le correlazioni di rango di

Spearman i dati sono stati normalizzati utilizzando il metodo del *mean centering*. Tutti i risultati sono espressi come valori medi ottenuti da almeno lotti duplicati in due esperimenti indipendenti. I risultati della qPCR sono espressi come valori medi di tre replicati da due esperimenti indipendenti.

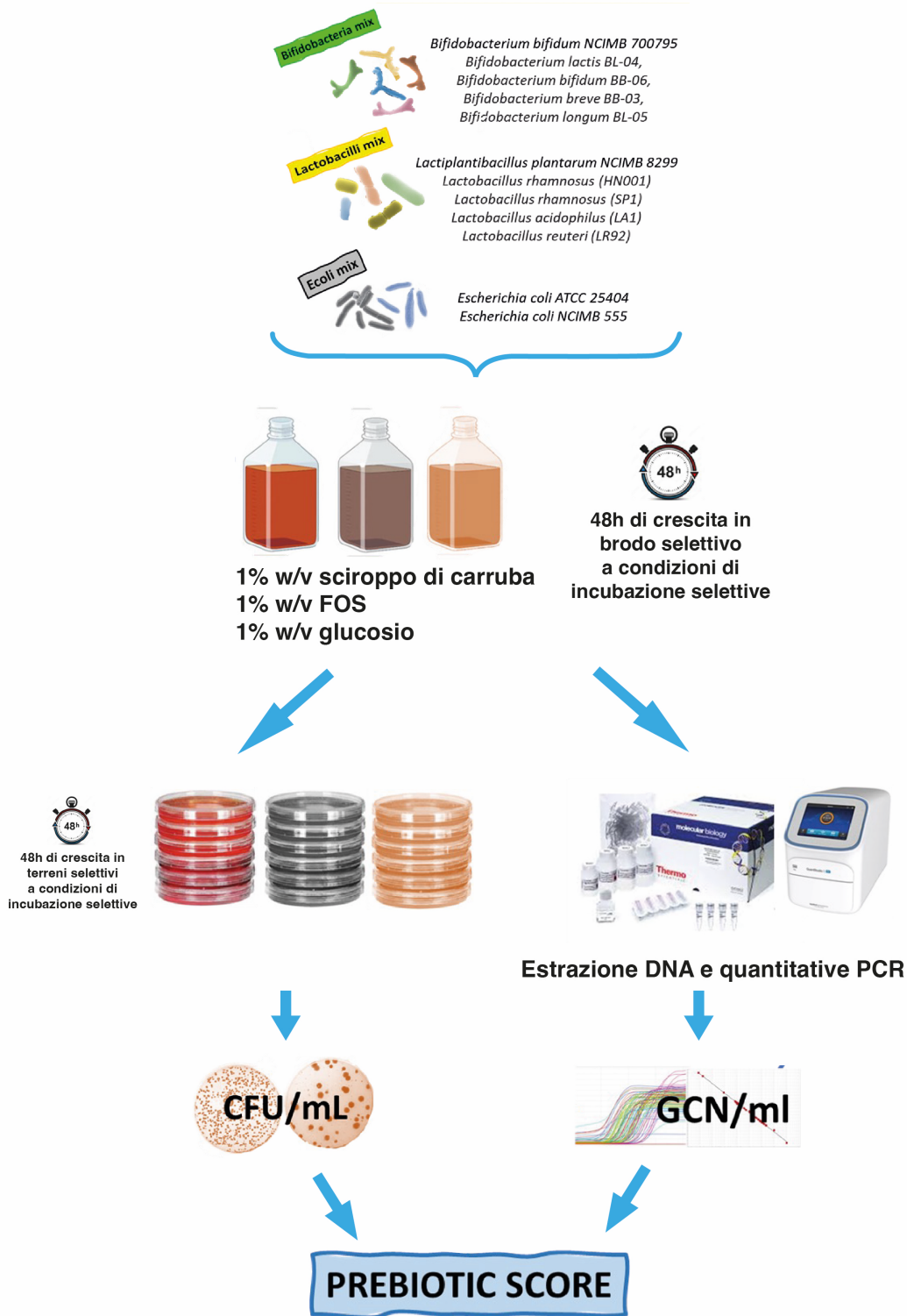


Figura 10. Schema procedurale per la determinazione dell'indice di attività prebiotica

4 Risultati e discussione

4.1 Valutazione Prebiotica

4.1.1. Crescita batterica selettiva sui prodotti pilota

Lo studio ha valutato la crescita batterica selettiva in presenza di sciroppo di carruba utilizzando indipendentemente tre diversi mix di batteri: lattobacilli, bifidobatteri ed *Escherichia coli*. La crescita è stata analizzata utilizzando terreni di coltura con l'aggiunta del 10% p/v di campioni di sciroppo di carruba provenienti da tre aree tunisine (CARS1 da Teboulba, CARS2 da Bekalta, CARS3 da Moknine) e tre prodotti di riferimento dall'Italia (CARIT), dalla Grecia (CARGR) e da Cipro (CARCY).

Mix di Lattobacilli: i campioni di Grecia (CARGR) e Cipro (CARCY) mostrano una crescita simile al controllo positivo FOS ($9,87 \pm 1,13$ log cellule/mL), con valori di $9,43 \pm 1,99$ log cellule/mL e $9,86 \pm 1,25$ log cellule/mL, rispettivamente; il pilota tunisino (CARS2) risulta paragonabile a CARGR e CARCY, con un valore di $9,43 \pm 1,01$ log cellule/mL (Figura 11A).

Mix di Bifidobatteri: il pilota tunisino (CARS3) presenta una crescita maggiore rispetto a qualsiasi altro prodotto pilota o di riferimento, con un valore di $9,49 \pm 2,40$ log cellule/mL, simile al controllo positivo FOS ($9,61 \pm 2,64$ log cellule/mL) (Figura 11B).

Mix di *Escherichia coli*: il pilota tunisino (CARS2) ha mostrato la crescita maggiore del mix, con un valore di $9,31 \pm 2,82$ log cellule/mL, ma simile ai controlli positivo e negativo (Figura 11C). Gli altri prodotti pilota hanno limitato la crescita del mix di *E. coli* con maggiore intensità, con valori di $8,92 \pm 1,04$ log cellule/mL per CARS1 e $9,32 \pm 1,55$ log cellule/mL per CARS3.

