

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA

CORSO DI LAUREA IN TECNOLOGIE ALIMENTARI

Caratterizzazione della microflora spontanea di un alimento fermentato
vegano

Relazione finale in

Biologia Dei Microrganismi

(Biologia Dei Microrganismi ed Ispezione Degli Alimenti c.i.)

Relatore

Prof. Fausto Gardini

Presentata da

Nicolas Gobbi

Correlatore

Dott.ssa Chiara Montanari

Dott.ssa Giulia Tabanelli

Sessione II

Anno Accademico 2014-2015

INDICE

CAPITOLO 1 – I prodotti vegetariani.....1

1.1.	Vegetariani nel mondo.....	2
1.2.	Prodotti vegani tradizionali e di nuova tendenza.....	3
1.2.1	Tofu.....	4
1.2.2.	Tempeh.....	5
1.2.3.	Prodotti Glutan free.....	6

CAPITOLO 2 – Gli anacardi.....8

2.1	Generalità e storia.....	8
2.2	Origine botanica.....	8
2.3	Principali produttori e mercato internazionale.....	10
2.4	Composizione e valori nutrizionali.....	11
2.5	Proprietà benefiche per la salute.....	12
2.6	Allergie.....	14
2.6.1	Principali allergeni presenti negli anacardi.....	14
2.7	Prodotti anacardi e sottoprodotti: usi e lavorazione.....	15
2.7.1	Il seme dell’anacardio (Kernel).....	15
2.7.2	Olio di gusci di anacardi (CSNL).....	17
2.7.3	Il cardanolo.....	19
2.7.4	Mela di anacardio.....	21
2.7.5	Corteccia di albero di anacardi.....	22

CAPITOLO 3 – I batteri lattici.....23

3.1	Fermentazioni spontanee.....	23
3.2	Produzione di molecole aromatiche da batteri lattici.....	26

3.3	Accumulo di sostanze indesiderate (ammine biogene).....	26
3.4	Batteriocine.....	27
3.5	Utilizzo di colture starter.....	28
3.5.1	.Classificazione.....	29
3.5.2	Distribuzione delle colture starter.....	31
CAPITOLO 4 –Obbiettivi.....		32
CAPITOLO 5 –Risultati.....		34
5.1	Processo di produzione di “formaggi” vegani a livello artigianale....	34
5.2	Indagini chimico fisiche.....	35
5.3	Indagini microbiologiche.....	36
5.4	Analisi del profilo aromatico dei “formaggi” vegani ottenuti.....	41
CAPITOLO 6 –Conclusioni.....		44
Bibliografia.....		46

CAPITOLO 1

I prodotti vegetariani

Nel vegetarianismo si possono distinguere diverse pratiche alimentari, che si producono in abitudini dietetiche che, sebbene possono essere anche molto differenti l'una dall'altra, sono tutte accomunate dalla rigorosa esclusione della carne di qualsiasi animale:

- **latto-ovo-vegetarianismo:** esclude gli alimenti che derivano dall'uccisione diretta di animali sia terrestri sia marini, quali carne, pesce, molluschi e crostacei; ammette qualunque alimento di origine vegetale, i prodotti animali indiretti, ovvero latte e derivati, uova e miele, oltre ad alghe, funghi (di cui fanno parte i lieviti) e batteri (come i fermenti lattici). Questo regime vegetariano è il più diffuso nei paesi occidentali, tanto che nel linguaggio comune la dieta associata è erroneamente indicata, per sineddoche, come dieta vegetariana;
- **latto-vegetarianismo:** come il latte-ovo-vegetarianismo, ma esclude anche le uova. È un modello dietetico frequente nella tradizione asiatico-indiano, di cui fanno parte le diete sattva o yogiche e altre di estrazione induista come la dieta vaishnava, tra i cui precetti è compresa l'astensione dai funghi;
- **ovo-vegetarianismo:** come il latte-ovo-vegetarianismo, ma esclude anche latte e derivati;
- **vegetalismo o veganismo dietetico:** esclude tutti gli alimenti di origine animale (carne, pesce, molluschi e crostacei, latte e derivati, uova, miele e altri prodotti delle api) e ammette qualunque alimento di origine vegetale, oltre ad alghe, funghi e batteri;
- **crudismo vegano:** ammette esclusivamente cibi vegetali non sottoposti a trattamenti termici oltre i 40 °C (è ammessa l'essiccazione). Questo modello dietetico è composto prevalentemente da frutta, verdura, noci e semi, cereali e legumi germogliati. È da distinguersi dal crudismo non vegano, in cui si utilizzano latticini non pastorizzati e perfino carne e pesce crudi;
- **fruttarismo:** pratica alimentare a base di frutta, frutta secca e semi. Oltre alla frutta intesa come frutto dolce della pianta (mela, pesca, albicocca, ecc.), viene contemplato anche il consumo di ortaggi a frutto come pomodori, peperoni, zucchine e cetrioli. Si basa sull'idea che la frutta sia il cibo elettivo per l'uomo.

Le ragioni che comunemente sono alla base di una scelta vegetariana includono motivazioni etiche di rispetto per la vita animale, principi religiosi, attenzione per la salute e preoccupazione per l'ambiente. Tali motivazioni non sono tutte necessariamente adottate insieme, e anche se spesso due o più di loro possono coesistere negli stessi soggetti, solitamente una prevale sulle altre. Inoltre, l'influenza delle diverse motivazioni può variare in relazione al sesso, al paese, nonché in relazione allo specifico regime vegetariano: il latte-ovo-vegetarianismo e le sue varianti latte-vegetarianismo e ovo-vegetarianismo sono adottati per lo più per ragioni religiose e/o salutistiche, il vegetarianismo principalmente per ragioni etiche di rispetto per la vita e la sofferenza degli animali, il crudismo vegano soprattutto per ragioni salutistiche, il fruttarismo per questioni religioso-spirituali (Jonathan Safran Foer et al., 2010).

1.1 Vegetariani nel mondo

La tabella 1.1 riporta dati rispetto al numero di vegetariani nei paesi elencati. Il paese al mondo dove il vegetarianismo è più diffuso è l'India (soprattutto per motivi culturali e religiosi); tra i paesi europei invece spiccano la Germania, la Gran Bretagna e l'Irlanda.

Secondo l'istituto di ricerca Eurispes, nel recente *Rapporto 2014*, complessivamente la somma dei vegetariani e dei vegani in Italia è pari al 7,1% della popolazione Italiana: 4,2 milioni di persone nel 2014, mentre nel 2013 erano stimati a 3 milioni e 720mila, con una crescita complessiva del +15%. Un aspetto interessante che emerge dal rapporto Eurispes è la crescita dei vegetariani rispetto ai vegani che sono anzi in calo. In particolare:

- vegetariani in Italia nel 2014 sarebbero il 6,5% della popolazione, pari a 3,8 milioni di persone, in aumento del 25% rispetto al 2013.
- i vegani invece sarebbero circa 400 mila persone, circa lo 0,6% della popolazione Italiana ed in forte calo rispetto al 2013 (-55%).

Il fenomeno è lungi dall'essere passeggero, anzi secondo alcuni istituti come lo Stockholm International Water Institute, addirittura potremmo tutti essere vegetariani entro il 2050 (www.tuttogreen.it).

Tabella 1.1: Stima del numero di vegetariani nei paesi elencati.

Paese	Numero di abitanti (milioni)	Stima del numero di vegetariani	Percentuale della popolazione	Fonte
Canada	31,9	1.276.000	4%	Toronto Vegetarian Association
Francia	60	1.200.000	2%	Alliance Végétarienne
Germania	82	7,380,000	9%	sondaggio effettuato da Institut Produkt und Markt
Gran Bretagna	61	3.660.000	6%	Mintel (2006)
India	997,5	399.000.000	40%	Hindu -CNN-IBN State of the Nation Survey
Irlanda	4,1	246.000	6%	Vegetarian Society of Ireland
Norvegia	4,6	92.000	2%	Norsk Vegetarforening
Paesi Bassi	16,3	700.900	4,30%	Nederlandse Vereniging voor Veganisme
Portogallo	10	30.000	0,30%	Nielsen survey for Centro Vegetariano
Spagna	45	1.800.000	4%	Asociacion Vegana Espanola (AVE)
Stati Uniti	303,9	9.724.800	3,20%	Harris Interactive Service Bureau on behalf of Vegetarian Times 2008
Svezia	9	270.000	3%	Animal Rights Sweden
Svizzera	7,3	657.000	9%	Swiss Union for Vegetarianism

<http://www.euroveg.eu/lang/it/info/howmany.php>

1.2 Prodotti vegani tradizionali e di nuova tendenza

Con le innovazioni e le nuove scoperte scientifiche riguardanti gli effetti benefici degli alimenti sulla salute umana sono stati riscoperti alcuni prodotti tradizionali o creati prodotti di nuova tendenza, specialmente di origine vegetale. Alimenti vegani tradizionali sono ad esempio i prodotti derivati dalla soia come il Tofu e latte di soia ma anche il latte di mandorle, varie tipologie di oli da prodotti diversi da quelli tradizionali come ad esempio olio di riso, olio di mandorle, varie tipologie di salse ecc. Accanto a questi prodotti della tradizione il mercato oggi richiede sempre più prodotti innovativi e “ready to eat” che rispondano alle

esigenze di questa categoria di consumatori e i nuovi prodotti vegani sono in continua evoluzione.

1.2.1 Tofu

Il tofu è un prodotto di origine cinese ottenuto a partire da fagioli di soia. Le sue origini sembrano risalire a circa 2000 anni fa. Il tofu è stato ed è tuttora parte integrante della cultura alimentare cinese: è indispensabile nella dieta delle popolazioni cinesi e dei paesi limitrofi, incluso Giappone e Corea.

Grazie alle proprietà benefiche accertate dei prodotti a base di soia, è in aumento l'interesse e il consumo di tofu anche nei paesi occidentali.

La produzione di un tofu di buona qualità però è un processo che richiede particolare attenzione dal momento che dipende da numerosi fattori. Essa consiste in una serie di operazioni unitarie e si divide principalmente in due fasi principali: la preparazione del latte di soia e la coagulazione del latte di soia. Molte variabili sono coinvolte, sia per quanto riguarda la fase di produzione, sia per quanto riguarda le caratteristiche della materia prima (Chang, 2006). Generalmente si possono considerare tre fasi critiche che influenzano principalmente le caratteristiche del prodotto finito:

- 1) La produzione del latte di soia
- 2) I metodi di coagulazione
- 3) L'eventuale pressatura.



Figura 1.1: il tofu

Il processo tradizionale cinese di produzione del latte di soia prevede la separazione del residuo (okara) e successivamente un trattamento termico, mentre il metodo giapponese prevede l'opposto per facilitare l'estrazione e migliorare la resa. Entrambi questi metodi sono considerati i metodi tradizionali orientali e hanno in comune una sensibile presenza di aromi

provenienti dalla materia prima nel prodotto finito. Rispetto a questi aromi, che possono essere sgraditi se in eccesso, vari nuovi metodi sono stati sviluppati nello scorso decennio per migliorare il sapore e l'aroma del tofu (Chang, 2006).

1.2.2 Tempeh

Il tempeh è un alimento fermentato ricavato dai semi di soia gialla e molto popolare in Indonesia e in altre nazioni del sud-est asiatico. È noto anche come "carne di soia". Il tempeh è simile al tofu ma ne differisce nelle caratteristiche nutrizionali, nella qualità alimentare e nel processo di lavorazione. Sia il tempeh che il tofu sono comunque alimenti molto più digeribili dei semi di soia. Il processo di fermentazione conserva tutte le qualità nutrizionali dei semi di soia, un alto contenuto di fibre alimentari e vitamine, una composizione solida e un sapore robusto e vigoroso. La preparazione del tempeh prevede che si ammorbiscano, riducano in poltiglia e cuociano parzialmente i semi di soia. Successivamente viene aggiunto un composto acidificante (di solito aceto) e un fungo fermentante, lo *Rhizopus oligosporus*. Il preparato viene poi disteso e messo a fermentare per circa 24 ore a una temperatura di circa 30 °C. In un tempeh ben riuscito, i semi sono saldati fra di loro in involuppo di miceli bianchi. Durante il processo di fermentazione, a basse temperature, o in situazione di forte ventilazione, possono formarsi sulla superficie delle macchie nere o grigie di spore, che non alterano il sapore e la qualità del prodotto. Come effetto del processo di fermentazione è possibile percepire un leggero odore di ammoniaca, odore che non deve risultare eccessivo (Shurtleff and Aoyagi, 1979).



Figura 1.2: Tempeh

1.2.3 Prodotti Glutan free

Con la comparsa di varie intolleranze alimentari, tra cui la più rilevante è la celiachia cioè intolleranza al glutine, sono stati elaborati nuovi prodotti da consumo tra cui i “glutan free” cioè prodotti la cui materia prima di utilizzo non presenta glutine. Il glutine è un complesso proteico presente in alcuni cereali tra cui orzo, frumento, segale, farro, kamut. Per tutti i prodotti alimentari per i quali sia stata attestata l'idoneità al consumo da parte di celiaci, l'Associazione Italiana Celiachia ha registrato un marchio a tutela dei consumatori: la spiga sbarrata. Il simbolo, di proprietà dell'Associazione, viene concesso ai prodotti che abbiano contenuto di glutine inferiore alle 20 ppm (secondo quanto indicato dalla Associazione e dal Ministero della Salute). Anche prodotti non italiani possono ottenere ugualmente il simbolo concesso dalle varie associazioni per i rispettivi territori di competenza, ma le modalità di certificazione sono diverse. In alcuni Paesi la spiga certifica un contenuto in glutine di 20 ppm, in altri si possono raggiungere anche le 100 ppm (www.celiachia.it).

La tabella 1.2 riporta uno schema riassuntivo dei prodotti che contengono, non contengono o sono a rischio per la presenza di glutine. I prodotti descritti come "Liberi" sono quelli che in natura non contengono glutine; quelli indicati come "A Rischio" potrebbero essere venuti a contatto durante la loro lavorazione con sostanze contenenti glutine e quindi occorre fare particolare attenzione agli ingredienti indicati sul prodotto; I prodotti "Vietati" invece contengono glutine anche allo stato naturale e sono quindi da evitare in modo assoluto(www.celiachiaitalia.com).