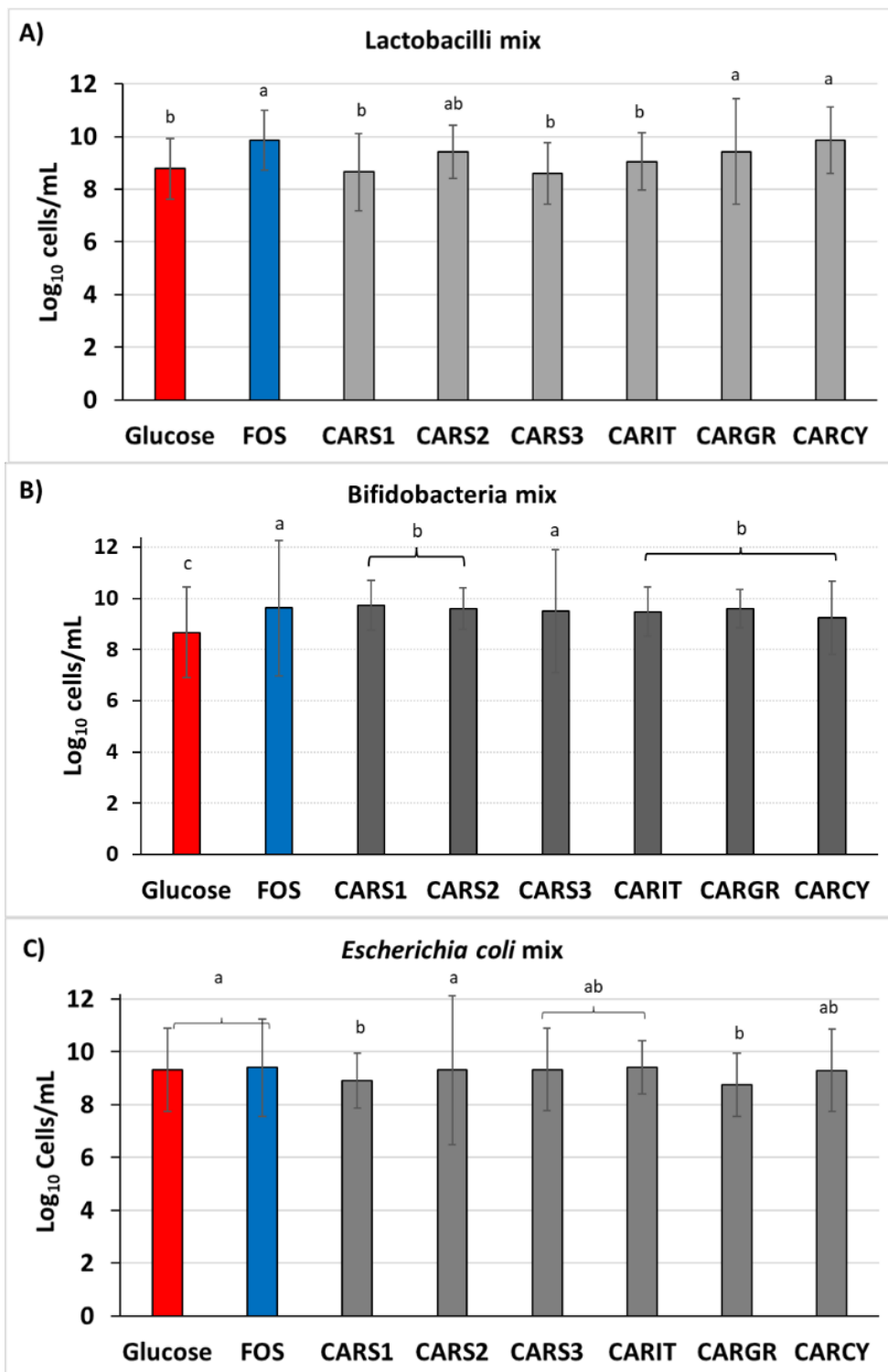


Figura 11. Crescita batterica selettiva sui prodotti pilota di sciroppo di carruba e sui *benchmark* di sciroppo di carruba. Glucosio = controllo negativo; FOS (Frutto-oligosaccaridi) = controllo positivo. CARS1 = Sciroppo di carruba dal pilota tunisino Teboulba; CARS2 = Sciroppo di carruba dal pilota tunisino Bekalta; CARS3 = Sciroppo di carruba dal pilota tunisino Moknine; CARIT = *Benchmark* di sciroppo di carruba dalla grande distribuzione italiana; CARGR = *Benchmark* di sciroppo di carruba dalla grande distribuzione greca; CARCY = *Benchmark* di sciroppo di carruba dalla grande distribuzione cipriota. A) Crescita aerobica su agar MRS del mix di lattobacilli; B) Crescita anaerobica su agar MRS cisteina del mix di bifidobatteri; C) Crescita aerobica su agar BHI del mix di *Escherichia coli*

4.1.2 Indice di attività prebiotica (*prebiotic score*)

L'indice di attività prebiotica dei FOS nei confronti del mix di lattobacilli è $0,36 \pm 0,11$, che risulta in linea con i valori riportati in letteratura (Figura 12A). Lo sciroppo di carruba ha mostrato un'attività prebiotica nei confronti del mix di lattobacilli con intensità diverse a seconda del prodotto. In particolare, il prodotto pilota CARS2 mostra un'attività prebiotica simile a quella del controllo positivo FOS e dei due *benchmark* CARGR e CARCY, e una attività prebiotica superiore rispetto al *benchmark* italiano CARIT. CARS1 ha avuto un'attività prebiotica simile a CARIT, mentre CARS3 non ha mostrato attività prebiotica verso i lattobacilli. Tutti i campioni oggetto di studio hanno mostrato attività prebiotica nei confronti di bifidobatteri. In particolare, il punteggio prebiotico del prodotto pilota CARS1 è stato il più alto, simile a quello del prodotto di riferimento greco CARGR. Interessante notare come questo punteggio risulti superiore a quello del FOS e dei *benchmark* italiani e ciprioti (Figura 12B).