Tabella 1.2: Tabella riassuntiva di prodotti che contengono e non contengono glutine

	Liberi	A Rischio	Vietati
Cereali	Riso, mais, grano saraceno, miglio, amaranto, quinoa	Popcorn	Frumento, segale, orzo, avena, farro, spelta, kamut, triticale, bulgur, couscous
Frutta	Tutti i tipi di frutta fresca, essiccata o surgelata	Frutta candita, glassata	Frutta secca infarinata
Verdura	Tutti i tipi di verdura e legumi freschi, essiccati o surgelati	Piatti pronti precotti e surgelati	Verdure con cereali vietati, oppure impanate infarinate e pastellate con cereali vietati
Latticini e formaggi	Latte fresco e UHT, latte per la infanzia, yogurt naturale, panna fresca e UHT, formaggi freschi e stagionati	Creme e budini, yogurt alla frutta, formaggi e fette e fusi da spalmare, latte condensato, bevande a base di latte	Piatti pronti con formaggio impanato con farine vietate, yogurt con cereali vietati
Carne, pesce, uova	Tutta la carne e pesce freschi o congelati, pesce conservato (naturale, sott'olio, affumicato privo di additivi, aromi e altre sostanze), uova, prosciutto curdo	Salumi, piatti pronti o precotti a base di pesce e carne, uova pastorizzate o in polvere	Carne e pesce impanati o miscelati con farine non permesse, surimi
Grassi, condimenti vari	Burro, lardo, strutto, oli vegetali, aceti non aromatizzati, pepe, sale, zafferano, spezie ed erbe aromatiche tal quali, estratto di lievito, lievito di birra fresco e liofilizzato	Margarina, burro e margarina light, salse pronte, dadi, lievito chimico, miscela di spezie	Besciamella, lievito madre o lievito acido di cereali vietati
Dolci	Miele, zucchero, radice di liquirizia grezza	Confetture e marmellate, cioccolata in tavoletta e in crema, cacao in polvere, gelati industriali e artigianali, caramelle, gelatine, gomme da masticare	Cioccolato con cereali
Bevande	Nettari e succhi di frutta non addizionati con aromi o additivi, bevande gassate e frizzanti, caffè, tè, tisane, vino, distillati puri	Sciroppi, bevande light, caffè solubile, frappé già pronti, tè freddo liquido o in polvere	Bevande a base di avena, malto, orzo e segale, birra

(<http://www.celiachiaitalia.com/articoli/a/pagine/alimenti-senza-glutine-per-celiaci---tabella-sintetica/91>)

CAPITOLO 2

Gli anacardi

2.1 Generalità e storia

L'Anacardio (*Anacardium occidentale L.*) è un albero da frutta tropicale originario del Brasile (Amazzonia). I Portoghesi lo introdussero in India nel XVI secolo ed oggi l'India e l'Africa orientale ne sono i maggiori produttori. Appartiene alla Famiglia delle *Anacardiaceae*, e ha una caratteristica forma di fruttificazione. Infatti l'anacardio fornisce ad un tempo due tipi di frutti intimamente uniti: uno fresco, la "mela d'anacardio" (chiamata in Brasile "mela di acagiù"), e uno secco, la "mandorla o nocciola d'anacardio" (chiamata in Brasile "noce di acagiù o mandorla di acagiù").



Figura 2.1: Mele d’anacardio e nocciole di anacardio sgusciate

2.2 Origine botanica

L' anacardo è una pianta sempreverde appartenente alla famiglia Anacardiaceae. Questa famiglia comprende 60-74 generi composti da 400-600 specie, a seconda della classificazione adottata (Mitchell e Mori et al. 1987). Tra le otto specie del genere *Anacardium*, solo gli anacardi di origine occidentale sono commestibili. L' altezza della pianta varia considerevolmente, da 5 a 14 m, la radice è di solito profonda e diffusa. La distribuzione dipende dal tipo di terreno, piantine, metodo, età, livello di nutrizione delle colture e di irrigazione. Il tronco è di solito di forma irregolare e piuttosto breve, le foglie sono di colore verde, ellittiche ed obovate, con margini lisci ed a volte a punta dentata; sono disposte a spirale

verso l'estremità dello stelo con un breve picciolo. Di solito, ci sono da 3 a 14 foglie su ogni gambo terminale, che raggiungono la maturità dopo 20-25 giorni (Lim et al, 2012). I fiori sono riuniti in una pannocchia che è lungo fino a 26 cm e porta 5 a 11 laterali. Le pannocchie sono costituite prevalentemente da fiori maschili ed ermafroditi in proporzione variabile. Nel complesso, ci possono essere da 200 a 1.600 fiori per pannocchia (Aliyu e Awopetu et al. 2008; Moncur e Wait et al. 1986). La fioritura avviene al termine di nuovi germogli nella periferia della chioma per un periodo da 30 a 60 giorni durante il rossore vegetativo che di solito segue periodi di siccità (Martin et al. 1997). In climi tropicali, la fioritura può verificarsi in qualsiasi momento. Singoli fiori sono di piccole dimensioni, costituiti da una piccola corona di cinque sepali giallo-verdi e cinque bianchi al rossastro petali (Fig. 2.2).



Figura 2.2: Disposizione fiori in pianta di anacardo

Quando sono aperti, i fiori sono ricettivi al polline per diversi giorni. Lo stigma diventa immediatamente ricettivo, anche se il rilascio di polline si verifica successivamente. Questo favorisce l'impollinazione da insetti, quali predomina in gran parte a causa della natura adesiva del polline (Aliyu e Awopetu et al. 2008).

Il frutto dell'albero di anacardio è costituito da un falso frutto. Il primo è di forma ovale o, in alternativa a forma di pera, l'epicarpo deriva dall'allargamento del peduncolo ed il ricettacolo del fiore. E' noto come l'"Anacardio mela" a completa maturazione, è di colore giallo e / o rossa con struttura che dai 5 agli 11 centimetri. Quest'ultima è un drupa che si sviluppa nella parte inferiore della mela. (Lim et al. 2012). All'interno di questo frutto, vi è un solo seme, il dado di anacardio, che è circondato da un doppio guscio contenente acido anacardico, un composto fenolico allergenico (Hemshekhar et al 2011; Lim et al. 2012). Oltre alle caratteristiche comuni sopra elencati, vi sono due gruppi morfologici distinti all'interno dell'Anacardio occidentale che differiscono l'uno dall'altro in termini di

dimensioni: la tipologia comune e la tipologia nana. Il primo è più grande e generalmente più vigorosa invece la tipologia nana è meno vigorosa con dimensioni in altezza e larghezza minori. Queste tipologie sono state selezionate tramite modificazioni genomiche con la produzione di cloni principalmente nel Sud America ed in India (maggiori produttori) e selezionati per le elevate rese. I dati della letteratura riportano che con densità ottimale di piantagione, nel periodo di riferimento 1959-1995, si sono avuti rendimenti medi per ettaro di 1.200 kg con la tipologia nana e 379 kg con la tipologia comune (Barros et al. 2002). Altre caratteristiche che differenziano i cloni nano dai comuni sono la morfologia delle foglie di colore verde piccole e leggere, uno stelo più piccolo di diametro, rami iniziali più vicino al suolo, frutta a guscio più piccoli, e peduncolo più grande (Barros 1995).

2.3 Principali produttori e mercato internazionale

Il mercato mondiale dell'anacardio è relativamente nuovo. Nonostante il seme fosse stato tradizionalmente prodotto e consumato per secoli, le prime produzioni sui mercati globali sono comparse verso la metà del 1920, con le due maggiori nazioni che dominavano il commercio in quel momento: l'India (unico esportatore di noccioli anacardi), e gli Stati Uniti d'America, (unico acquirente) (Harilal et al. 2006). Il mercato da allora è cambiato con la creazione di nuovi poli sulla produzione di anacardi e l'immissione in commercio. Storicamente, il mercato internazionale degli anacardi è stato dominato dall'Africa orientale e dall'India. L'India, in particolare, è stato il primo paese a istituire un'industria di trasformazione, principalmente sulla base di diverse aziende di piccole dimensioni basandosi su manodopera specializzata. La produzione nazionale indiana è stata a lungo in grado di soddisfare i requisiti di capacità e di elaborazione interna, che hanno consolidato il collegamento con i paesi africani orientali tra cui il Mozambico, Kenya e Tanzania come fornitori anacardi (Azam-Ali e Giudice et al. 2001; Harilal et al. 2006).

Dati della letteratura riguardando l'anno 2011, riportano che la produzione mondiale di anacardi (frutta a guscio) ha raggiunto 4.27 milioni di tonnellate (Fig. 2.3a), quasi equamente distribuiti tra Asia e Africa (Fig. 2.3b, FAO 2013a). Tra i Paesi produttori, il Vietnam è il primo produttore con circa il 30% della produzione totale. Il ruolo di primo piano svolto dall'Asia è confermato anche per la presenza dell'India, al terzo posto tra i primi cinque produttori mondiali. Il Vietnam e l'India, hanno avuto un brusco aumento della produzione

di anacardi nei primi anni 2000 ed hanno recentemente dimostrato un andamento simile a causa dei loro volumi di produzione quasi costante negli ultimi 5 anni (-1 e 9%, rispettivamente; FAO 2013a). Questo quadro è diverso dalla situazione in Sud America, dove il Brasile è emerso come produttore importante, incoraggiato dal governo con incentivi rivolti principalmente a potenziare la produzione di anacardi per le esportazioni verso gli Stati Uniti. Questo Paese, da solo, produce il 99% di anacardi del continente (dati relativi al 2011). La produzione in Brasile ha però avuto un andamento irregolare nel corso degli ultimi anni a causa di cattivi raccolti del frutto causati da periodi di siccità. Gli stessi dati mostrano anche l'importanza dell'Africa occidentale nello scenario globale. Infatti questa regione è emersa recentemente sul mercato internazionale e si prevede che si svilupperà ulteriormente, consolidando il proprio ruolo nel contesto globale, sia in termini di produzione che dei volumi di esportazione (Azam-Ali e Judge, 2001). Tra i Paesi di quest'area, la Nigeria e la Costa d'Avorio che rappresentano il 79% della produzione nel 2011, con un alto tasso di crescita dei volumi di produzione negli ultimi 5 anni (+27 e + 40%, rispettivamente; FAO 2013a). Altri mercati come il Giappone e la Russia hanno solo aperto di recente (Harilal et al. 2006).

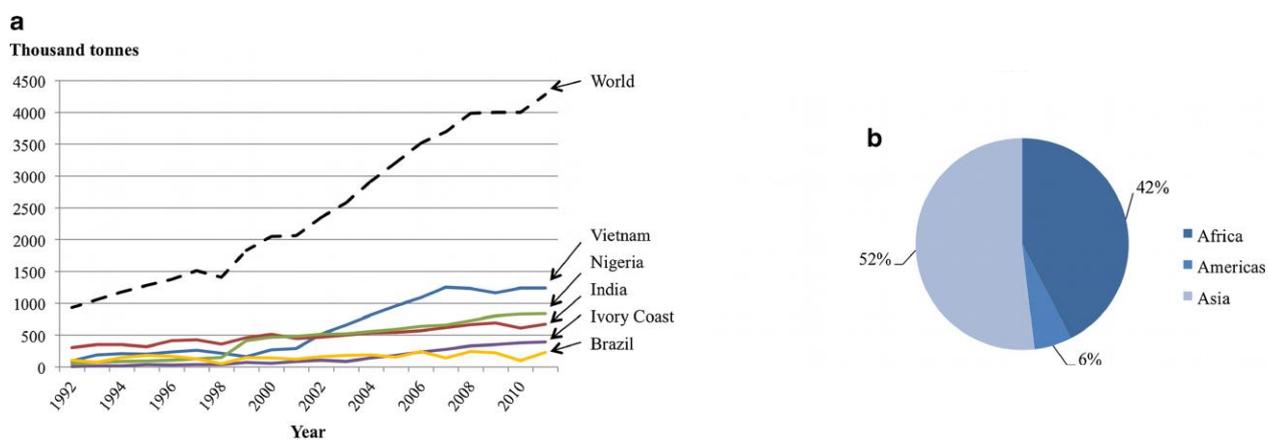


Figura 2.3: a) Produzione di anacardi (in tonnellate); b) distribuzione tra i continenti dei principali Paesi produttori (adattato da FAO, 2013 a)

2.4 Composizione e valori nutrizionali

Gli anacardi vengono considerati un alimento "pregiato", in virtù del rispettivo contenuto lipidico insaturo (estraibile sotto forma di olio di anacardi) che rappresenta circa il 49% del

peso complessivo; l'olio di anacardi è, dal punto di vista gustativo e organolettico, molto simile a quello di mandorle e si presta bene al consumo alimentare. L'olio di anacardi (come la materia prima grezza) è l'unico alimento, assieme all'olio di palma, a contenere la forma delta di vitamina E (*δ-tocoferolo*). Gli anacardi contengono anche il 35% di proteine (a medio valore biologico) e il 16% di glucidi totali. In merito alla sicurezza alimentare degli anacardi, è essenziale precisare fin da subito che, consumando i semi privati del guscio, non è raro che alcuni frammenti permangano adesi alla frazione commestibile; questi residui, che contengono cardolo (liquido oleoso giallognolo che imbrunisce all'aria, molto tossico, con azione rubefacente e vescicatoria), sono da considerare nocivi per la salute umana (www.my-personaltrainer.it).

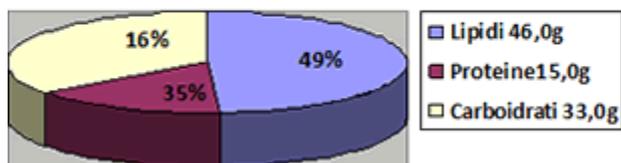
La composizione degli Anacardi per 100 gr di parte edibile è riportata nella tabella 2.1.

2.5 Proprietà benefiche per la salute

Gli anacardi sono ricchi di acido oleico, presente nell'olio d'oliva, che promuove la salute cardiovascolare anche nei diabetici, riducendo i trigliceridi alti; contengono moltissimo rame, che previene l'anemia da carenza di ferro, la rottura dei vasi sanguigni, molti problemi articolari, tra cui l'artrite reumatoide. Mentre il magnesio serve a mantenere le ossa forti, il rame è responsabile della loro flessibilità, oltre ad essere coinvolto in numerosi processi enzimatici. Inoltre, la tirosina, convertita in melanina, è fondamentale per il bel colore della nostra pelle e per la salute dei nostri capelli. Gli anacardi sono anche pieni di grassi monoinsaturi, considerati generalmente buoni, in quanto favoriscono la sostituzione del colesterolo cattivo presente nel sangue, che causa infarti ed ostruzioni vascolari, col colesterolo buono, che non rappresenta invece una fonte di pericolo per l'organismo e, grazie alle proantocianidine, una classe di flavonoidi che contrastano la proliferazione delle cellule tumorali, prevengono, in particolare, il cancro al colon. Le noccioline di anacardi sono piene di Zea-xanthin, un antiossidante flavonoide che viene selettivamente assorbito nella macula retinica degli occhi. Ha la funzione di proteggere dai raggi UV, facendo da filtro naturale contro la degenerazione maculare senile. Oltre a queste funzioni la corteccia dell'anacardio ha azione astringente e tonificante, i fiori, contenendo anacardina, hanno proprietà toniche, la linfa è utilizzata nella produzione di inchiostro e la radice ha proprietà purgative(www.meteoweb.eu).

Tabella 2.1: Composizione nutrizionale degli anacardi (fonte: INRAN)

Macronutrienti Anacardi



Valori nutrizionali (per 100 g di parte edibile)

Acqua	3,0g
Proteine*	15,0g
Lipidi TOT	46,0g
Acidi grassi saturi	9,0mg
Acidi grassimonoinsaturi	27,0mg
Acidi grassipolinsaturi	8,0mg
Colesterolo	0,0mg
Carboidrati TOT	33,0g
Fibra alimentare	3,0g
Energia	598,0kcal
Sodio	16,0mg
Potassio	565,0mg
Ferro	6,0mg
Calcio	45,0mg
Fosforo	490,0mg
Tiamina	0,2mg
Riboflavina	0,2mg
Niacina	1,0mg
Vitamina A	0,0 µg
Vitamina C	0,0mg
Vitamina E	1,0mg

*Gli anacardi contengono un pool amminoacidico che si caratterizza per la prevalenza di ac. glutammico, arginina, acido aspartico e leucina, mentre sono contenuti in misura inferiore triptofano, metionina e cistina.

2.6 Allergie

La frutta secca/frutta con guscio rappresenta uno degli alimenti che più comunemente può determinare un'allergia (insieme a latte, uovo, crostacei e soia) sia nell'adulto sia nel bambino. Negli USA, il largo consumo di burro di arachidi, unitamente all'alta allergenicità di questo alimento, ha reso l'arachide il principale responsabile di allergia alimentare. (www.allergiaesalute.it). Si deve sottolineare come l'anacardo stia divenendo un allergene sempre più in causa nella insorgenza di allergie sia cutanee che generalizzate, in particolare per il suo progressivo aumento nel consumo ad esempio come snack e come componente di numerose preparazioni della cucina asiatica assieme alla noce del Brasile e al sesamo. La noce di anacardio contiene vari allergeni: delle oleoresine che possono indurre delle dermatiti e si pensa possono causare anche manifestazioni gastrointestinali e manifestazioni sistemiche. L'allergia alla noce di anacardio può interessare qualsiasi età, e può iniziare anche in età inferiori ai 3 anni. Un fattore molto importante è che sono sufficienti anche minime quantità per scatenare i sintomi allergici, quali l'annusare, il toccare o l'assaggiare, senza ingestione. Sono state riportate reazioni allergiche quali la sindrome orale, quali reazioni anafilattiche, angioedema/orticaria, asma bronchiale, ecc. Talora tali reazioni sono state descritte ancora più severe di quelle indotte dall'allergia all'arachide (Breiteneder et al. 2004).

2.6.1 Principali allergeni presenti negli anacardi

La metà circa dei pazienti allergici presentano IgE specifiche verso Ana o 1 = 7S globulina, una proteina vicilina simile. Tra la vicilina della noce di anacardio e quella dell'arachide vi è una identità del 27%, ma non evidenziando epitopi lineari sembrava che non ci fossero cross-reattività. Ma è stato dimostrato che non è così: si sono dimostrati epitopi strutturalmente capaci di legare IgE specifiche per gli allergeni vicilina simili dell'arachide (Ara h1), della noce (Jug r 2) e della nocciola (Cor a 1) e della noce di anacardio (Ana o 1). Da qui la raccomandazione per gli allergici all'arachide di non introdurre altri frutti a guscio. Una proteina 19kDa del grano saraceno ha mostrato una debole omologia verso gli allergeni vicilina-simili della noce di anacardio, della noce e del sesamo.

Il 62-80% dei pazienti allergici è positivo all' *Ana o 2 = 11S globulina, una proteina legumina simile, chiamata anche anacardeina*. Rappresenta circa il 50% delle proteine presenti nella noce di anacardio. Una cross-reattività tra noce di anacardio e la noce è possibile in quanto

Ana o 2, allergene maggiore nella noce di anacardio, è presente anche nella noce. E' stato pure dimostrata una significativa omologia di sequenza tra l'allergene ricombinante Jug r 4 della noce e gli allergeni legumin-like della nocciola e della noce di anacardio. L'analisi conformazionale degli allergeni legumina-simili dell'arachide (Ara h 3), della noce (Jug r 4), del nocciolo (Cor a 9) e della noce di anacardio (Ana o 2) ha evidenziato una certa omologia strutturale di epitopi di superficie leganti le IgE specifiche e anche per questo allergene è bene che gli individui allergici all'arachide non introducono queste noci a guscio.

Un'altra proteina frequentemente associata alle allergie da anacardo (per 62-81% dei casi) è l'*Ana o 3 = 2S albumina*. Significativa la cross-reattività tra anacardio e pistacchio (www.studiomedicobordignon.it).

2.7 Prodotti anacardi e sottoprodotti: usi e lavorazione

L' anacardio è stato coltivato essenzialmente per la preparazione di prodotti alimentari e medicinali utilizzando i frutti interi di anacardio, cioè, la mela ed il kernel. Durante la seconda guerra mondiale, l'anacardio ha guadagnato ulteriormente valore aggiunto dovuta allo sfruttamento di un importante sottoprodotto, il guscio liquido di anacardio, che è stato poi utilizzato ampiamente per applicazioni industriali (Azam-Ali e Judge, 2001).

2.7.1 Il seme dell'anacardio (Kernel)

Il kernel (seme) è il prodotto principale che si ricava dall' anacardio. E' stato stimato che circa il 60% degli anacardi in seme si consumano sotto forma di snack, per lo più tostati e salati. Il resto viene invece utilizzato in pasticceria e prodotti da forno, spesso come sostituto di arachidi e mandorle (Azam-Ali e Judge, 2001). Oltre al suo sapore gradevole, il consumo diffuso di anacardio è dovuto alle sue proprietà nutrizionali. Tali proprietà sono principalmente legate al fatto che i lipidi presenti sono rappresentati da grassi monoinsaturi (MUFA) e acidi grassi polinsaturi (PUFA), capaci di ridurre i livelli ematici delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e quindi i rischi di malattie cardiovascolari (Hu et al. 2001). Dati della letteratura riportano che il profilo degli acidi grassi totali è formato per il 79% da MUFAs e PUFAs (Gallina Toschi et al 1993; Venkatachalam e Sathe et al. 2006). La riduzione delle malattie cardiache coronariche associati al consumo di noci di anacardio è anche correlata con la presenza di altri composti bioattivi, come i tocoferoli, lo squalene e i

fitosteroli (Kris-Etherton et al. 2001). Per quanto riguarda le analisi sul profilo aminoacidico, esse mettono in luce un'elevata quantità di acido glutammico (tra il 13,6 ed il 22,4 %), leucina (tra il 6,2 e l'8 %) ed acido aspartico (5,6-10,2 %) (Aremu et al. 2006, 2007; Venkatachalam e Sathe et al. 2006). Studi sulla composizione minerale hanno evidenziato un'elevata concentrazione di potassio (fino al 38%) seguito da magnesio e calcio e, in misura minore, da ferro e zinco (Akinhanmi et al. 2008; Aremu et al. 2006).

Per quanto riguarda il processo produttivo delle noci di anacardio, i metodi di lavorazione si sono evoluti negli anni ma l'intero processo si basa comunque su 5 punti:

1) Preparazione del seme: Rimozione delle varie impurità con taratura del seme in base alle dimensioni, questa operazione può essere eseguita manualmente o con degli aspiratori e cilindri rotanti. Dopo una fase di calibrazione avremo una fase in cui il seme subisce un processo di arrostitimento con macchina girarrosto, segue una fase di condizionamento con l'obiettivo di aumentare l'umidità del prodotto dal 15 fino al 25 % tramite torrefazione a vapore (Africa o India) o a bagno d'olio (Brasile), i tempi di trattamento vanno dai 15 ai 25 minuti (Fitzpatrick et al. 2011).

2) Rimozione dello strato esterno: La rimozione dello strato esterno viene fatto tramite rottura o tramite taglio (manuale o automatico). Il taglio manuale viene fatto dall'operatore con coltello (al giorno d'oggi utilizzato solo per piccole produzioni) tuttavia questo metodo è pericoloso per l'operatore perché il seme è avvolto da un olio (olio di guscio di anacardo) di natura caustica ed i costi di manodopera sarebbero elevati. Il taglio automatico viene eseguito tramite impianti altamente automatizzati con macchine che applicano un taglio collegato ad un trasportatore meccanico.

3) Pelatura: Dopo la pelatura effettuiamo un riscaldamento tramite cottura a vapore in modo da provocare uno shock termico per facilitare l'operazione. La pelatura viene fatta manualmente o con macchine automatiche a compressori.

4) Classificazione: Gli anacardi vengono classificati per dimensione ed ordinati per colore. La selezione viene fatta manualmente o automaticamente tramite macchine a rullo selezionatrici o a tamburo. La selezione dei semi interi deve rispecchiare gli standard

internazionali per il commercio, quelli che non rispecchiano gli standard vengono utilizzati per preparati da cucina

5) Confezionamento: Il confezionamento avviene sotto vuoto con atmosfera modificata in modo da prolungare la shelf-life del prodotto (Fitzpatrick et al. 2011).

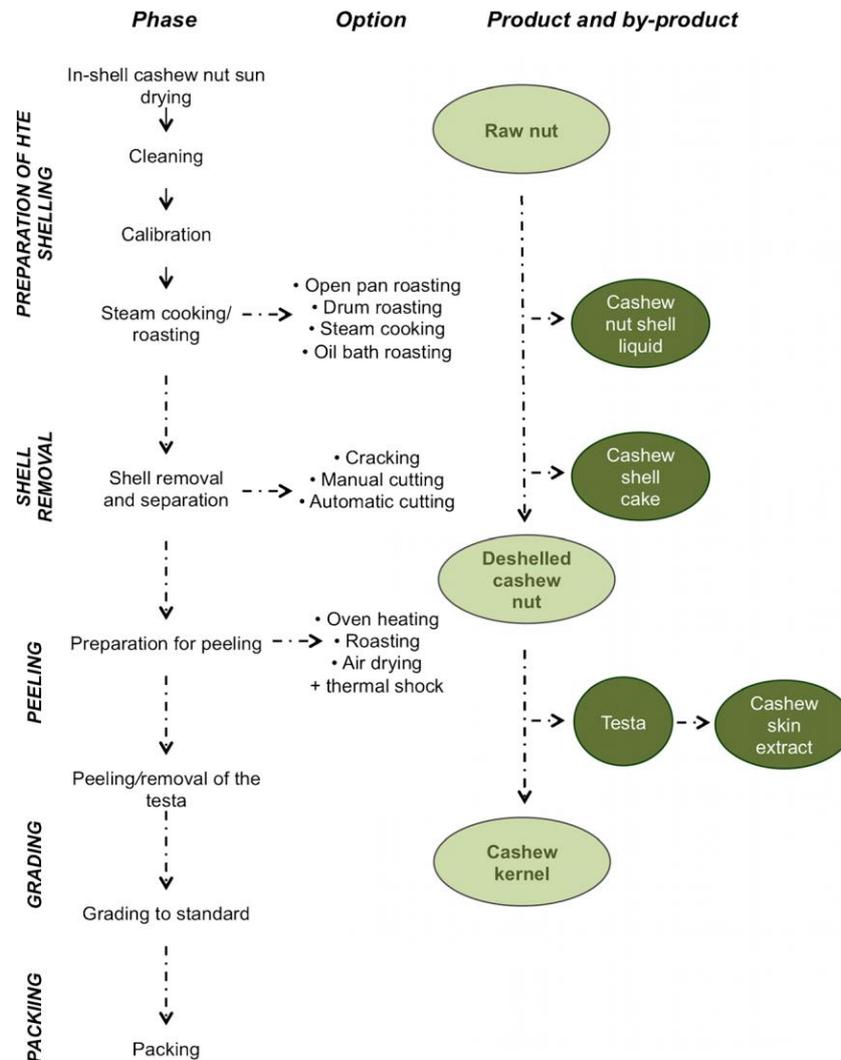
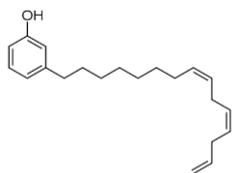


Figura 2.4: Schema di processo di lavorazione anacardio (Fitzpatrick et al. 2011).

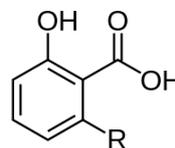
2.7.2 Olio di gusci di anacardi (CSNL)

L'olio di guscio di anacardo, è una resina naturale che riempie gli spazi interstiziali della struttura a nido d'ape del guscio di anacardo. Questo materiale, inizialmente prodotto di scarto della lavorazione alimentare, peraltro dal difficile smaltimento a causa della causticità, si è trasformato col tempo in una vera e propria materia prima secondaria rinnovabile, grazie al

crescente interesse scientifico e tecnologico incentrato sulle applicazioni che offre nel campo della chimica fine e della tecnologia dei materiali. La resina è costituita per 80-85% di acidi anacardici (acido o-pentadecadienilsalicilico) e per la restante frazione di cardolo e metilcardolo.