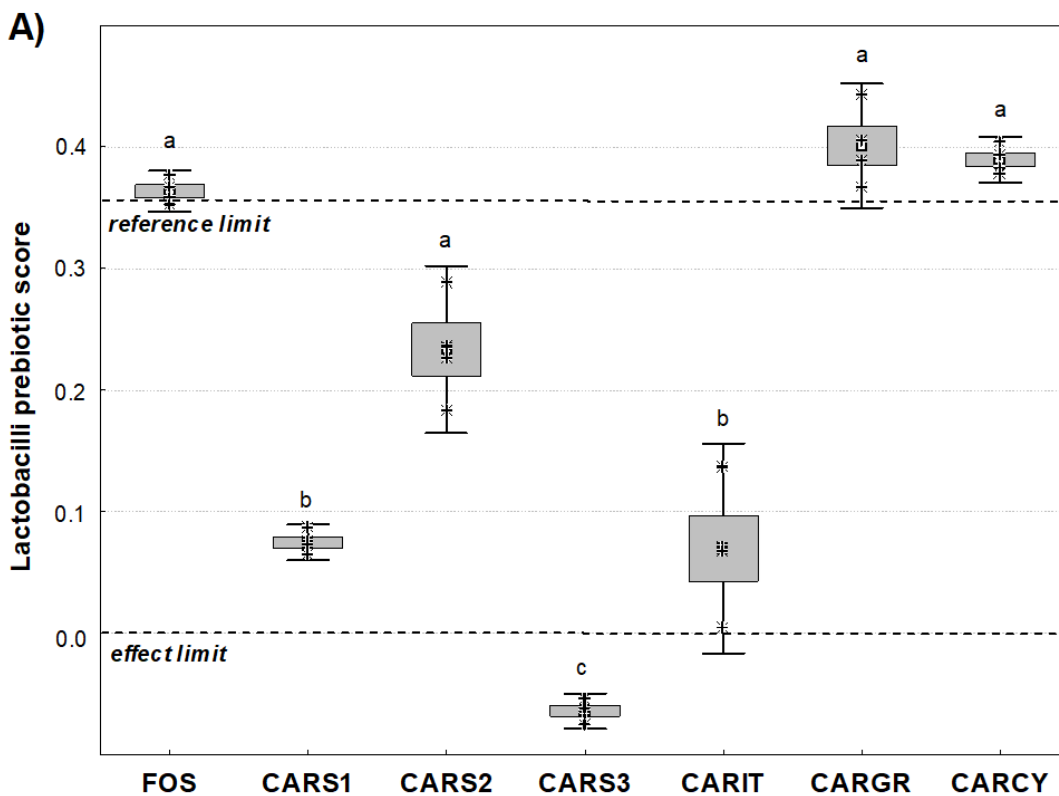


Figura 12A. Indice di attività prebiotica nei confronti di ceppi probiotici di lattobacilli. CARS1 = Sciroppo di carruba dal prodotto pilota tunisino Teboulba; CARS2 = Sciroppo di carruba dal prodotto pilota tunisino Bekalta; CARS3 = Sciroppo di carruba dal prodotto pilota tunisino Moknine; CARIT = *Benchmark* di sciroppo di carruba proveniente dalla grande distribuzione italiana; CARGR = *Benchmark* di sciroppo di carruba proveniente dalla grande distribuzione greca; CARCY = *Benchmark* di sciroppo di carruba proveniente dalla grande distribuzione cipriota.; FOS (Frutto-oligosaccaridi) = controllo positivo

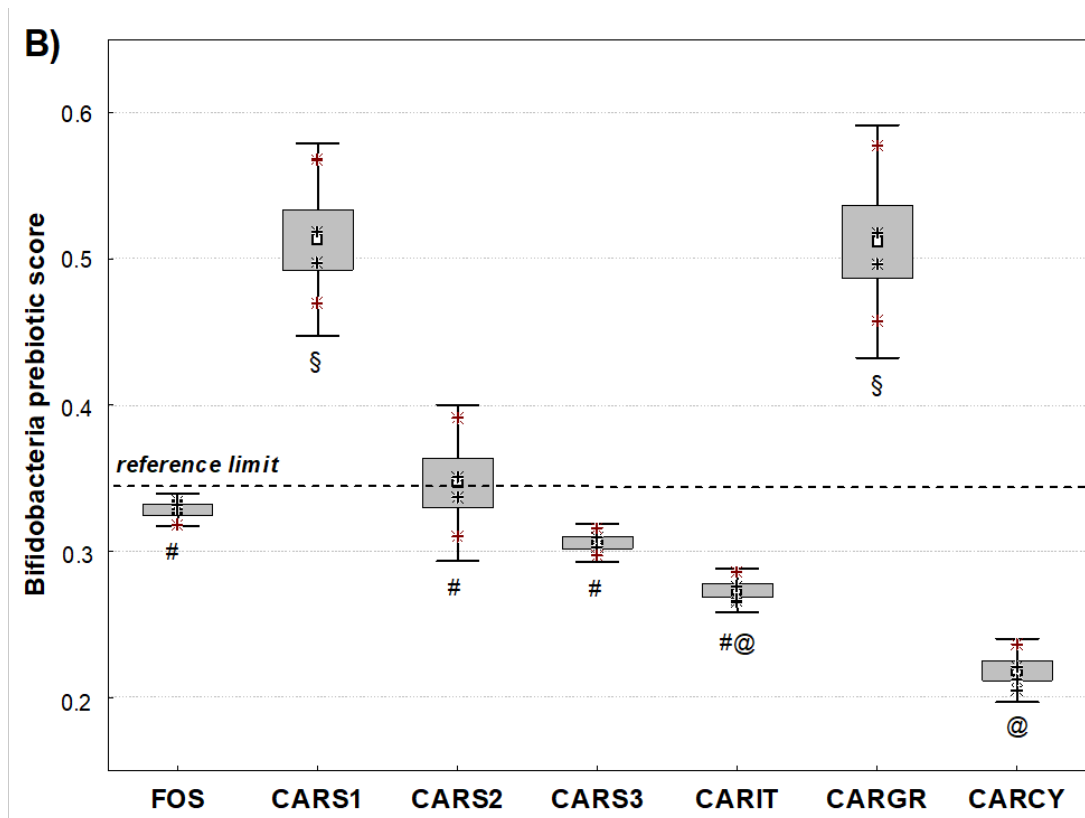


Figura 12B. Indice di attività prebiotica nei confronti di ceppi probiotici di bifidobatteri. CARS1 = Sciroppo di carruba dal prodotto pilota tunisino (Teboulba); CARS2 = Sciroppo di carruba dal prodotto pilota tunisino (Bekalta); CARS3 = Sciroppo di carruba dal prodotto pilota tunisino (Moknine); CARIT = *Benchmark* di sciroppo di carruba proveniente dalla grande distribuzione italiana; CARGR = *Benchmark* di sciroppo di carruba proveniente dalla grande distribuzione greca; CARCY = *Benchmark* di sciroppo di carruba proveniente dalla grande distribuzione cipriota.; FOS (Frutto-oligosaccaridi) = controllo positivo

4.1.3 Volatiloma dell'attività prebiotica

Per approfondire l'effettiva attività prebiotica dei prodotti pilota tunisini, il campione con il volatiloma più ricco in termini di speciazione dei metaboliti è quello proveniente da Teboulba (CARS1), con 71 diversi VOC (Figura 13A). Tra i prodotti di riferimento, il *benchmark* italiano CARIT ha avuto la quantità più alta (70). 17 VOC sono comuni tra tutti i campioni (Figura 13B). Considerando l'analisi delle correlazioni (Figura 14), orcinolo, benzenopropanale, cuminaldeide e acido citrico rappresentano i metaboliti maggiormente determinanti nell'indurre attività prebiotica, nel favorire la crescita del mix di bifidobatteri, specialmente negli sciroppi tunisini. Infatti, queste molecole sono esclusive dei prodotti pilota e non erano quantificabili nei prodotti di riferimento, eccetto per il benzenopropanale trovato anche in CARCY (Tabella 4). Gli acidi esanoico e

benzoico hanno attività prebiotica nei confronti di lattobacilli, ma non sui bifidobatteri (Figura 14). Queste molecole sono presenti nei prodotti pilota.