Struttura generale del cardanolo



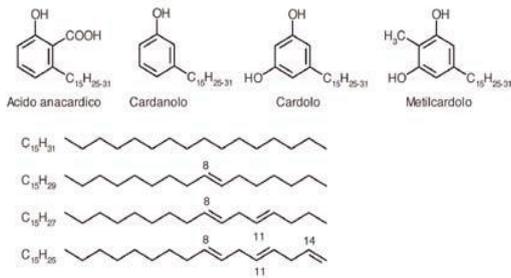
Struttura generale acidi anacardici

Tali percentuali variano dopo la tostatura a cui sono sottoposti i frutti per uso alimentare (con parziale decarbossilazione dell'acido anacardico) e in seguito alla purificazione chimica per distillazione: il prodotto che si ottiene, con rese fino al 70-80% è detto cardanolo tecnico; nella sua composizione entra il cardanolo, fino al 90%, con il cardolo e il metilcardolo per la restante frazione. Tutte le tre sostanze sono caustiche, in maniera simile agli oli del sommacco velenoso, e possono esporre a rischi gli operatori addetti a sgusciare il frutto con tecniche di lavorazione manuale, qualora la pelle dovesse venirvi accidentalmente in contatto. Questa caratteristica dell'olio, ed i resti dei gusci che ne erano intrisi, ne faceva un materiale di scarto di problematico smaltimento: negli anni, tuttavia, si è trasformato in una vera e propria materia prima secondaria rinnovabile, grazie al crescente impiego del CSNL in applicazioni di chimica industriale e di tecnologia dei materiali. Nell'industria alimentare è considerato un sottoprodotto di scarto, che per la sua causticità richiede particolari precauzioni, il cui problematico smaltimento è causa potenziale di inquinamento. I problemi nello smaltimento sono accresciuti dall'incidenza del sottoprodotto sull'intero volume: l'olio rappresenta infatti una frazione pari al 25% del peso dell'intera noce (che si aggira sui 5-6 grammi). Se impiegato diversamente, esso diventa però una materia prima secondaria a basso costo e ad alta disponibilità: l'olio conosce infatti diversi utilizzi nello sviluppo di farmaci, antiossidanti, fungicidi, ecc. Trova anche impiego nella medicina popolare tropicale, e come trattamento anti-termiti del legno. Sono oggetto di studio le potenziali proprietà antibatteriche dell'olio di guscio di anacardio: uno studio ha mostrato la capacità di inibire lo sviluppo del biofilm prodotto dai batteri gram + e gram -. È stata anche evidenziata un'attività farmacologica in grado di controllare l'*Aedes aegypti*, vettore degli agentivirali della malattia di Dengue, della

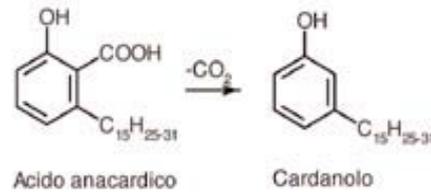
chikungunya, della febbre gialla e di altre malattie. L'olio di guscio di anacardo è di interesse nell'industria chimica, per la produzione di derivati alchilfenolici (it.wikipedia.org).

2.7.3 Il cardanolo

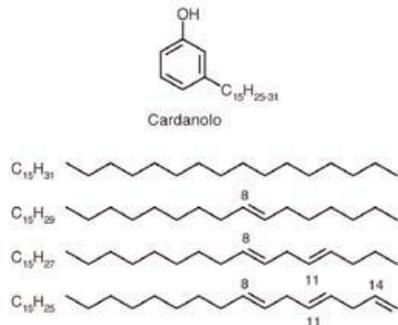
Nei Paesi in cui si produce la noce di anacardio l'impiego industriale dell'olio di guscio di anacardo (detto CNSL) contenuto nel guscio della noce rappresenta sia una soluzione ai problemi ambientali correlati alla lavorazione a fini alimentari della noce, sia un'utile fonte rinnovabile di derivati fenolici, che devono altrimenti essere preparati per sintesi o, più frequentemente, importati da paesi industrializzati. Il cardanolo, ottenuto dalla distillazione del CNSL, può essere adatto a diverse applicazioni nella chimica industriale per le sue peculiari proprietà chimiche e chimico-fisiche, con particolare riguardo a quelle attribuibili ai doppi legami presenti nella lunga catena laterale non facilmente riproducibili per sintesi. L'acido anacardico è il componente principale (quasi 80-85%) del CNSL, mentre cardanolo, cardolo e metilcardolo sono presenti in quantità inferiori. In generale la lunga catena laterale può essere satura, monoolefinica (in posizione 8), diolefinica (in posizione 8 e 11) e triolefinica (in posizione 8, 11 e 14), con una media di due doppi legami per molecola (Schema 1) (Tyman. et al. 1996). Il trattamento termico delle noci di anacardio e del CNSL nei più diffusi processi meccanici di tostatura determina la parziale decarbossilazione dell'acido anacardico (Schema 2), che è normalmente completata dalla successiva purificazione per distillazione, con rese fino al 70-80% in cardanolo tecnico, contenente soprattutto cardanolo (fino al 90%), cardolo e metilcardolo, come componenti minoritari (Schema 3). Piccole variazioni nella composizione sia di CNSL sia di cardanolo distillato, possono essere attribuite a fattori che normalmente influenzano la composizione di prodotti naturali (per esempio specie, località, fattori metereologici, trattamenti ecc.). Il cardanolo tecnico distillato è di solito un olio giallo pallido tendente a scurirsi rapidamente se non appropriatamente stabilizzato, a causa di specie chinoni che derivate dall'ossidazione di derivati del cardolo contenuti nel cardanolo distillato.



Schema 1



Schema 2



Schema 3

Rispetto a derivati fenolici simili di sintesi, il cardanolo presenta particolari caratteristiche chimiche e chimico-fisiche principalmente attribuibili ai doppi legami sulla catena laterale, non facilmente riproducibili per via sintetica. Infatti questi doppi legami permettono alcune ulteriori interessanti funzioni, oltre alle abituali dell'anello fenolico. Tali funzioni conferiscono proprietà peculiari ai prodotti derivati (resistenza alla combustione, idrofilia, idrofobicità ecc.) e, grazie sempre a questi doppi legami, il cardanolo riesce a mantenersi liquido, con solo piccoli cambiamenti di densità e viscosità, a temperature molto basse (fino a $-70^{\circ}C$), permettendo, anche in condizioni climatiche rigide, lo stoccaggio e la movimentazione all'aperto. Inoltre il cardanolo possiede un odore leggermente meno pungente e irritante, una volatilità più bassa ed un punto di ebollizione più alto degli altri derivati fenolici, favorendo processi di lavorazione più compatibili sia con la salute del lavoratore sia con l'ambiente. Grazie a queste proprietà il cardanolo sembra adatto a numerosi trattamenti chimici e impieghi industriali: a) trattamenti chimici: idrogenazione, alchilazione, acilazione, tionazione, solfonazione, solfatazione, fosfatazione, fosforilazione, condensazione, nitratura, amminazione, diazotazione, diazo-coupling, alogenazione, fluorurazione, esterificazione, eterificazione, etossilazione, epossidazione, idratazione, riduzione, ossidazione, polimerizzazione, copolimerizzazione, reazione di Mannich; b) impieghi industriali: prodotti per la chimica fine e intermedi, additivi per lubrificanti e combustibili per motori diesel, inibitori del congelamento, antiossidanti e stabilizzanti,

ritardanti di fiamma, tannini, resine, inchiostri, diluenti, vernici anticorrosive e antiruggine, materiali isolanti, idrorepellenti, adesivi, abrasivi, materiali d'attrito, biocidi, emulsionanti e tensioattivi, polimeri e copolimeri. La tendenza del cardanolo distillato a diventare di colore scuro costituisce chiaramente un fattore limitante per alcune applicazioni nel campo della chimica industriale, quindi la conservazione di un buon grado di colore è molto importante per questo prodotto. L'idrogenazione del cardanolo distillato, fornisce 3-*n*-pentadecilfenolo solido di un color ocra pallido avente un grado di purezza industriale apprezzabile. Inoltre questo prodotto può rappresentare un materiale di partenza utile per la sintesi di vari derivati fenolici ad alto valore applicativo (www.archivio.ilb2b.it/).

2.7.4 Mela di anacardio

La mela di anacardio ha diversi utilizzi e applicazioni; il suo consumo come trasformato è molto diffuso. La sua diffusione è dovuta principalmente al suo elevato contenuto di vitamina C, in quanto il suo succo è cinque volte più ricco di quello di agrumi (203,5 mg / 100 ml di succo contro 33,7 mg/100 ml) (Akinwale et al. 2000). Il contenuto di zucchero varia tra il 10 ed il 30% (Azam-Ali and Judge, 2001). Inoltre, la mela contiene un notevole livello di minerali, soprattutto calcio e fosforo. Inoltre contiene piccole quantità di tannini (fino a 0,35%), che conferiscono un sapore astringente alla frutta (Nair et al. 2010). Tale limitazione è superabile miscelando il succo anacardio con altri succhi come quello di mango, arancia, e ananas, che servono anche ad aumentare il contenuto di vitamina C (Akinwale et al. 2000). A questo proposito, sono stati riportati metodi differenti: quelli a vapore, bollitura in una soluzione di sale 2%, o trattati con gelatina (0,25-0,4%) o pectina (0,35%) (Nair et al. 2010). I residui di anacardio restanti dopo l'estrazione del succo contengono una certa quantità di nutrienti: 9% di proteine, 4% di grasso, 8% fibra grezza, e quasi il 10% di pectina. Il loro utilizzo serve per la fabbricazione di vari prodotti quali caramelle, marmellata e bevande, così come mangimi per bestiame (Nair et al. 2010). Altri prodotti popolari ottenuti dagli anacardi sono aceto di anacardio, caramelle di anacardi e marmellata, conserve, sottaceti di anacardi, ed una vasta gamma di bevande. Famoso è il liquore di anacardio, prodotto di fermentazione nato in India, avente il 40% v / v di gradazione alcolica. Altra bevanda ottenuta dalla fermentazione dell'anacardio è il vino caratterizzato da un basso contenuto di alcol (7% v / v) ed alto contenuto di tannini, di conseguenza presenta

un sapore acido (Mohanty et al. 2006). Grazie al suo alto contenuto di zucchero, il succo di mela di anacardio è idoneo come fonte di zuccheri riduttori per fermentazioni di carattere enzimatico per la produzione di lattici, destrosio, ed oligosaccaridi (Silveira et al 2012). La mela di anacardio è anche tradizionalmente consumata per le sue proprietà medicinali come ad esempio contro il colera (Azam-Ali and Judge 2001).

2.7.5 Corteccia di albero di anacardi

La corteccia degli alberi di anacardi è stata tradizionalmente usata per le sue proprietà mediche, che sono stati ampiamente riportati in letteratura. E' astringente e ricca di tannini, che la rende ampiamente applicabile per la guarigione di ipertensioni, disturbi gastrici, e di infiammazioni. Vari studi hanno dimostrato le sue proprietà battericide (Akinpelu et al. 2001) ed attività ipoglicemizzante che dà la possibilità di utilizzare l'estratto di corteccia per il trattamento del diabete mellito (Alexander-Lindo et al.2004). Più di recente, è stato dimostrato che la corteccia dell'anacardo presenta effetti anti-mutageni, quindi previene i danni del DNA contro composti potenzialmente mutageni. Tuttavia, tali risultati devono essere indagati ulteriormente per chiarire l'uso potenziale di estratto di corteccia di anacardi in medicina (Barcelos et al. 2007).

CAPITOLO 3

I batteri lattici

I batteri lattici (LAB) sono un gruppo molto ampio ed eterogeneo, che comprende microrganismi molto diversi tra loro per morfologia, condizioni colturali e metabolismo. Tuttavia tali batteri sono accomunati da alcune caratteristiche:

- Sono Gram-positivi: hanno una parete spessa formata prevalentemente da peptidoglicano, ma la composizione del peptidoglicano stesso può variare;
- producono acido lattico per fermentazione degli zuccheri, riducendo il pH degli alimenti in cui crescono: i prodotti finali della fermentazione sono diversi per i LAB omofermentanti ed eterofermentanti. Mentre i primi in condizioni normali producono quasi esclusivamente acido lattico (>90% dei prodotti di fermentazione), gli altri producono acido lattico (circa il 50% dei prodotti di fermentazione), anidride carbonica ed etanolo o acido acetico
- sono anaerobi ossigeno-tolleranti: essendo incapaci di sintetizzare alcuni cofattori necessari per la respirazione non utilizzano normalmente l'ossigeno. La maggior parte delle specie però può anche crescere in presenza di ossigeno, anche se è favorita da atmosfere anaerobiche;
- sono catalasi negativi, ossia non sono in grado di produrre l'enzima catalasi e quindi di degradare il perossido d'idrogeno;
- sono generalmente immobili e non formano endospore;
- hanno esigenze nutrizionali complesse: per crescere hanno bisogno di aminoacidi, basi nucleotidiche e vitamine, perché non sono in grado di sintetizzare uno o più di questi fattori di crescita.
- sono alofili facoltativi in grado di tollerare concentrazioni saline maggiori del 2,5%. Questa capacità varia da specie a specie e in alcuni casi è molto elevata.

3.1 Fermentazioni spontanee

Il processo di fermentazione è il metodo impiegato da sempre per la conservazione degli alimenti. Può essere condotta da funghi filamentosi, lieviti, batteri o una combinazione di essi

e avviene attraverso la conversione dei carboidrati in altri composti quali acidi organici, alcoli e anidride carbonica. I batteri lattici sono i più interessanti agenti di fermentazione in quanto produttori di acido lattico che contribuisce a prevenire la crescita di batteri degradativi o patogeni, prolungando la shelf life dell'alimento. Sono ampiamente diffusi in natura e si trovano anche nel nostro apparato digerente e sono alla base della maggior parte delle fermentazioni impiegate nella produzione di alimenti fermentati.

I batteri lattici sono suddiviso in tre gruppi in funzione del tipo di fermentazione:

- **Omofermentanti:** Per fermentazione degli esosi si forma esclusivamente acido lattico. I pentosi non sono fermentati. Fanno parte del gruppo numerose specie e sottospecie alcune delle quali molto importanti ai fini della fermentazione di prodotti alimentari, soprattutto nel settore lattiero-caseario.

Tutte le specie sono abbastanza acidotolleranti per sviluppare intensamente nelle condizioni in cui si trovano ad operare nel settore menzionato.

Le specie fermentanti il lattosio differiscono fra di loro per vari caratteri fenotipici fra i quali vanno ricordati la capacità di fermentare i carboidrati e, soprattutto, i punti cardinali di temperatura. A questo gruppo appartengono ad esempio *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, impiegato nella produzione dello yogurt e *Lb. acidophilus*, considerato ottimo a fini probiotici.

- **Eterofermentanti facoltativi:** 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, prevalentemente mesofile, alcune delle quali coinvolte nei processi di maturazione di vari prodotti alimentari perché impiegate come starter o perché componenti della microflora naturale. A questo gruppo appartengono ad esempio le specie:

- *Lb. plantarum*. Tutti i ceppi fermentano il glucosio, il fruttosio, il galattosio, il saccarosio, il lattosio ed altri carboidrati. Sviluppa a 15°C, non sviluppa a 45°C e ha la T_{opt} a 30-35°C. E' molto acidogeno ed acido tollerante. E' un batterio molto diffuso in natura, particolarmente nei prodotti alimentari fermentati e non fermentati. E' molto vigoroso e in condizioni adatte sviluppa rapidamente e intensamente. E' usato come coltura starter nel settore lattiero-caseario e in salumificio.
- *Lb. casei*. Questa, più che una singola specie, è un gruppo di specie affini sia dal punto di vista filogenetico, che fisiologico. Tale gruppo, allo stato attuale, è in continua revisione da parte dei tassonomi.

- **Eterofermentativi obbligati:** Questi lattobacilli fermentano gli esosi con formazione di acido lattico, acido acetico, etanolo, anidride carbonica. Fermentano i pentosi con produzione di acido lattico e acetico. A questo gruppo appartiene ad esempio *Lb. sanfanciscensis*, che ha una grande importanza negli impasti di farina a pasta acida. E' un mesofilo, incapace di sviluppare a 45°C. Ha sviluppo ottimale a partire da pH 5.5. Come molti altri LAB, il suo sviluppo è dipendente dalla presenza di peptidi a basso peso molecolare. Per le sue proprietà viene largamente impiegato come componente di starter nei processi di panificazione.

Negli ambienti ricchi di carboidrati, la fermentazione dei batteri lattici è spesso associata alla fermentazione ad opera di lieviti che spesso sono presenti a livelli numerici inferiori. Le specie più frequenti sono *Saccharomyces*, *Candida*, *Torula*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*.

Gli alimenti fermentati hanno origine antichissima e le pratiche empiriche e l'esperienza storica e popolare hanno fatto sì che fossero messi in atto inconsciamente degli accorgimenti che permettevano ai microrganismi "virtuosi" di prendere il sopravvento rispetto a quelli degradativi e patogeno presenti. Tutte le materie prime alimentari sono contaminate da microbi riconducibili a generi molto diversi tra loro. Durante le fermentazioni naturali la materia prima viene preparata e i primi microrganismi che si moltiplicano sono quelli che trovano le condizioni più idonee. Alcuni fattori sono infatti selettivi: temperatura, concentrazione di sale, basso pH, nutrienti ecc. Non sempre però i primi microrganismi che si sviluppano sono da un lato in grado di limitare lo sviluppo della microflora indesiderata e dall'altro di conferire aromi gradevoli e specifici. Il miglioramento di questi processi è stato possibile attraverso l'impiego di innesti, cioè di piccole porzioni di precedenti fermentazioni ben riuscite impiegate come inoculo per la fermentazione successiva. Dopo alcuni rinfreschi, infatti, questi innesti portano all'ottenimento di comunità microbiche stabili e ben definite (De Vuyst et al. 2009). Questo tipo di approccio è ancora utilizzato nella produzione dei crauti, impasti acidi e alcuni prodotti lattiero caseari. Per ovviare ai risultati spesso modesti ottenuti nei prodotti fermentati spontaneamente è bene intervenire con colture starter selezionate appartenenti alle specie più idonee. Le fermentazioni spontanee sono comuni nei Paesi in via di sviluppo per gli alimenti tradizionali, base dell'alimentazione delle popolazioni. Nei Paesi occidentali sono ancora impiegate nella produzione di alcuni alimenti tradizionali e per quegli alimenti in cui la successione microbica operante la fermentazione

non è ancora completamente studiata e capita. Ad esempio, le fermentazioni enologiche di vini tradizionali regionali sono ancora spesso condotte in modo naturale per far sì che i vini abbiano le caratteristiche particolari che le contraddistinguono. In questo caso però a volte le fermentazioni possono essere troppo lente e microrganismi alteranti possono emergere e conferire difetti (Fleet, 2007).

Per quanto riguarda le materie prime vegetali, le popolazioni batteriche più comuni sono rappresentate da batteri aerobi (pseudomonadaceae ed enterobacteria) e da batteri lattici sia omofermentati che eterofermentanti. Le principali specie isolate da prodotti vegetali fermentati appartengono ai generi *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Enterococcus* e *Pediococcus*. Durante la fermentazione si assiste ad una successione microbica tra gli eterofermentanti e gli omofermentanti (indipendentemente dalla presenza o meno dei lieviti) e di solito i batteri Gram negativi sono inibiti già nei primi stadi dell'acidificazione. Quest'opera di biopreservazione è dovuta principalmente alla sintesi di un gran numero di composti ad attività antimicrobica tra cui acidi organici, etanolo, composti antifungini (acido fenilattico) e batteriocine, capaci di inibire la microflora indesiderata.

3.2 Produzione di molecole aromatiche da batteri lattici

Nel corso della fermentazione di un alimento ad opera di batteri lattici possiamo avere oltre ad un'acidificazione del prodotto anche la produzione di svariate molecole aromatiche in prodotti quali salami, prodotti lattiero-caseari, impasti per prodotti da forno, vino, birra, prodotti a base di pesce o crostacei fermentati, caffè.

Durante il corso della fermentazione abbiamo anche una forte proteolisi da parte dei batteri lattici con il catabolismo degli aminoacidi con formazione dell'aroma e del colore in prodotti stagionati fermentati. Oltre che ad una proteolisi nel corso della fermentazione avremo una forte lipolisi con scomposizione degli acidi grassi con formazione di prodotti secondari come molecole volatili responsabili dell'aroma del prodotto.

3.3 Accumulo di sostanze indesiderate (ammine biogene)

Le ammine biogene (AB) sono presenti in molti alimenti fermentati e possono essere prodotte in grandi quantità dai microrganismi, attraverso specifiche attività aminoacido decarbossilasiche. L'eccessivo consumo di alimenti contenenti elevate concentrazioni di

questi composti può indurre reazioni avverse come nausea, mal di testa, arrossamenti, ipotensione. Questi effetti possono diventare più severi in consumatori aventi un sistema di detossificazione meno efficiente per cause genetiche o perché trattati con farmaci inibitori. Le amine biogene più comuni negli alimenti sono istamina, tiramina e putrescina. Attualmente, non esiste un limite legislativo riguardo il contenuto di tali composti negli alimenti, fatta eccezione per l'istamina.

Molti sono i fattori che influenzano quantitativamente il contenuto di amine negli alimenti, come la densità microbica, gli effetti sinergici tra i microrganismi, il livello di proteolisi (disponibilità di substrato), il pH, il sale, l'aggiunta di colture starter, le procedure di sanitizzazione adottate e le condizioni e i tempi di maturazione. Lo studio di tali fattori può pertanto ridurre ed evitare la produzione e l'accumulo di tali composti.

3.4 Batteriocine

I batteri lattici producono un ampio spettro di sostanze ad azione antimicrobica, con proprietà chimico-fisiche diverse. Tra le molecole più interessanti vi sono le batteriocine, peptidi o proteine esocellulari, sintetizzate a livello ribosomiale, in genere con un'azione antibatterica verso i microrganismi Gram positivi. Possono essere ad ampio spettro d'azione o avere un'azione limitata, ma più selettiva verso specifici batteri patogeni (*Listeria monocytogenes*), senza che la loro azione danneggi la microflora innocua. Agiscono a livello della membrana citoplasmatica dei batteri, con un meccanismo diverso a seconda che appartengano a una delle quattro classi in cui vengono suddivise per proprietà chimico-fisiche e struttura: inibendo la sintesi della parete, provocandone la lisi oppure aumentando la permeabilità della parete e fuoriuscita di molecole. Sono generalmente riconosciute come sicure per l'uomo, non sono né attive né tossiche verso le cellule eucariotiche perché vengono inattivate dalle proteasi digestive, con poca influenza sul microbiota intestinale. Le batteriocine a uso alimentare, possono essere prodotte *ex situ* e aggiunte come concentrati purificati o come concentrati da ceppi di batteri produttori, coltivati in un mezzo food-grade; oppure possono venire prodotte direttamente nell'alimento (in situ) con l'inoculo di ceppi selezionati:

- per prevenire il deterioramento dell'alimento (come ad esempio l'inibizione dei clostridi tirobutirrici, la prevenzione del gonfiore tardivo in formaggi a lunga stagionatura);

- per prevenire la formazione di sapori e odori sgradevoli generati da altri batteri lattici;
- per inibire, in determinate condizioni, alcuni patogeni alimentari (*Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*). (Galvez et al. 2007).

La nisina (E234) è l'unica batteriocina autorizzata dall'Unione europea (Direttiva n. 95/2/CE) per l'uso in formaggio stagionato e fuso, in taluni budini, nella panna cotta e nel mascarpone. È un polipeptide policiclico costituito da 34 aminoacidi, prodotto da *Lactococcus lactis*. Nel 2006 l'Efsa (l'Autorità europea per la sicurezza alimentare) ha dato una valutazione positiva della sua sicurezza sulla base dell'uso tradizionale: una volta ingerita, la nisina viene disattivata dalla tripsina e dalla pancreatina e non produce alcun effetto sulla microflora intestinale. Gli sporadici mutanti resistenti alla nisina non manifestano resistenza incrociata agli antibiotici terapeutici. È attiva verso i batteri Gram positivi Bacillus, Clostridium, Listeria, e Streptococcus, ma non verso i batteri Gram-negativi, i lieviti e le muffe. In Europa viene ampiamente utilizzata per il controllo dello sviluppo di clostridi in Cottage cheese. Svolge azione conservante in formaggi, maionese, ketchup, carne, pesce, anche in sinergia con altri metodi come basso pH ed elevate concentrazioni saline; in associazione con Edta (acido etilendiamminotetracetico) e lisozima amplia il suo raggio d'azione verso batteri Gram positivi e diviene efficace anche contro i batteri Gram negativi; in associazione con CO₂ (packaging in atmosfera modificata) migliora la protezione contro batteri Gram negativi. È tuttavia sensibile ad alcune condizioni che possono verificarsi nella matrice: nei prodotti carnei, può essere limitata dall'interazione con emulsionanti fosfolipidici o dalla sua scarsa solubilità a pH superiori a 6 (EFSA Journal, 2005).

3.5 Utilizzo di colture starter

E' una coltura microbica pura (raramente) o mista (più frequentemente) che viene aggiunta in qualche forma ad un alimento per guidare (accelerare, standardizzare, controllare....) il processo di fermentazione. Le prime notizie sull'uso di colture starter informa pura o mista risalgono alla fine del secolo XIX (colture pure di lieviti alla birreria Carlsberg, 1896; uso di crema acida come inoculo per creme fermentate, Danimarca, 1860; siero-innesto per Grana, 1890). Possono essere usati batteri, lieviti, muffe.

3.5.1 Classificazione

Anche se i confini fra alcune categorie sono in qualche maniera labili, le colture starter possono essere classificate in vari modi.

Classificazione in base alla **funzione**:

- **colture primarie:** colture di fermenti lattici responsabili dell'acidificazione, della produzione di aromi e, in qualche caso, di una limitata produzione di gas, nella quasi totalità dei formaggi; molte colture che appartengono a questa categoria svolgono altri ruoli importanti durante la maturazione dei formaggi a media-lunga stagionatura, anche se, generalmente, la loro azione è completata da altri gruppi microbici
- **colture secondarie:** colture di altri batteri, lieviti o muffe, aggiunte ad alcuni tipi di formaggi per svolgere funzioni specifiche durante la maturazione (propionibatteri per la formazione di occhiatura in formaggi di tipo svizzero, muffe in formaggi a crosta fiorita o erborinati, batteri e lieviti in formaggi a maturazione superficiale).
- **colture aggiuntive:** colture di batteri lattici (frequentemente lattobacilli) aggiunte per svolgere altre funzioni, come l'attività proteolitica e peptidolitica e la produzione di aromi durante la maturazione, o per svolgere funzioni probiotiche (funzioni legate al miglioramento della salute del consumatore).

Classificazione in base alla **composizione**:

- **colture a composizione indefinita:** sono le colture più antiche, spesso selezionate dagli stessi caseifici e talvolta riprodotte da aziende specializzate o istituzioni pubbliche. Sono caratterizzate dalla presenza di una o più specie di batteri lattici, generalmente con molti ceppi diversi (ceppi diversi di una stessa specie hanno proprietà tecnologiche diverse) presenti in rapporti indefiniti: anche se con le moderne tecniche di biologia molecolare è possibile accertare con grande accuratezza la composizione anche delle colture più complesse, essa può variare nel tempo, entro certi limiti, con le pratiche di riproduzione. Possono essere ulteriormente divise in: 1) Colture naturali o artigianali: sono

riprodotte giornalmente presso i caseifici generalmente con qualche tecnica di reinocolo (una parte della coltura o del siero della lavorazione precedente è utilizzata per reinoculare la coltura o il latte). Possono essere piuttosto variabili nelle performance, ma sono essenziali per la qualità e l'identità di molti formaggi tipici. La loro composizione varia sostanzialmente con le tecniche di riproduzione. 2) Colture selezionate a composizione indefinita: fin dalla fine del XIX secolo l'idea di selezionare le migliori colture prodotte dai caseifici, riprodurle in condizioni controllate e ridistribuirle si è affermata con successo e ha dato origine all'industria delle colture starter. Le colture selezionate a composizione indefinita conservano alcuni dei vantaggi delle colture artigianali (tolleranza alle infezioni fagiche, diversità metabolica) e possono garantire in determinate condizioni, una notevole riproducibilità delle performance tecnologiche. Queste colture sono ancora distribuite da numerose aziende specializzate e sono particolarmente importanti per alcune tipologie di formaggio (Edam, Gouda).

- **Colture selezionate a composizione definita:** a partire dagli anni 30 del secolo scorso si è affermata l'idea che colture pure di microrganismi isolati dalle colture a composizione indefinita potevano garantire una maggiore riproducibilità delle performance tecnologiche e potevano quindi essere più adatte alla produzione di massa di formaggi in grandi caseifici. In queste tipologie la composizione in specie e in ceppi è perfettamente conosciuta. Mentre nei primi tempi queste colture erano composte di uno o due ceppi della stessa specie o di specie diversa, l'insorgenza d'infezioni virali (i batteri possono essere attaccati da virus, i batteriofagi, che determinano la lisi delle cellule e bloccano o rallentano drasticamente l'attività delle colture) portò nella produzione di Cheddar prima allo sviluppo di colture composte di due ceppi, utilizzate in rotazione (coppi di ceppi diversi in diversi giorni, per ridurre il rischio d'infezione), poi all'uso di colture composte di sei ceppi (tre coppie di ceppi). Le colture moderne sono tutte composte di più ceppi (in genere almeno tre, fino a 10-12 per alcune colture usate per la produzione di Emmentaler) e il controllo delle infezioni con batteriofagi è oggi affidato all'uso di colture in

rotazione (in particolare per le colture composte di *Streptococcus thermophilus*) o allo sviluppo di ceppi in cui sono stati introdotti, con meccanismi naturali di trasferimento genico o con tecnologie molecolari food-grade, geni per la resistenza ai batteriofagi (in genere per colture contenenti *Lactococcus lactis*). In passato le colture a composizione definita erano divise in maniera rigida in mesofile (contenenti *Lactococcus lactis* con o senza specie aromatizzanti del genere *Leuconostoc* o lattococchi citrato positivi) e termofile (contenenti quasi sempre *S. thermophilus* con o senza lattobacilli termofili, come *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *L. helveticus*), usate rispettivamente per formaggi in cui le temperature durante la produzione della cagliata e nelle fasi successive sono comprese fra i 18 e i 35°C e per formaggi a pasta cotta e semicotta o formaggi a pasta filata, in cui durante la produzione della cagliata le temperature sono generalmente comprese fra 37 e 42°C, ma possono raggiungere valori fino a 54°C con la cottura. Queste differenze si sono sempre più sfumate ed è sempre più frequente l'uso di colture comprendenti sia ceppi mesofili sia termofili.