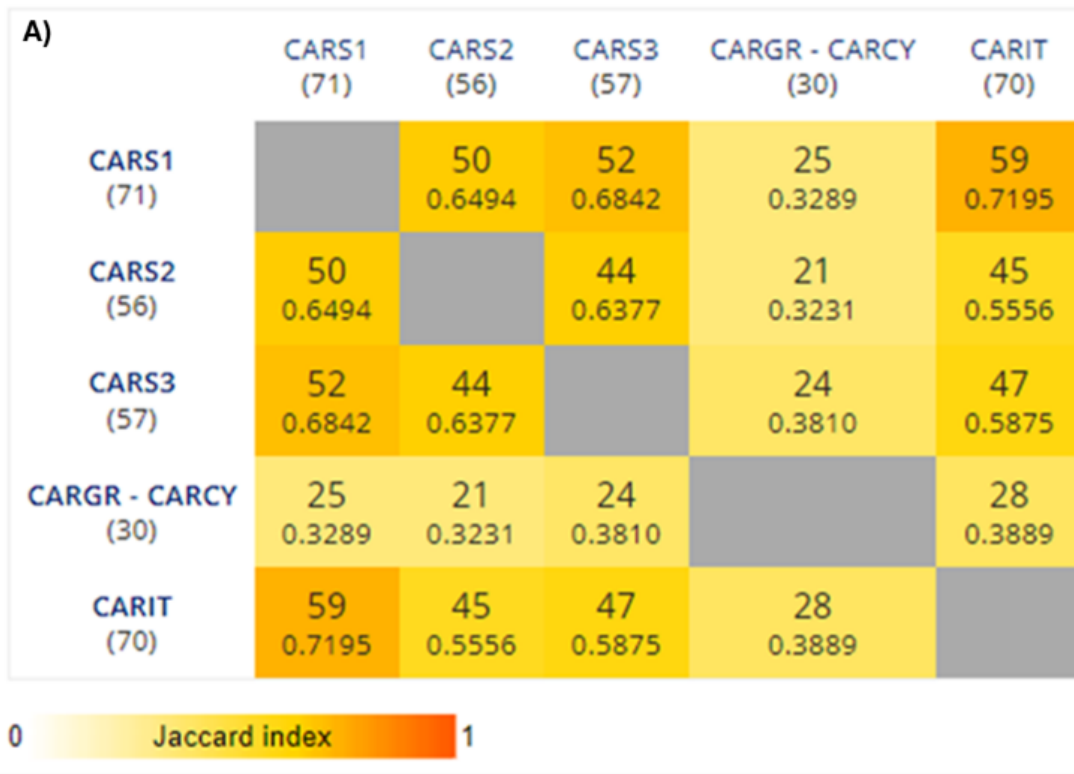


Figura 13A. Mappa delle intersezioni per coppie

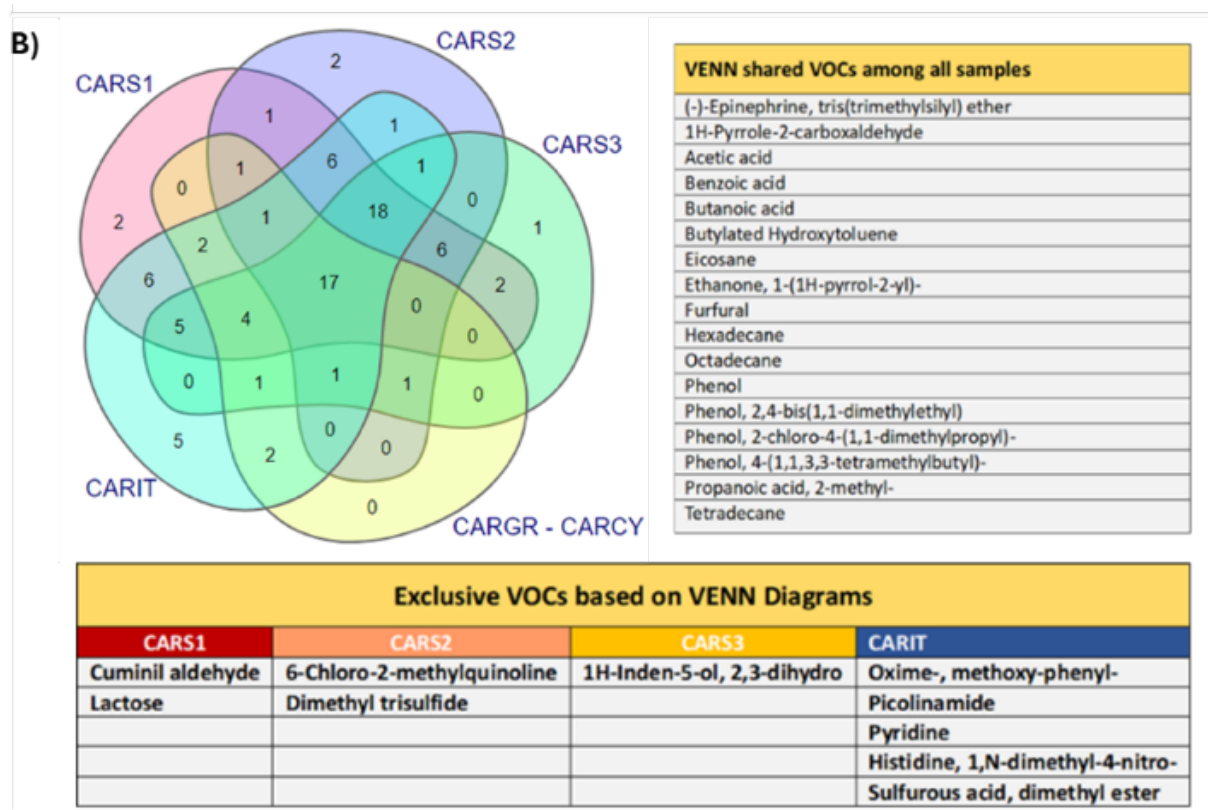


Figura 13B. Diagramma di Venn del volatiloma dei prodotti a base di sciroppo di carruba