3.5.2 Distribuzione delle colture starter

Le colture selezionate sono distribuite in varie forme. Il formato più conveniente, anche se lievemente più costoso e con minori possibilità di scelta nelle formulazioni è quello delle colture liofilizzate pronte per l'uso in caldaia: queste colture contengono in forma essiccata e concentrata quantità predosate di microrganismi e non richiedono alcuna attrezzatura da parte del caseificio (possono essere distribuite facilmente a temperatura ambiente e possono essere conservate in frigorifero o meglio in congelatore. Le colture concentrate congelate sono disponibili sia per inoculo diretto (aggiunta in caldaia) o indiretto (inoculo della fermentiera che servirà poi per inoculare il formaggio): sono spesso più attive delle colture liofilizzate ma richiedono il mantenimento della catena del freddo durante il trasporto e la conservazione. Le colture liquide sono invece la forma più antica di distribuzione e sono state quasi completamente abbandonate, se non per usi specialistici, perché richiedono sempre la refrigerazione e hanno una shelf-life limitata.

CAPITOLO 4

Obiettivi

Nei Paesi occidentali, il mercato della produzione degli alimenti deve sempre di più fare i conti non solo sulla qualità e sulla sicurezza igienico sanitaria dei prodotti ma anche con spinte salutistiche, religiose, etiche ed filosofiche che connotano la richiesta di alimenti specifici da parte di consumatori. Da questo punto di vista emerge con contorni economici sempre rilevanti il mercato destinato ai consumatori vegetariani in tutte le loro declinazioni, compresi i vegani. Secondo una stima recente di Eurispes, nel nostro Paese il 7% dei consumatori si dichiara vegetariano ed almeno 700000 sono quelli che si richiamano ad una filosofia alimentare vegana.

Per questo motivo l'industria alimentare guarda con sempre maggiore attenzione questi segmenti importanti del mercato e, negli ultimi anni, è aumentata l'offerta di prodotti destinati a questi consumatori. In particolare, nel nostro Paese, il mercato dei prodotti indirizzato ai vegani è ancora spesso basato su piccole produzioni, più o meno artigianali, che stanno diventando sempre più inadeguate a fronteggiare la domanda di questo fenomeno crescente. Data l'impossibilità di consumare qualsiasi prodotto di origine animale, la cucina vegana è spesso orientata alla produzione di "surrogati" che in qualche modo ne arricchiscano la varietà e differenziazione. Tra questi prodotti si possono citare i "formaggi" vegani, che sono alimenti fermentati a base di frutta secca o i prodotti ottenuti attraverso trattamenti su latte di mandorla e latte di soia, precipitati in vario modo e successivamente fermentati.

L'attività descritta in questo elaborato è stata indirizzata allo studio di un alimento fermentato destinato ai vegani ed, in maniera particolare, l'attenzione è stata posta al processo fermentativo e alle modificazioni indotte dall'attività microbica. Per quanto l'informazione sugli alimenti fermentati di origine vegetale sia ampia ed approfondita per quanto concerne prodotti più tradizionali (dalle olive ai crauti) come anche ad alcuni prodotti di origine orientale ormai estremamente diffusi anche nel nostro Paese (tempeh, tofu ecc.), non sono presenti in letteratura studi indirizzati alla caratterizzazione dei processi fermentativi tipici di questi prodotti.

Quindi, durante la mia attività in laboratorio mi sono occupato di valutare approfonditamente la successione microbica durante la fermentazione di un "formaggio" vegano ottenuto

partendo da anacardi (*Anacardium occidentale L.*). Il prodotto è stato fornito da una chef specializzata nella produzione di alimenti vegani che, nel proprio laboratorio di cucina, ottiene questo prodotto in modo artigianale attraverso una fermentazione spontanea. Oltre agli aspetti microbiologici, ho preso in considerazione anche alcune caratteristiche fisico chimiche, occupandomi della determinazione di pH, a_w , acidi organici, profilo aromatico e contenuto di amine biogene. Questo studio è preliminare alla messa a punto di un processo industriale per ottenere un prodotto analogo da immettere sul mercato attraverso una fermentazione guidata.

CAPITOLO 5

Risultati

5.1 Processo di produzione di “formaggi” vegani a livello artigianale

I “formaggi” vegani analizzati in questa sperimentazione sono stati ottenuti da anacardi non tostati secondo il diagramma di flusso presentato in figura 5.1. La prima fase consiste in un ammollo dei semi in una quantità di acqua pari a una volta e mezzo il peso dei semi stessi. L’ammollo viene protratto per 8 ore a temperatura ambiente e, dopo questa fase, gli anacardi vengono raccolti, scolati, risciacquati sotto acqua corrente. Viene aggiunta nuova acqua (pari a circa il 40% sul peso dell’anacardo prima dell’ammollo) e quindi gli ingredienti vengono tritati in un mixer fino al raggiungimento di un prodotto che si presenta come crema omogenea. La preparazione dello chef vegano prevede a questo punto l’aggiunta del contenuto di una capsula di un preparato probiotico contenente *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus acidophilus* con l’intenzione di indurre una fermentazione ad opera di questi microrganismi. A questo punto il prodotto viene lasciato riposare a temperatura ambiente per 48 ore durante la quale ha luogo la fermentazione. Trascorse le 48 ore la massa viene addizionata di olio extravergine di oliva (pari a circa il 7% sul peso dell’anacardo prima dell’ammollo), sale (1.5% sul peso dell’anacardo prima dell’ammollo) ed eventualmente altri ingredienti (succo di limone, erba cipollina, alghe, spezie ecc). A questo punto il prodotto può seguire due strade diverse: nel primo caso viene proposto come crema spalmabile ed ha una conservabilità di qualche giorno a temperatura refrigerata. Nel secondo la crema viene messa in stampi a dare la forma che può ricordare quella di un tomino e viene posta in un essiccatore a 46°C per 24 ore trascorse le quali il prodotto viene “stagionato” a 6°C per 7 giorni. Trascorso questo periodo il prodotto viene confezionato in carta per alimenti e conservato a temperatura refrigerata per alcune settimane.

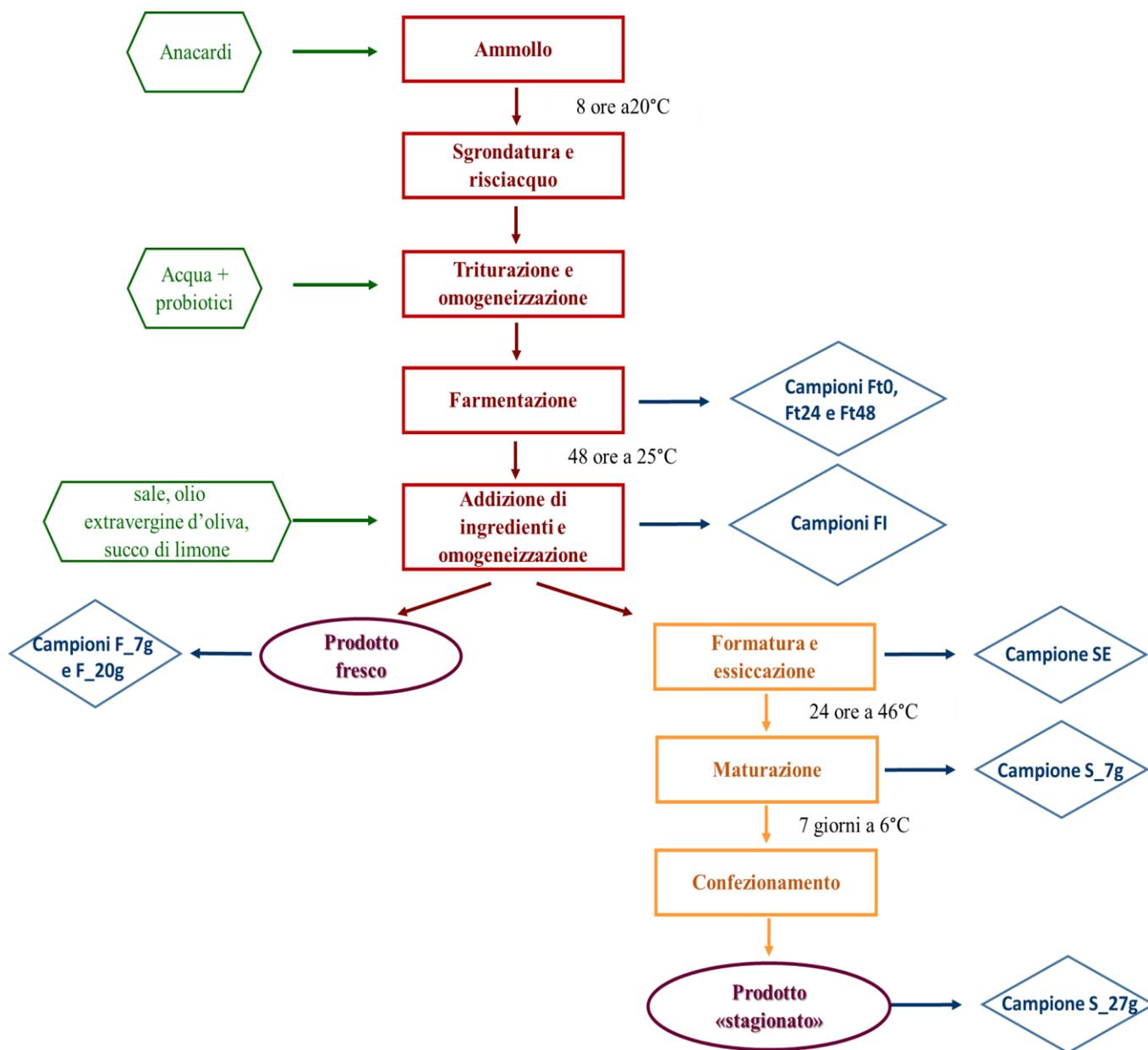


Figura 5.1: diagramma di processo della produzione dei “formaggi” vegani

5.2 Indagini chimico fisiche

In tabella 5.1 sono riportati i risultati delle indagini chimico fisiche. Come si può vedere, mentre l'attività dell'acqua rimane piuttosto alta e costante (0.978 nel prodotto fresco finito e 0.970 nel prodotto stagionato), il pH si mostra già relativamente basso (5.9) prima dell'inizio della fermentazione vera e propria e scende a 4.62 dopo 48 ore di riposo. Questo valore scende ulteriormente a 4.54 nei prodotti freschi aggiunti di succo di limone, mentre per i prodotti

stagionati si arriva ad un valore di 4.50. Questo abbassamento del pH è dovuto all'accumulo nel prodotto di acido organici, ed in particolare di acido lattico e acido acetico, che si trovano rispettivamente in quantità di circa 20 g/kg e 1.2 g/kg nel prodotto finito, indicando una effettiva attività fermentativa presumibilmente condotta dai batteri lattici. Contestualmente sono state condotte le analisi volte a determinare l'eventuale presenza di ammine biogene la cui concentrazione è risultata relativamente bassa. Infatti, nel prodotto finito, sono state riscontrate solo tiramina e 2-fenilettilammina (circa 15 mg/kg e 40 mg/kg, rispettivamente). Si tratta comunque di quantità molto basse se confrontate con altri alimenti fermentati tradizionali. E' peraltro risaputo che, soprattutto nelle fermentazioni spontanee, la presenza di microrganismi, in particolare batteri lattici e enterobatteri dotati di attività decarbossilica, può portare alla formazione di questi composti indesiderati. D'altra parte va ancora evidenziato che le quantità rilevate non hanno nessun significato dal punto di vista tossicologico.

Tabella 5.1: Parametri chimico fisici dei “formaggi” vegani durante la produzione e la conservazione. Tra parentesi è riportata la deviazione standard.

	Campioni	pH	a _w	Istamina	Tiramina	2-fenilettilammina	Acido lattico	Acido acetico
Prodotto fresco	Ft0	5.89 (±0.03)	0.979 (±0.003)	n.d. ^a	n.d.	n.d.	6.22 (±0.07)	0.25 (±0.06)
	Ft24	4.80 (±0.02)	0.978 (±0.004)	n.d.	n.d.	n.d.	17.18 (±0.12)	0.71 (±0.02)
	Ft48	4.62 (±0.02)	0.976 (±0.002)	n.d.	n.d.	n.d.	20.44 (±0.08)	1.23 (±0.11)
	FI	4.54 (±0.01)	0.978 (±0.003)	n.d.	n.d.	n.d.	20.47 (±0.15)	1.24 (±0.09)
	F_7g	4.48 (±0.01)	0.971 (±0.002)	n.d.	n.d.	n.d.	22.56 (±0.14)	1.45 (±0.10)
	F_20g	4.46 (±0.02)	0.970 (±0.002)	n.d.	n.d.	n.d.	24.06 (±0.21)	1.51 (±0.07)
Prodotto “stagionato”	SE	4.48 (±0.01)	0.971 (±0.002)	- ^b	15.45 (±0.53)	40.21 (±1.78)	21.98 (±0.05)	1.28 (±0.09)
	S_7g	4.50 (±0.02)	0.970 (±0.002)	-	18.51 (±0.44)	46.38(±1.09)	23.85 (±0.14)	1.37 (±0.07)
	S_27g	4.44 (±0.01)	0.965 (±0.001)	-	28.71 (±0.74)	61.71 (±0.91)	24.10 (±0.06)	1.47 (±0.08)

^a: Non determinate; ^b: sotto il limite di determinazione

5.3 Indagini microbiologiche

Dal punto di vista microbiologico il primo problema che si è posto è stato quello di valutare l'effettivo agente di fermentazione che si sviluppa nelle condizioni adottate. I conteggi dei

batteri lattici hanno mostrato che questo gruppo microbico era presente già nella massa prima della fermentazione a livelli di 8 log CFU/g e che, dopo 48 ore, il livello raggiunto passava a 9.4 log CFU/g, dimostrando che questi microrganismi erano responsabili dell'acidificazione e del processo fermentativo in atto. Successivamente si è voluto valutare il contributo effettivo delle colture probiotiche inserite empiricamente durante la produzione artigianale. In effetti, il substrato considerato non è certamente il più idoneo a supportare la crescita di questi microrganismi e le temperature mantenute in fermentazione (nell'ordine di 20-24°C) sicuramente non favoriscono la moltiplicazione del bifido-batterio (che ha un ottimo intorno a 37°C) né tantomeno del *Lactobacillus acidophilus* che è addirittura un batterio lattico termofilo. Infatti, indagini specifiche volte alla ricerca di questi due microrganismi non ne hanno messo in luce la presenza in nessuna fase della fermentazione. Si tenga presente anche a questo proposito, che le colture probiotiche utilizzate erano colture liofilizzate e che quindi presumibilmente non sono state neppure in grado di superare lo stress da reidratazione ed adattamento e presumibilmente sono state sopraffatte da colture spontanee. Quindi il processo ottenuto si configura come una fermentazione spontanea in cui i batteri lattici prendono il sopravvento, come dimostrato anche dalla quantità degli acidi organici. La presenza di concentrazioni significative di acido acetico induce a pensare che batteri lattici eterofermentati possano far parte del microbiota spontaneo che si viene a formare.

Prima di valutare meglio la presenza qualitativa e le attività svolta dai batteri lattici occorre anche soffermare l'attenzione sul fatto che altre popolazioni microbiche sono presenti, seppure in quantità inferiore. In tabella 5.2 sono riportati anche i dati di enterobatteri, lieviti, microstafilococchi ed enterococchi. Come si può osservare, mentre gli enterococchi non vengono mai riscontrati, le *enterobacteriaceae* sono presenti durante tutta la fase di fermentazione decrementando il loro numero e scomparendo durante la conservazione del prodotto fresco e la maturazione del prodotto stagionato. Anche i lieviti sono presenti a basse concentrazioni (2.1-3.5 log CFU/g) solo durante le fasi di fermentazione mentre i microstafilococchi si ritrovano in tutti i campioni a concentrazioni variabili da 1.2 a 3.7 log CFU/g. Tra questi, nessuna colonia risultata coagulasi positiva. Quindi, quella che si prefigura è una fermentazione lattica spontanea in cui le specie che riescono a prendere possesso dell'habitat sono in grado di contenere lo sviluppo di microflora indesiderata e degradativa,

soprattutto attraverso l'abbassamento del pH, che nel prodotto finito scende significativamente, sia pure di poco, sotto 4.6.

Tabella 5.2: Conteggi microbiologici (espressi con log CFU/g) per i principali gruppi microbici nei “formaggi” vegani durante la produzione e la conservazione. Tra parentesi è riportata la deviazione standard.

	Campioni	Batteri lattici	Lieviti	Enterococchi	<i>Enterobacteriaceae</i>	Microstafilococchi
Prodotto fresco	Ft0	8.18 (± 0.13)	2.23 (± 0.13)	- ^a	3.51 (± 0.03)	2.36 (± 0.05)
	Ft24	9.29 (± 0.07)	2.18 (± 0.08)	-	2.45 (± 0.09)	3.12 (± 0.07)
	Ft48	9.31 (± 0.10)	3.34 (± 0.05)	-	2.03 (± 0.11)	3.10 (± 0.08)
	FI	9.43 (± 0.07)	2.64 (± 0.03)	-	1.98 (± 0.17)	3.02 (± 0.11)
	F_7g	9.35 (± 0.11)	-	-	-	3.31 (± 0.03)
	F_20g	8.72 (± 0.04)	-	-	-	2.46 (± 0.04)
Prodotto “stagionato”	SE	8.89 (± 0.15)	-	-	-	3.41 (± 0.12)
	S_7g	8.71 (± 0.11)	-	-	-	3.73 (± 0.09)
	S_27g	8.62 (± 0.09)	-	-	-	1.24 (± 0.04)

^a: sotto il limite di determinazione

A questo punto l'attenzione si è rivolta verso l'identificazione delle specie lattiche coinvolte nella fermentazione per stabilire l'eventuale successione microbica che connota questo tipo di prodotto. E' infatti noto che le fermentazioni spontanee che interessano matrici vegetali studiate sono spesso determinate dall'avvicendamento di batteri lattici che si succedono nel corso della fermentazione e che contribuiscono nel loro insieme all'ottenimento di un prodotto con le caratteristiche desiderate. Queste successioni sono note ad esempio nella fermentazione dei crauti e delle olive. In cui spesso si osserva un'alternanza tra specie eterofermentanti (solitamente dominanti nella prima fase della fermentazione) e specie omofermentanti. In ogni caso si è proceduto all'isolamento e alla purificazione di circa 70 isolati dalle piastre ottenute per il conteggio dei batteri lattici nelle diverse fasi del processo di fermentazione. In particolare sono stati ottenuti almeno 15 isolati da ciascuna fase del processo di fermentazione selezionata, ed in particolare al tempo zero (Ft0), dopo 24 e 48 ore

di fermentazione (Ft24 e Ft48) e nel prodotto finale addizionato di ingredienti e stagionato (S_7g). Dagli isolati è stato estratto il DNA e si è quindi proceduto alla sua amplificazione con primers specifici per amplificare la regione ribosomiale 16S. I prodotti ottenuti sono stati purificati, sequenziati e le sequenze sono state comparate con quelle presenti nelle banche dati. I risultati delle identificazioni sono riportati in tabella 5.3 mentre la frequenza relativa delle diverse specie di batteri lattici riscontrate durante il processo produttivo è riportata in figura 5.2.

In generale, le specie identificate sono riconducibili a tre generi di batteri lattici, due eterofermentanti (*Weissella* e *Leuconostoc*) e un omofermentante (*Pediococcus*). Come si può osservare, subito dopo l'ottenimento della crema e prima della fermentazione i microrganismi isolati appartengono principalmente al genere *Leuconostoc* ed in particolare, alla specie *Leuconostoc mesenteroides*. Numerosi ceppi, circa il 30%, sono riconducibili a *Weissella spp.*, mentre circa il 20% sono identificati come *Pediococcus pentosaceus*. Mano a mano che la fermentazione procede si assiste ad una chiara inversione della presenza relativa dei microrganismi, ed, in particolare, le specie appartenenti al genere *Pediococcus* (*Pediococcus pentosaceus* e *Pediococcus acidilactici*) tendono a prendere il sopravvento. Dopo le 48 ore di fermentazione il genere *Leuconostoc* rappresenta infatti meno del 5% degli isolati mentre si conferma una presenza, sia pur minoritaria, di *Weissella* (13%). Nel prodotto fresco essiccato prima della maturazione sono stati isolati solo pediococchi (70% di *P. pentosaceus* e 30% di *P. acidilactici*).

L'analisi dei risultati ottenuti permette di fare alcune considerazioni interessanti. La prima è che la presenza di acido acetico nei prodotti può essere principalmente imputata all'attività dei *Leuconostoc*. Questi batteri lattici eterofermentanti che presentano cellule ellissoidali, sferiche e talvolta allungate in coppia o catene, sono spesso trovati in natura associati con piante o materiali vegetali in macerazione. Sono notoriamente associati a vegetali fermentati quali i cetrioli, il kimchi, crauti e olive (Huys et al., 2012). Sono specie abitualmente considerate come GRAS. Sono altresì noti per essere in grado di utilizzare l'acido citrico con la produzione anche di composti di aroma a quattro atomi di carbonio (diacetile e acetoino) e sono spesso i responsabili delle fermentazioni spontanee delle creme destinate alla produzione di burro. Si tratta di specie mesofile generalmente più sensibili al sale e al basso pH dei pediococchi. Questo può spiegare la sostituzione che via via avviene con pediococco durante

il procedere della fermentazione. Le weisselle sono solitamente cocchi molto corti con estremità arrotondate od ovoidali ed hanno anch'esse un metabolismo eterofermentativo. Il loro habitat naturale è molto variabile; sono stati isolati da numerosi alimenti fermentati ma si pensa ad una contaminazione ambientale. Alcuni ceppi sono importanti dal punto di vista della degradazione (*W. Viridescens* soprattutto nei prodotti carnei). Specie di weissella sono stati riscontrate anche comunque in alimenti vegetali, comprese le paste acide. Dal canto loro i pediococchi hanno forma sferica e si dividono formando tipicamente delle tetradi e formano acido DL-lattico. L'habitat è simile a quelli di leuconostoc e weissella e molti pediococchi sono stati isolati da vegetali, frutta e cereali. Solitamente presenti inizialmente in numeri abbastanza ridotti sono in grado di crescere rapidamente durante le fermentazioni spontanee di insilati, crauti, legumi, cetrioli, olive e cereali in cui spesso stabiliscono comunità microbiche stabili con lactobacilli, leuconostoc e altri batteri lattici (Huys et al., 2012). Per quanto alcuni ceppi siano pericolosi alteranti di alcuni prodotti come ad esempio la birra, ceppi di *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* sono utilizzati come starter selezionati per alcuni alimenti fermentati come ad esempio i salami. Inoltre, alcune specie appartenenti a questo genere sono noti per produrre batteriocine (pediocine) che hanno interessanti potenziali applicativi per la preservazione degli alimenti.

Tabella 5.2: Risultati delle identificazioni degli isolati di batteri lattici

	Ft0	Ft24	Ft48	SE
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	47%	10%	3%	
<i>Leuconostoc lactis</i>	7%			
<i>Weissella spp.</i>	26%	30%	13%	
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	20%	50%	72%	68%
<i>Pediococcus acidilactici</i>		10%	12%	32%
	100%	100%	100%	100%

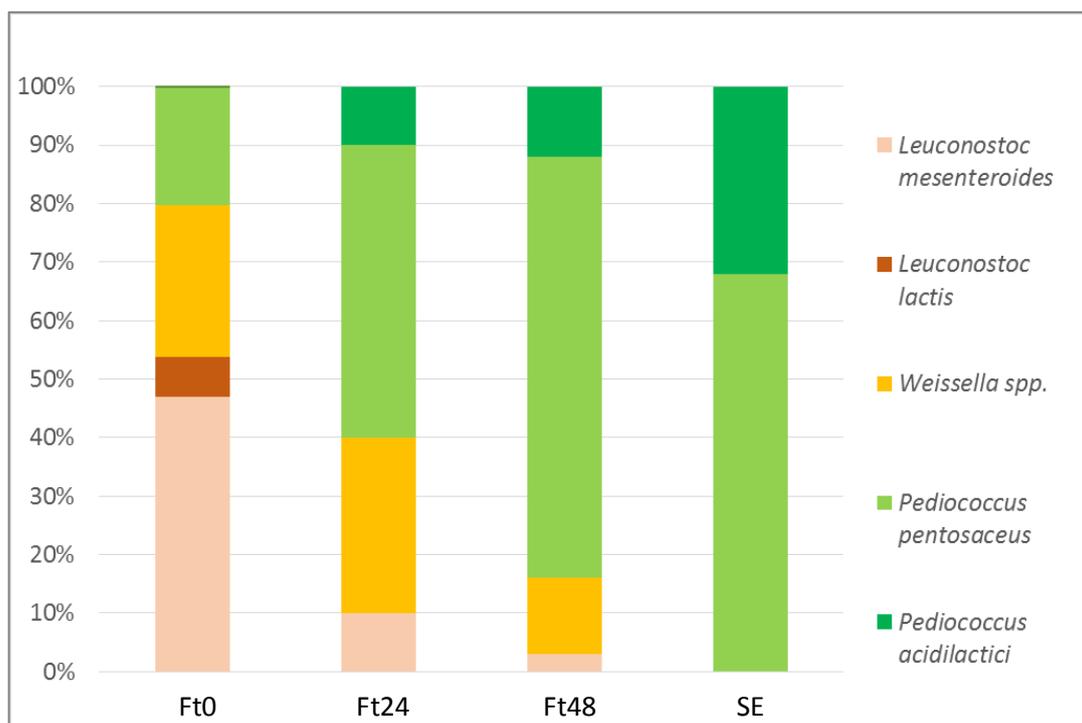


Figura 5.2: Frequenza relativa delle diverse specie di batteri lattici riscontrate durante il processo produttivo

5.4 Analisi del profilo aromatico dei “formaggi” vegani ottenuti

In tabella 5.3 sono riportati i risultati dell’analisi SPME-GC-MS al fine di individuare i principali composti di aroma che connotano il prodotto. In particolare, è stato analizzato il prodotto fresco durante le fasi di fermentazione e il prodotto stagionato dopo i 7 giorni di maturazione e durante la conservazione. I risultati riportano l’entità dei diversi picchi rilevati espressi come U.A. e divisi per gruppo chimico di appartenenza (chetoni, aldeidi, alcoli, esteri, acidi). Come si può rilevare, la sommatoria delle aree aumenta progressivamente con il procedere della fermentazione e raggiunge il suo massimo nel campione dopo 7 giorni di stagionatura. Tra i chetoni individuati occorre notare la presenza del composto di aroma a quattro atomi di carbonio (acetoino e diacetile), con un significativo picco di acetoino raggiunto dopo 24 ore di fermentazione oltre le quali la quantità di questa sostanza sembra diminuire, presumibilmente per il raggiungimento dell’equilibrio, sulla base del potenziale redox tra diacetile, acetoino e 2,3-butanediolo. La presenza di queste molecole è molto importante in un prodotto come questo perché conferiscono note di burro o di prodotti lattiero

caseari. Tra le aldeidi individuate bisogna segnalare il 2-metil-butanale e la benzaldeide, entrambe derivanti dal metabolismo degli amminoacidi (isoleucina e fenilalanina). Il loro accumulo incrementa durante la fermentazione e si stabilizza nel prodotto durante la conservazione. L'impatto organolettico di queste sostanze può essere estremamente importante perché conferiscono odori gradevoli di frutta come mandorla e pesca.

Per quanto riguarda gli alcoli, l'etanolo risulta la molecola più importante con un incremento costante durante le fasi di fermentazione. Alcuni alcoli derivano presumibilmente dal metabolismo delle sostanze grasse come l'1-esanolo e il 2-esenolo (che conferiscono sentore erbaceo), altri derivano dal metabolismo amminoacidico (3-metil-1-butanolo, benzil alcol e alcol fenilico) e apportano aromi fruttati o floreali. Al contrario l'origine di 1-pentanol e 1-propanolo è più dubbia e queste molecole possono conferire sentori di "solvente".

Tra gli acidi spicca la concentrazione di acido acetico, che segue il trend già osservato per l'etanolo e costituisce, insieme a quest'ultima molecola, il principale componente dello spazio di testa di questi prodotti. Interessante anche la presenza di altri acidi organici che compaiono a partire dal termine della fermentazione come acido propanoico, butanoico e 2-metil propanoico. Infine tra gli esteri è stato individuato solamente l'acetato di etile il cui accumulo segue necessariamente l'andamento delle due molecole che fungono da precursori (etanolo e acido acetico).