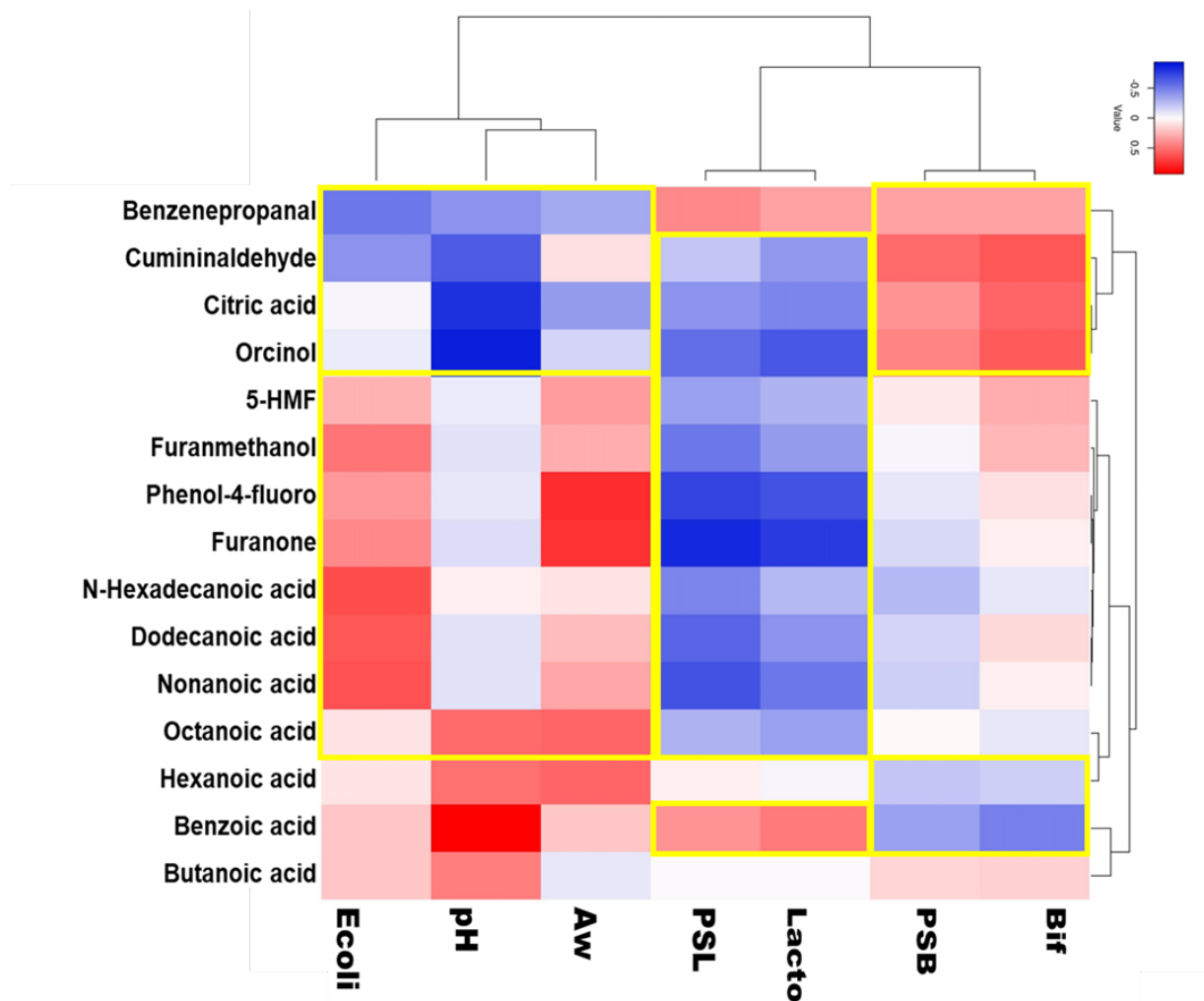


Figura 14. Correlazioni tra attività prebiotica, valori di pH e a_w e composti organici volatili dei prodotti di sciroppo di carruba. 5-HMF = 5-idrossimetilfurfurale; Ecoli = crescita selettiva del mix di *E. coli*; PSL = attività prebiotica del mix di lattobacilli; Lacto = crescita selettiva dei lattobacilli; PSB = attività prebiotica del mix di bifidobatteri; Bif = crescita selettiva dei bifidobatteri

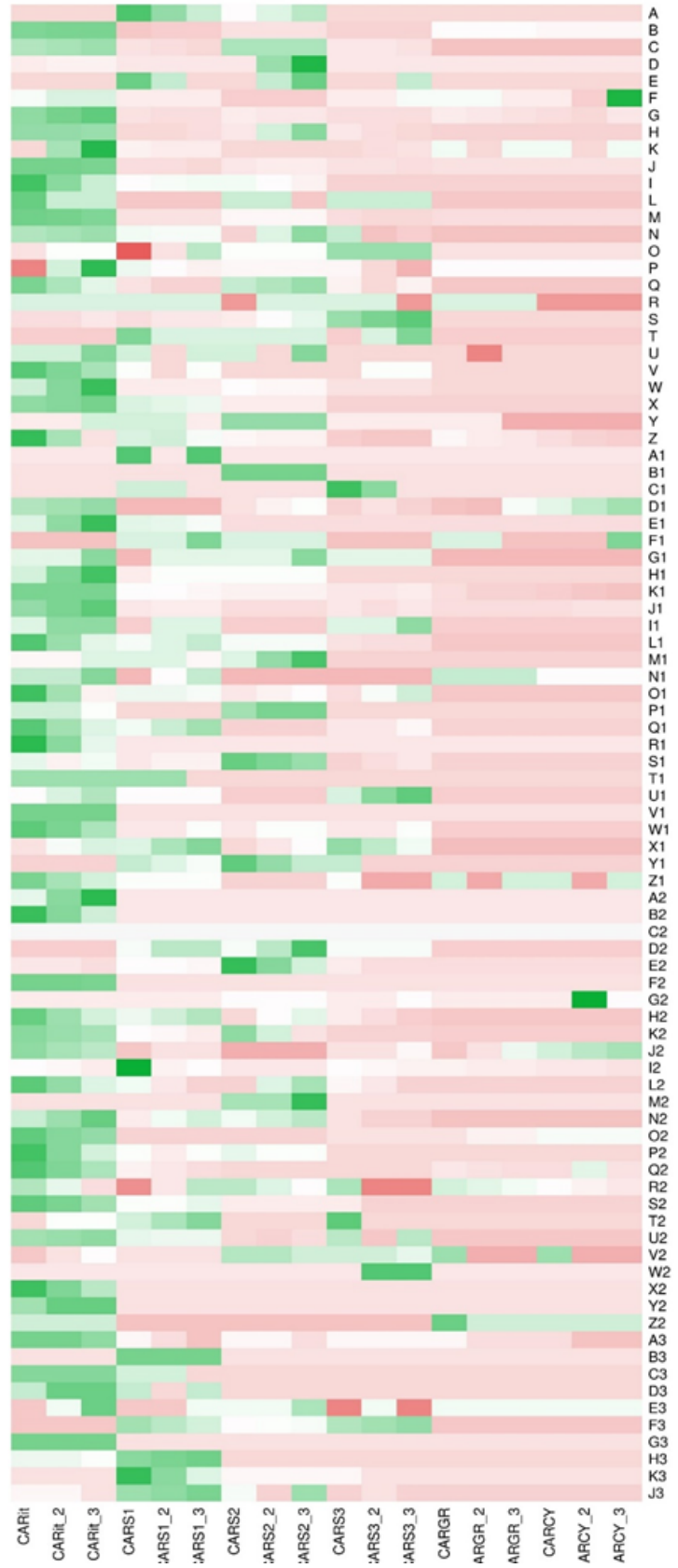
Alcoli aromatici: l'analisi PCA ha discriminato i VOC tra i campioni. I fenoli bioattivi e gli indoli sono descrittori di CARS3. La descrizione dell'odore di 1H-Inden-5-olo è: verde, legnoso, cedro, pino, liquirizia (Figura 15B).

Acidi organici: l'analisi PCA ha discriminato i VOC tra i campioni. La maggior parte di questi ha descritto i *benchmark*, ma altri VOC bioattivi sono descrittori di CARS3 come l'acido n-esadecanoico (Figura 15C).

Aldeidi e chetoni: l'analisi PCA ha discriminato i VOC tra i campioni. L'acetoino è descrittore di CARS2, conferendo un aroma burroso (Figura 15D).

Ammine e similari: i cataboliti degli alcaloidi simili all'efedrina sono descrittori di CARS2 e CARS3, come il bioattivo 8-epi-gamma-eudesmolo che è descrittore di CARS1 (Figura 15E).

A)