Tabella 5.3: Composti volatili durante la fermentazione e nel prodotto stagionato analizzati attraverso la tecnica SPME-GC-MS

	Ft0	Ft24	Ft48	S_7 g	S_27 g
2,3-butandione	-*	248.2 (\pm 1.4)	392.5 (\pm 3.4)	48.5 (\pm 1.1)	80.7 (\pm 1.6)
3-idrossi-2-butanone	-	5594.5 (\pm 23.5)	1763.8 (\pm 5.8)	634.1 (\pm 6.2)	805.9 (\pm 6.0)
Chetoni	-	5842.6 (\pm 25.9)	2156.3 (\pm 17.1)	682.6 (\pm 7.2)	886.6 (\pm 8.1)
2-metil butanale	124.7 (\pm 2.9)	131.3 (\pm 2.4)	140.4 (\pm 0.8)	110.5 (\pm 2.7)	98.6 (\pm 2.3)
Benzaldeide	797.9 (\pm 7.1)	1055.1 (\pm 6.0)	1139.0 (\pm 9.7)	2028.5 (\pm 13.2)	2097.5 (\pm 12.9)
Aldeidi	922.5 (\pm 9.0)	1186.4 (\pm 8.6)	1279.4 (\pm 11.5)	2138.9 (\pm 17.3)	2196.1 (\pm 16.4)
Alcol etilico	424.7 (\pm 9.1)	7837.1 (\pm 19.1)	28160.6 (\pm 28.2)	37976.4 (\pm 40.5)	37743.8 (\pm 41.8)
1-propanolo			224.5 (\pm 0.5)	171.5 (\pm 4.4)	68.8 (\pm 1.5)
3-metil-1-butanolo			1786.3 (\pm 8.4)	1559.3 (\pm 10.4)	738.5 (\pm 6.0)
1-pentanololo				192.6 (\pm 2.7)	67.2 (\pm 1.1)
3-metil- 2-buten-1-olo				361.1 (\pm 3.4)	210.1 (\pm 3.6)
1-esanololo			1595.4 (\pm 10.2)	1924.1 (\pm 5.8)	1209.6 (\pm 9.7)
2-esanololo				929.2 (\pm 6.2)	944.6 (\pm 3.4)
alcool benzilico		352.3 (\pm 3.4)	1058.8 (\pm 7.6)	4025.6 (\pm 11.7)	3154.0 (\pm 15.5)
alcol 2-feniletilico		256.7 (\pm 4.0)	844.3 (\pm 3.8)	925.5 (\pm 8.4)	747.1 (\pm 3.9)
Alcoli	424.7 (\pm 9.1)	8446.1 (\pm 49.6)	33669.9 (\pm 56.2)	48065.3 (\pm 27.9)	44883.7 (\pm 33.2)
Etil acetato	352.9 (\pm 3.8)	327.1 (\pm 2.2)	712.6 (\pm 4.9)	1209.6 (\pm 9.4)	1046.8 (\pm 9.7)
Esteri	352.9 (\pm 3.8)	327.1 (\pm 2.2)	712.6 (\pm 4.9)	1209.6 (\pm 9.4)	1046.8 (\pm 9.7)
acido acetico	1016.2 (\pm 8.6)	1581.7 (\pm 12.3)	12317.5 (\pm 25.8)	44147.4 (\pm 57.9)	46018.3 (\pm 68.54)
propanoic acid			511.2 (\pm 8.4)	803.4 (\pm 6.1)	834.1 (\pm 4.3)
acido propanoico, 2-metil			978.5 (\pm 5.1)	1021.8 (\pm 6.0)	1018.5 (\pm 5.8)
acido butanoico			769.1 (\pm 4.4)	789.6 (\pm 4.1)	793.4 (\pm 4.7)
Acidi	1016.2 (\pm 8.6)	1581.7 (\pm 12.3)	14576.3 (\pm 36.3)	46762.2 (\pm 69.1)	48664.3 (\pm 77.4)
Area totale	2716.3 (\pm 20.5)	17384.0 (\pm 58.9)	52394.4 (\pm 74.2)	98858.7 (\pm 85.0)	97677.5 (\pm 102.2)

*: Sotto al limite di determinazione

CAPITOLO 6

Conclusioni

Il lavoro svolto ha permesso di ottenere alcune importanti informazioni relativamente alla possibilità di trasferire sul piano industriale la produzione di un “formaggio” vegano ottenuto attraverso una fermentazione rigorosamente controllata. Infatti, il processo che ho studiato nel corso di questa attività, è un processo che presenta numerosi punti di rischio che devono essere presi in considerazione prima di poter giungere alla messa a punto di un prodotto definitivo. Indipendentemente dalla artigianalità ad anche dall’empirismo che caratterizzava il prodotto studiato la matrice si presenta piuttosto rischiosa, sia per le caratteristiche e la provenienza della materia prima, sia per alcuni passaggi nella preparazione in cui occorre giungere ad uno stretto controllo per evitare rischi di natura igienico sanitari. Quello che emerge dal lavoro svolto, è che spontaneamente, una flora lattica ha preso il sopravvento nella fase più critica del processo, vale a dire l’ammollo dei semi in acqua per 8 ore. Ovviamente questa presa di possesso da parte de batteri lattici non deve essere lasciata al caso ma dev’essere rigorosamente guidata soprattutto utilizzando colture selezionate. Inoltre, le cinetiche di abbattimento del pH dovranno essere strettamente controllate con il doppio scopo di portare il suo valore a valori inferiori a 4.6 ma non tanto essere da inficiare le caratteristiche organolettiche del prodotto. Se da un lato l’aggiunta dei batteri lattici probiotici si è rivelata insignificante, dall’altro l’utilizzo del sale dev’essere razionalizzato. Per questioni di sicurezza igienico sanitaria il sale dovrà essere inserito al momento della formazione della crema ed in quantità superiori a quelle utilizzate nella preparazione artigianale. Non è pensabile aggiungerlo direttamente alle acque di ammollo perché potrebbe ridurre l’attività dei *Leuconostoc* che hanno un impatto positivo sulle caratteristiche del prodotto. Infatti, come dimostrato dall’analisi del profilo aromatico, l’attività microbica è indispensabile per conferire un profilo aromatico gradevole ad un prodotto che prima della fermentazione risulta piuttosto piatto ed insignificante. Inoltre, anche il processo di maturazione, dovrà essere studiato più accuratamente.

Il risultato di questa tesi è stato quello di individuare le specie principali responsabili della fermentazione. Se da un lato, la presenza quantitativa e la distribuzione di *Weissella* sembra indicarne un ruolo sostanzialmente di contaminante senza un ruolo specifico nella fermentazione, o quantomeno svolgendo un ruolo che può essere operato anche da altre specie, la gestione della successione tra eterofermentanti ed omofermentanti si configura come il punto chiave per la conduzione di una corretta fermentazione, sia dal punto di vista delle caratteristiche del prodotto, sia da quello della sua sicurezza igienico sanitaria. Per questo sono stati individuati nell'ambito degli isolati ottenuti nel mio lavoro un ceppo di *Leuconostoc mesenteroides* ed un ceppo di *Pediococcus pentosaceus* che potrebbero essere utilizzati come colture starter in un processo industriale controllato. Da questo punto di vista alcune prove preliminari condotte a livello di impianto pilota hanno dato risultati estremamente soddisfacenti e saranno l'oggetto di ulteriori lavori ed elaborati di tesi.

Bibliografia

- Aliyu, O.M., Awopetu, J.A. (2008). Studies of flowering pattern in cashew (*Anacardium occidentale L.*). Nigerian Journal of Genetics, 18, 29–35.
- Akinpelu, D.A. (2001). Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. Fitoterapy, 72, 286–287.
- Akinwale, T.O. (2000). Cashew apple juice: its use in fortifying the nutritional quality of some tropical fruits. European Food Research and Technology, 211: 205-207.
- Alexander–Lindo, R.L., Morrison, E.S.A., Nair, M.G. (2004). Hypoglycaemic effect of stigmasterone and its corresponding alcohol from the bark of *Anacardium occidentale* (cashew). Phytotherapy Research 18, 403–407.
- Azam-Ali, S.H., Judge, E.C. (2001). Small-scale cashew nut processing. Rugby, UK: Food and Agriculture organization – FAO. http://www.anacardium.info/IMG/pdf/Smallscale_Cashew_Nut_Processing_FAO_2001.pdf. Accessed 30 October 2013.
- Barcelos, G.R.M., Shimabukuro, F., Mori, M.P., Maciel, M.A.M., Cólus, I.M.D.S. (2007). Evaluation of mutagenicity and antimutagenicity of cashew stem bark methanolic extract in vitro. Journal of Ethnopharmacology, 114, 268–273.
- Barros, L.M. (1995). Botânica, origem e distribuição geográfica. In: Araújo JPP, Silva VV (eds) Cajucultura: Modernas Técnicas de Produção. EMBRAPA/CNPAT, Fortaleza, pp 55–72.
- Barros, L.M., Paiva, J.R., Cavalcanti, J.J.V., Araújo, J.P.P. (2002). Cajueiro. In: Bruckner CH (ed) Melhoramento de fruteiras tropicais. Editora UFV, Viçosa. pp 159–176.
- Breiteneder, H., Radauer, C. (2004). A classification of plant food allergens. Journal of allergy and clinical immunology, 113, 821-830.
- Chang, S.K.C. (2006). Chapter 95. Soymilk and Tofu Manufacturing. In: Handbook of food products manufacturing. (ed Y. H. Hui), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Dendena, B., Corsi, S. (2014). Cashew, from seed to market: a review. Agronomy for Sustainable Development, 34, 753-772.

- De Vuyst, L., Vrancken, G., Ravyts, F., Rimaux, T. et al., Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiology* 2009, 26, 666–675.
- EFSA journal, 2005. Parare del gruppo di esperti scientifici sugli additivi alimentari, gli aromatizzanti, i coadiuvanti tecnologici e i materiali a contatto con gli alimenti su richiesta della commissione in merito all'uso di nisina (E234) come additivo alimentare.
- Fitzpatrick, J. (2011). Cashew nut processing equipment study-summary. African Cashew initiative. http://www.africancashewalliance.com/sites/default/files/documents/equipment_study_ab_pdf_final_13_9_2011.pdf. Accessed on 26 October 2013.
- Fleet, G. H. (2007). Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology* 2007, 18, 170–175.
- Food and Agriculture Organization – FAO (2013a) <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QC/E>. Accessed on 14 October 2013.
- Gallina Toschi, T., Caboni, M.F., Penazzi, G., Lercker, G., Capella, P. (1993). A study on cashew nut oil composition. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70(10), 1017–1020.
- Galvez, A. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51–70.
- Huys, G., Leisner, J., Bjorkroth, J. (2012). The lesser LAB gods : *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium* and affiliated genera. In: *Lactic acid bacteria - microbiological and functional aspects*. red. / Sampo Lahtinen; Arthur C. Ouwehand; Seppo Salminen; Atte von Wright. 4. udg. C R C Press LLC, 2012. s. 93-122.
- Harilal, K.N., Kanji, N., Jeyaranjan, J., Eapen, M., Swaminathan, P. (2006). Power in global value chains: implications for employment and livelihoods in the cashew nut industry in India. International Institute for Environment and Development (IIED). Printed by Oldacres Ltd, London, UK.
- Hemshekhar, M., Santhosh, S.M., Kemparaju, K., Girish, K.S. (2011). Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: a pharmacological overview. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 110, 122–132.

- Hu, F.B., Manson, J.E., Willett, W.C. (2001). Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. *Journal of the American College and Nutrition*, 20, 5–19.
- Lim, T.K. (2012). *Anacardium occidentale*. In: *Edible medicinal and nonmedicinal plants*, Springer, Netherlands, pp. 45–68
- Martin, P.J., Topper, C.P., Bashiru, R.A., Boma, F., De Waal, D., Harries, H.C., Kasuga, L.J., Katanila, N., Kikoka, L.P., Lamboll, R., Maddison, A.C., Majule, A.E., Masawe, P.A., Millanzi, K.J., Nathaniels, N.Q., Shomari, S.H., Sijaona, M.E., Stathers, T. (1997). Cashew nut production in Tanzania: constraints and progress through integrated crop management. *Crop Protection*, 16, 5–14.
- Mitchell, J.D., Mori, S.A. (1987). The cashew and its relatives (*Anacardium: Anacardiaceae*). *Memories on the New York botanical garden*, 42, 1-76.
- Mohanty, S., Ray, P., Swain, M.R., Ray, R.C. (2006). Fermentation of cashew (*Anacardium occidentale L.*) “apple” into wine. *Journal of Food Processing and Preservation* 30, 314-322.
- Moncur, M.W., Wait, A.J. (1986). Floral ontogeny of the cashew *Anacardium occidentale L.* (Anacardiaceae). *Scientia Horticulturae*, 30, 203–211.
- Nair, K.P. (2010). The agronomy and economy of important tree crops of the developing world. Access Online via Elsevier.
- Safran Foer. J. (2010). *Se niente importa*, *Eds.* Guanda.
- Silveira, M.S., Fontes, C.P., Guilherme, A.A., Fernandes, F.A., Rodrigues, S. (2012). Cashew apple juice as substrate for lactic acid production. *Food and Bioprocess Technology* 5, 947–953.
- Shurtleff, W., and Aoyagi, A. (1979). *The book of tempeh*.
- Tyman, J.H.P., Johnson, R.A., Muir, M., Rokhgar, R. (1989). The extraction of natural cashew nut-shell liquid from the cashew nut (*Anacardium occidentale*). *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 66, 553-557;
- Venkatachalam, M., Sathe, S.K. (2006). Chemical composition of selected edible nut seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4705–4714.

Siti consultati:

- www.tuttogreen.it;
- Sito ufficiale dell'associazione italiana celiachia: www.celiachiaitalia.com;
- www.agraria.org;
- www.my-personaltrainer.it;
- <http://www.meteoweb.eu/2014/06/numerose-propriet%C3%A0-salutari-degli-anacardi-caratteristici-semi-forma-cuore-rovesciato/291964/>;<http://www.allergiaesalute.it/1302-focus-su-allergia-alla-frutta-secca/>;
- http://www.studiomedicobordignon.it/index.php?option=com_content&view=article&id=325:frutti-a-guscio-noce-di-anacardio-o-acagiu-allergia-alla-noce-di-anacardio&catid=123:eziologia&Itemid=55;
- https://it.wikipedia.org/wiki/Olio_di_gusci_di_anacardo;
- <http://www.oeno.it/prodotti-enologici/batteri-lattici/>
- https://it.wikipedia.org/wiki/Fermentazione_alcolica
- <https://qualiform.wordpress.com/macchine-e-tecnologia/starter-e-probiotici/>