List of VOCs identified by NIST 11 for one-way quantification heatmap			
Code	RT (min)	#	VOCs Identity by NIST 11
A	19.118	1	n-Decanoic acid
B	20.465	2	Benzoic acid
C	20.756	3	Dodecanoic acid
D	25.359	4	n-Hexadecanoic acid
E	24.198	5	Citric acid
F	17.024	6	Octanoic acid
G	12.480	7	Butanoic acid
H	1.2967	8	Butanoic acid, 2-methyl-
K	14.895	9	Hexanoic acid
J	11.724	10	Propanoic acid, 2-methyl-
I	11.422	11	Propanoic acid
L	18.023	12	Nonanoic acid
M	10.260	13	Acetic acid
N	13.237	14	5-(2-Thienyl)pentanoic acid
O	21.842	15	Phenol, 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-
P	19.078	16	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-
Q	19.292	17	4-Mercaptophenol
R	18.531	18	Phenol, 2-chloro-4-(1,1-dimethylpropyl)-
S	18.644	19	Phenol, 2,5-bis(1-methylpropyl)-
T	16.348	20	Orcinol
U	16.559	21	Phenol
V	14.755	22	Phenol, 4-fluoro-
W	12.826	23	2-Furanmethanol
X	20.967	24	5-Hydroxymethylfurfural
Y	16.786	25	1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde
Z	10.401	26	Furfural
A1	15.862	27	Benzeneacetaldehyde, .alpha.-ethylidene-
B1	18.683	28	6-Chloro-2-methylquinoline
C1	17.303	29	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal
D1	1.995	30	Acetaldehyde
E1	11.843	31	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-
F1	9.850	32	Benzenepropanal, 4-(1,1-dimethylethyl)-
G1	16.635	33	3-Decen-5-one, 2-methyl-
H1	8.143	34	Acetoin
K1	16.235	35	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-
J1	2.632	36	Benzo[h]quinoline, 2,4-dimethyl-
I1	17.196	37	2(3H)-Furanone, 5-acetyldihydro-
L1	14.906	38	2H-Pyran-2-one, 5,6-dihydro-
M1	18.433	39	2(3H)-Furanone, 5-ethenyldihydro-5-methyl-
N1	18.779	40	2H-Pyran-2-one, 5,6-dihydro-6-pentyl-
O1	10.952	41	Ethanone, 1-(2-furanyl)-
P1	9.565	42	1-Hydroxy-2-butanone
Q1	7.451	43	3(2H)-Furanone, dihydro-2-methyl-
R1	19.022	44	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-
S1	8.278	45	2-Propanone, 1-hydroxy-
T1	17.369	46	1H-Isoindole-1,3(2H)-dione, 2-butyl-4,5,6,7-tetrahydro-
U1	25.343	47	2-Formylhistamine
V1	25.580	48	Histidine, 1,N-dimethyl-4-nitro-
W1	24.370	49	Tyramine, N-formyl-
X1	4.302	50	(-)-Norephedrine
Y1	11.696	51	meta-hydroxynorephedrine
Z1	11.616	52	(-)-Epinephrine, tris(trimethylsilyl) ether

List of VOCs identified by NIST 11 for one-way quantification heatmap			
Code	RT (min)	#	VOCs Identity by NIST 11
A2	6.895	53	Pyridine
B2	7.005	54	Picolinamide
C2	15.570	55	8-epi-gama.-eudesmol
D2	11.233	56	m-Cymene, 5-tert-butyl-
E2	18.115	57	1H-Indole, 1-methyl-2-phenyl-
F2	9.909	58	Oxime-, methoxy-phenyl-
G2	22.622	59	2-Ethylacridine
H2	13.934	60	Carbon dioxide
K2	8.964	61	2-Hexanol
J2	10.833	62	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-
I2	17.261	63	Tetradecane
L2	13.356	64	Eicosane
M2	1.509	65	Dimethyl trisulfide
N2	6.047	66	Pentacosane
O2	7.197	67	2-Phenylindolizine
P2	8.364	68	3-Phenylindole
Q2	9.045	69	Propanamide, 2-hydroxy-
R2	9.218	70	Hexadecane
S2	9.671	71	Heneicosane
T2	10.763	72	Thiazole, 5-methyl-
U2	11.973	73	5-(2-Thienyl)pentanoic acid
V2	12.156	74	Octadecane
W2	13.156	75	1H-Inden-5-ol, 2,3-dihydro-
X2	13.237	76	Benzo[h]quinoline, 2,4-dimethyl-
Y2	14.420	77	Cyclotrisiloxane, hexamethyl-
Z2	14.658	78	Tetrasiloxane, decamethyl-
A3	15.090	79	Butylated Hydroxytoluene
B3	15.246	80	Lactose
C3	15.441	81	1H-Pyrrole, 2-ethyl-
D3	17.542	82	Bicyclo[2.2.2]oct-2-ene
E3	17.967	83	1,2,5-Thiadiazolidine, 2,5-di-tert-butyl-, 1,1-dioxide
F3	19.833	84	L-Alanine, methyl ester
G3	2.076	85	Sulfurous acid, dimethyl ester
H3	6.657	86	Propanoic acid, 2-hydroxyethyl ester
K3	9.331	87	m-Anisic acid, cyclobutyl ester
J3	25.089	88	1H-Indole, 5-methyl-2-phenyl-

Figura 15A. Volatiloma totale degli sciroppi di carruba

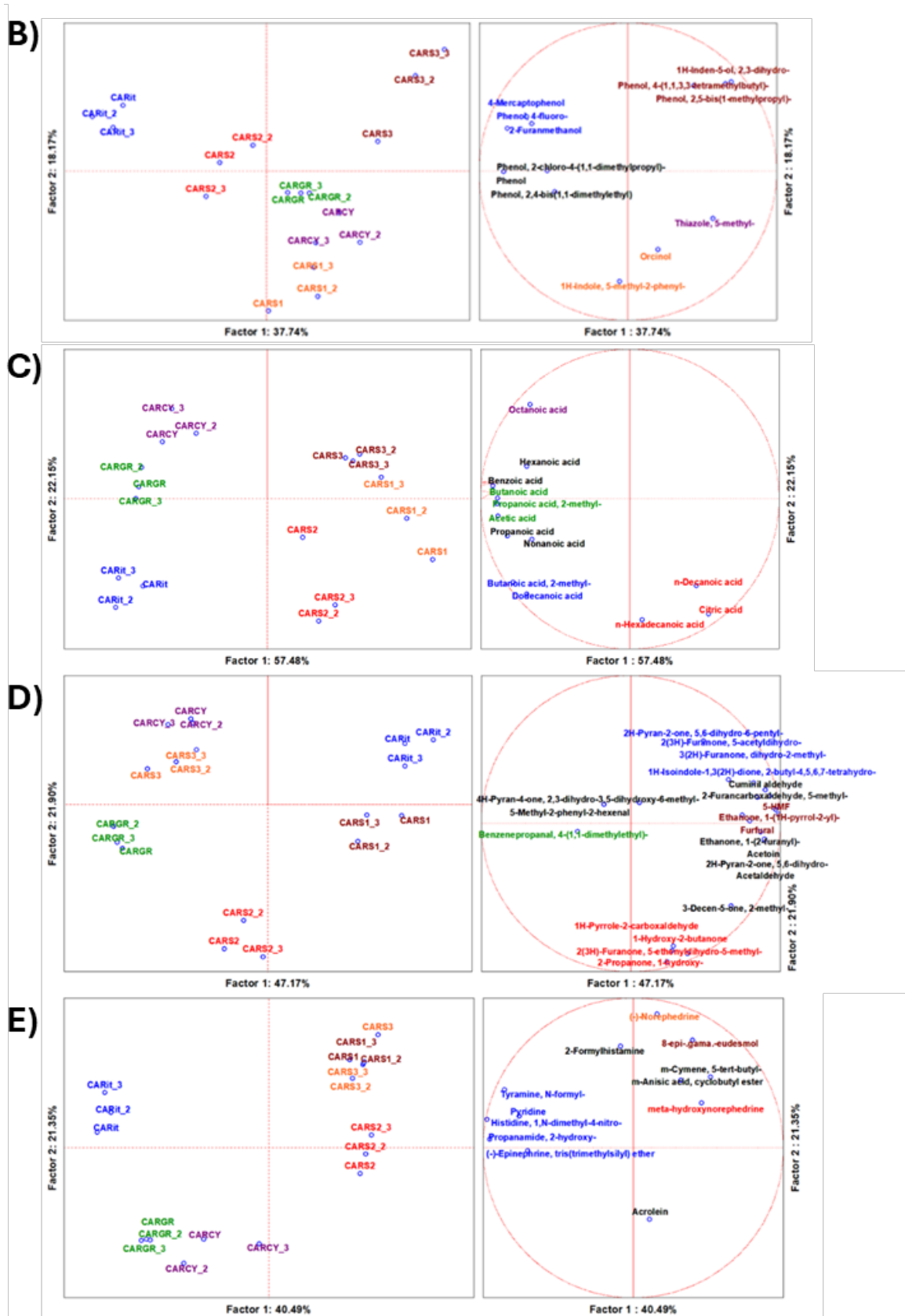


Figura 15B-E. Volatiloma degli sciroppi di carruba: B) alcoli; C) acidi organici; D) composti di Maillard e dell'ossidazione lipidica; E) ammine e altri composti

Tabella 7. Presenza di VOC nei diversi campioni di sciroppo di carruba

Occurrences of VOCs in different samples by Pairwise Intersection	
VOCs Identity by NIST 11	Present In
(-)-Epinephrine, tris(trimethylsilyl) ether	CARS1, CARS2, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde	CARS1, CARS2, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
Acetic acid	CARS1, CARS2, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
Benzoic acid	CARS1, CARS2, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
Butanoic acid	CARS1, CARS2, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
Butylated Hydroxytoluene	CARS1, CARS2, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
Eicosane	CARS1, CARS2, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	CARS1, CARS2, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
Furfural	CARS1, CARS2, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
Hexadecane	CARS1, CARS2, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
Octadecane	CARS1, CARS2, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
Phenol	CARS1, CARS2, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	CARS1, CARS2, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
Phenol, 2-chloro-4-(1,1-dimethylpropyl)-	CARS1, CARS2, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
Phenol, 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-	CARS1, CARS2, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
Propanoic acid, 2-methyl-	CARS1, CARS2, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
Tetradecane	CARS1, CARS2, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
(-)-Norephedrine	CARS1, CARS2, CARS3, CARIT
1,2,5-Thiadiazolidine, 2,5-di-tert-butyl-, 1,1-dioxide	CARS1, CARS2, CARGR - CARCY, CARIT
1H-Indole, 1-methyl-2-phenyl-	CARS1, CARS2, CARS3, CARIT
2-Furanmethanol	CARS1, CARS2, CARS3, CARIT
2-Hexanol	CARS1, CARS2, CARS3, CARIT
2-Propanone, 1-hydroxy-	CARS1, CARS2, CARS3, CARIT
2H-Pyran-2-one, 5,6-dihydro-	CARS1, CARS2, CARS3, CARIT
3-Decen-5-one, 2-methyl-	CARS1, CARS2, CARS3, CARIT
4-Mercaptophenol	CARS1, CARS2, CARS3, CARIT
5-(2-Thienyl)pentanoic acid	CARS1, CARS2, CARS3, CARIT
Acetaldehyde	CARS2, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
Benzo[h]quinoline, 2,4-dimethyl-	CARS1, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
Butanoic acid, 2-methyl-	CARS1, CARS2, CARS3, CARIT
Carbon dioxide	CARS1, CARS2, CARS3, CARIT
Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	CARS1, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
Dodecanoic acid	CARS1, CARS2, CARS3, CARIT
Ethanone, 1-(2-furanyl)-	CARS1, CARS2, CARS3, CARIT
Heneicosane	CARS1, CARS2, CARS3, CARIT
Hexanoic acid	CARS1, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
Nonanoic acid	CARS1, CARS2, CARS3, CARIT
Octanoic acid	CARS1, CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
Pentacosane	CARS1, CARS2, CARS3, CARIT
Phenol, 2,5-bis(1-methylpropyl)-	CARS1, CARS2, CARS3, CARIT
Tyramine, N-formyl-	CARS1, CARS2, CARS3, CARIT
1H-Indole, 5-methyl-2-phenyl-	CARS1, CARS2, CARIT
2(3H)-Furanone, 5-acetyldihydro-	CARS1, CARS3, CARIT
2(3H)-Furanone, 5-ethenyldihydro-5-methyl-	CARS1, CARS2, CARIT
2-Ethylacridine	CARS2, CARS3, CARGR - CARCY
2-Formylhistamine	CARS1, CARS3, CARIT
2-Phenylindolizine	CARS3, CARGR - CARCY, CARIT
2H-Pyran-2-one, 5,6-dihydro-6-pentyl-	CARS1, CARGR - CARCY, CARIT
3(2H)-Furanone, dihydro-2-methyl-	CARS1, CARS3, CARIT
3-Phenylindole	CARS1, CARS2, CARIT
5-Hydroxymethylfurfural	CARS1, CARS2, CARIT
Acetoin	CARS1, CARS2, CARIT
Benzenepropanal, 4-(1,1-dimethylethyl)-	CARS1, CARS2, CARGR - CARCY
Citric acid	CARS1, CARS2, CARS3
L-Alanine, methyl ester	CARS1, CARS2, CARS3
m-Anisic acid, cyclobutyl ester	CARS1, CARS2, CARS3
m-Cymene, 5-tert-butyl-	CARS1, CARS2, CARS3
meta-hydroxynorephedrine	CARS1, CARS2, CARS3
n-Hexadecanoic acid	CARS2, CARS3, CARIT
Orcinol	CARS1, CARS2, CARS3
Phenol, 4-fluoro-	CARS1, CARS3, CARIT
Propanamide, 2-hydroxy-	CARS1, CARGR - CARCY, CARIT
Propanoic acid	CARS1, CARS2, CARIT
Thiazole, 5-methyl-	CARS1, CARS3, CARIT
1-Hydroxy-2-butanone	CARS2, CARIT
1H-Isoindole-1,3(2H)-dione, 2-butyl-4,5,6,7-tetrahydro-	CARS1, CARIT
1H-Pyrrole, 2-ethyl-	CARS1, CARIT
2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	CARS1, CARIT
4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	CARS1, CARIT
5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	CARS1, CARS3
8-epi-gama-eudesmol	CARS1, CARS3
Bicyclo[2.2.2]oct-2-ene	CARS1, CARIT
Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	CARGR - CARCY, CARIT
n-Decanoic acid	CARS1, CARS2
Propanoic acid, 2-hydroxyethyl ester	CARS1, CARIT
Tetrasiloxane, decamethyl-	CARGR - CARCY, CARIT

5 Conclusioni

Gli sciroppi artigianali tunisini sembrano avere un potenziale prebiotico nei confronti sia dei lattobacilli che dei bifidobatteri, ma con una diversa intensità. Tale differenza può essere spiegata dalle materie prime, dalla formulazione e dal processo, che portano a un contenuto più elevato e a un maggior numero di acidi organici nel prodotto, ciò potrebbe aver favorito una maggiore crescita dei probiotici. Inoltre, l'attività prebiotica del prodotto pilota tunisino di Teboulba (CARS1) è stata correlata alla presenza di una molecola bioattiva esclusiva, ovvero la cuminaldeide. Anche il 5-HMF è coinvolto nel potenziale prebiotico dei prodotti pilota tunisini, ma il suo contenuto dovrebbe essere tenuto sotto osservazione, poiché in concentrazioni di 40/80 mg/kg può risultare tossico per il consumatore. Questa caratteristica potrebbe essere attribuita a una durata eccessiva della fase di cottura o a temperature non controllate, essendo il 5-HMF un composto tipico derivato dalle reazioni di Maillard. Per concludere, i prodotti pilota hanno un'attività prebiotica superiore o paragonabile ai prodotti di riferimento. Una giustificazione per un effetto funzionale simile tra i prodotti pilota e i *benchmark* potrebbe essere il bilanciamento tra il tratto negativo delle ricette non convenzionali e della lavorazione non controllata e il tratto positivo della mancanza di stabilizzatori o conservanti industriali nei prodotti pilota. Le prospettive future per questo lavoro sono di ampliare la conoscenza sulla funzionalità dello sciroppo di carruba sul microbiota intestinale umano con un modello intestinale *in vitro*.

Bibliografia

- Allied Market Research, 2021.** *Carob Market Size, Share, Competitive Landscape and Trend Analysis Report by Product Type and Application Distribution Channel : Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2021-2030.* [Online] Available at: <https://www.alliedmarketresearch.com/carob-market-A12384> [Accessed 7 Aprile 2024].
- Avallone, R., Plessi, M., Baraldi, M. & Monzani, A., 1997.** Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10(2), pp. 166-172.
- Baldelli, V., F., S., Putignani, L. & Del Chierico, F., 2021.** The Role of Enterobacteriaceae in Gut Microbiota Dysbiosis in Inflammatory Bowel Diseases. *Microorganisms*, 9(4).
- Battle, I. & Tous, J., 1997.** *Carob Tree. Ceratonia siliqua L. Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops. 17.* Roma: International Plant Genetic Resources Institute.
- Belletti, N. et al., 2004.** Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23).
- Candela, M. et al., 2005.** Real-time PCR quantification of bacterial adhesion to Caco-2 cells: competition between bifidobacteria and enteropathogens. *Research in Microbiology*, 156(8), p. 887-895.
- Cantalejo, M. J., 1997.** Effects of Roasting Temperature on the Aroma Components of Carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4(45), pp. 1345-1350.
- Casciano, F., Nissen, L. & Gianotti, A., 2021.** Effect of formulations and fermentation processes on volatile organic compounds and prebiotic potential of gluten-free bread fortified by spirulina (*Arthrospira platensis*). *Food & Function*, 12(20), pp. 10226-10238.
- Clodoveo, M., Crupi, P., Muraglia, M. & Corbo, F., 2022.** Processing of Carob Kernels to Syrup by Ultrasound-Assisted Extraction. *Processes*, 5(10), p. 983.

- Dahmani, W. et al., 2023.** Exploring Carob (*Ceratonia siliqua* L.): A Comprehensive Assessment of Its Characteristics, Ethnomedicinal Uses, Phytochemical Aspects, and Pharmacological Activities.. *Plants*, 12(18).
- Dhaouadi, K. et al., 2014.** Sucrose Supplementation during Traditional Carob Syrup Processing Affected its Chemical Characteristics and Biological Activities. *Food Science and Technology*.
- FAO, 2016.** *CAROB BEAN GUM, Chemical and Technical Assessment for the 82nd JECFA*. s.l., FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations).
- Fidan, H. et al., 2020.** Evaluation of chemical composition, antioxidant potential and functional properties of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seeds. *ournal of food science and technology*, 7(57), pp. 2404-2416.
- Fissore, E. N., Santo Domingo, C., Gerschenson, L. N. & Giannuzzi, L., 2015.** A study of the effect of dietary fiber fractions obtained from artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) on the growth of intestinal bacteria associated with health. *Food & function*, 6(5), pp. 1667-1674.
- Future Market Insights Inc., 2023.** *A detailed analysis of the carob market by solid & liquid..* [Online]
Available at: <https://www.futuremarketinsights.com/reports/carob-market>
[Accessed 7 Aprile 2024].
- Gibson, G. et al., 2017.** *The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics*, s.l.: Springer Nature.
- Gibson, G. et al., 2004.** Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, Issue 17, pp. 259-275.
- Gibson, G. & Rastall, R. A., 2006.** *Prebiotics: Development & Application*. Prima edizione ed. s.l.:John Wiley & Sons, Ltd.
- Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B., 1995.** Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics, *The Journal of Nutrition*. *The Journal of Nutrition*, 6(125), pp. 1401-1412.

- Gul, S. & Durante-Mangoni, E., 2024.** Unraveling the Puzzle: Health Benefits of Probiotics—A Comprehensive Review. *Journal of clinical medicine*, 13(6).
- Kerry, R. et al., 2018.** Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*, Issue 26.
- KEW Royal Botanic Garden**, n.d. *Plants of the world online*. [Online]
Available at: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:485647-1#source-KBD>
[Accessed 6 Aprile 2024].
- Mattei, G. E.**, n.d. *Treccani Enciclopedia Italiana*. [Online]
Available at: [https://www.treccani.it/enciclopedia/carrubo_\(Enciclopedia-Italiana\)/](https://www.treccani.it/enciclopedia/carrubo_(Enciclopedia-Italiana)/)
[Accessed 6 Aprile 2024].
- National Center for Biotechnology Information, 2024.** *PubChem Compound Summary for CID 440080, 1-Kestose*. [Online]
Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Kestose>
[Accessed 27 Aprile 2024].
- Nissen, L., Casciano, F., Babini, E. & Gianotti, A., 2021.** Prebiotic potential and bioactive volatiles of hemp byproduct fermented by lactobacilli. *LWT*, Volume 151.
- Nissen, L., Di Carlo, E. & Gianotti, A., 2020.** Prebiotic potential of hemp blended drinks fermented by probiotics. *Food Research International*, Volume 131.
- Papaefstathiou, E., Agapiou, A., Giannopoulos, S. & Kokkinofa, R., 2018.** Nutritional characterization of carobs and traditional carob products. *Food and Science Nutrition*, 6(8), p. 2151–2161.
- Papagiannopoulos, M. et al., 2004.** Identification and Quantification of Polyphenols in Carob Fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and Derived Products by HPLC-UV-ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), pp. 3784-3791.
- Plamada, D. & Vodnar, D., 2022.** Polyphenols—Gut Microbiota Interrelationship: A Transition to a New Generation of Prebiotics. *Nutrients*, Volume 14, p. 137.

- Rodríguez-Solana, R., Romano, A. & Moreno-Rojas, J., 2021.** Carob Pulp: A Nutritional and Functional By-Product Worldwide Spread in the Formulation of Different Food Products and Beverages. A Review.. *Processes*.
- Sanders, M., 2008.** Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clinical Infectious Diseases*, pp. s58-s61.
- Taştan, Ö., Sözgen, G., Baysal, T. & Türköz, B., 2019.** Production of prebiotic 6-kestose using *Zymomonas mobilis* levansucrase in carob molasses and its effect on 5-HMF levels during storage. *Food Chemistry*, Issue 297.
- Toufeili, I. et al., 2022.** Nutritional and Functional Potential of Carob Syrup Versus Date and Maple Syrups. *Food Technology & Biotechnology*, 60(2).
- Tounsi, L., Ghazala, I. & Kechaou, N., 2020.** Physicochemical and phytochemical properties of Tunisian carob molasses. *Journal of food measurement & characterization*, Volume 14, pp. 20-30.
- Zepigi, M., 2009.** *Acta Plantarum*. [Online]
Available at: <https://www.actaplantarum.org/forum/viewtopic.php?t=9867>
[Accessed 6 Aprile 2024].