



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

Corso di Laurea Magistrale in

**BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA**  
**curriculum SCIENZE DELLA NUTRIZIONE**

**KEFIR DI SOIA: IMPIEGO DI LIEVITI PROBIOTICI DI TIPO**  
**NON-*Saccharomyces* IN CO-COLTURA CON *Lactobacillus casei* Shirota**  
**PER LA PRODUZIONE DI UN SUPERFOOD**

**SOY KEFIR: USE OF NON-*Saccharomyces* PROBIOTIC YEASTS IN**  
**CO-CULTURE WITH *Lactobacillus casei* Shirota**  
**TO PRODUCE A SUPERFOOD**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Eleonora Braconi

Relatore:

Prof.ssa Francesca Comitini

Correlatore:

Dott.ssa Alice Agarbati

**Anno Accademico 2020/2021**

*A mia nonna Carolina.*

*“Non è importante essere migliori di qualcun altro,  
ma essere migliori di ieri”.*

*[Jigoro Kano]*

## INDICE

<b>CAPITOLO 1: INTRODUZIONE</b> .....	pag. 10
<b>1.1 LA SOIA</b> .....	pag. 12
1.1.1 COMPOSIZIONE E INFORMAZIONI NUTRIZIONALI DELLA SOIA.....	pag. 12
1.1.2 LE BEVANDE A BASE DI SOIA.....	pag. 15
1.1.3 PROPRIETÀ BENEFICHE DELLA SOIA.....	pag. 16
<b>1.2 IL MICROBIOTA INTESTINALE</b> .....	pag. 17
1.2.1 I PROBIOTICI.....	pag. 20
1.2.2 BATTERI LATTICI.....	pag. 25
1.2.3 <i>Lactobacillus casei Shirota</i> .....	pag. 26
1.2.4 LIEVITI CON ATTITUDINE PROBIOTICA.....	pag. 24
1.2.5 CARATTERI PROBIOTICI DEI LIEVITI.....	pag. 29
<b>1.3 GLI ALIMENTI FUNZIONALI</b> .....	pag. 30
<b>1.4 I SUPERFOOD</b> .....	pag. 33
<b>1.5 LE BEVANDE FERMENTATE VEGETALI COME SUPERFOOD</b> ..	pag. 35
<b>1.6 IL KEFIR</b> .....	pag. 37
1.6.1 KEFIR ARTIGIANALE E INDUSTRIALE.....	pag. 37
1.6.2 COMPOSIZIONE MICROBIOLOGICA DEI GRANI DI KEFIR.....	pag. 41
1.6.3 POTENZIALITÀ NUTRIZIONALI E BENEFICHE DEL KEFIR.....	pag. 42
1.6.4 PRODOTTI COMMERCIALI A BASE DI KEFIR DI SOIA.....	pag. 46
<b>CAPITOLO 2: SCOPO DELLA TESI</b> .....	pag. 47

<b>CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI.....</b>	<b>pag. 49</b>
<b>3.1 CEPPI DI LIEVITO E BATTERI IMPIEGATI.....</b>	<b>pag. 49</b>
<b>3.2 DETERMINAZIONE DEL POTENZIALE PROBIOTICO DEI LIEVITI.....</b>	<b>pag. 51</b>
3.2.1 CAPACITÀ DEL LIEVITO DI CRESCERE A 37°C.....	pag. 51
3.2.2 CAPACITÀ DI SOPRAVVIVERE A CONDIZIONI SIMILI A QUELLE DEL TRATTO GASTROINTESTINALE.....	pag. 52
3.2.3 ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE.....	pag. 52
3.2.4 AZIONE ANTIMICROBICA.....	pag. 53
<b>3.3 PRODUZIONE DEL KEFIR DI SOIA: ALLESTIMENTO DELLA FERMENTAZIONE.....</b>	<b>pag. 54</b>
3.3.1 PROVE PRELIMINARI DI COESISTENZA DEI LIEVITI.....	pag. 54
3.3.2 ALLESTIMENTO DELLA FERMENTAZIONE.....	pag. 56
3.3.3 SECONDA PROVA DI FERMENTAZIONE: RIMODULAZIONE DEL TEMPO DI FERMENTAZIONE.....	pag. 60
<b>3.4 ANALISI MICROBIOLOGICHE.....</b>	<b>pag. 61</b>
<b>3.5 ANALISI CHIMICHE.....</b>	<b>pag. 65</b>
3.5.1 DETERMINAZIONE DEL pH.....	pag. 66
3.5.2 DETERMINAZIONE DELL'ACIDO LATTICO.....	pag. 67
3.5.3 DETERMINAZIONE DELL'ACIDO ACETICO.....	pag. 68
3.5.4 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE.....	pag. 70
3.5.5 DETERMINAZIONE DEGLI ZUCCHERI RIDUCENTI.....	pag. 72
3.5.6 DETERMINAZIONE DEI POLIFENOLI.....	pag. 73
3.5.7 DETERMINAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI POLINSATURATI.....	pag. 74

<b>3.6 DETERMINAZIONE DEI PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE.....</b>	<b>pag. 75</b>
<b>3.7 ANALISI SENSORIALE.....</b>	<b>pag. 76</b>
<b>3.8 ANALISI STATISTICA.....</b>	<b>pag. 78</b>
<b>CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>pag. 79</b>
<b>4.1 ATTITUDINE PROBIOTICA DEL LIEVITO <i>Metschnikowia spp.</i>....</b>	<b>pag. 79</b>
<b>4.2 PROVE PRELIMINARI DI FERMENTAZIONE.....</b>	<b>pag. 81</b>
<b>4.3 PROVA DI FERMENTAZIONE SU BEVANDA DI SOIA.....</b>	<b>pag. 84</b>
4.3.1 EVOLUZIONE DELLA POPOLAZIONE MICROBICA.....	pag. 84
4.3.2 ANALISI CHIMICHE.....	pag. 87
4.3.3 PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE.....	pag. 94
4.3.4 ANALISI SENSORIALE.....	pag. 97
<b>4.4 SECONDA PROVA DI FERMENTAZIONE: RIMODULAZIONE DEL TEMPO DI FERMENTAZIONE.....</b>	<b>pag. 102</b>
4.4.1 EVOLUZIONE DELLA POPOLAZIONE MICROBICA.....	pag. 102
4.4.2 ANALISI CHIMICHE.....	pag. 105
4.4.3 PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE.....	pag. 109
4.4.4 ANALISI SENSORIALE.....	pag. 111
<b>CAPITOLO 5: CONCLUSIONI.....</b>	<b>pag. 113</b>
<b>CAPITOLO 6: RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....</b>	<b>pag. 118</b>
<b>RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>pag. 124</b>

## INDICE DELLE FIGURE

<b>Figura 1.</b> Ripartizione energetica del latte di soia.....	pag. 16
<b>Figura 2.</b> Schema suggerito dagli esperti (FAO/WHO, 2001) per la valutazione dei ceppi probiotici come integratori alimentari.....	pag. 23
<b>Figura 3.</b> Aree di interesse per il consumo di alimenti funzionali.....	pag. 32
<b>Figura 4.</b> Grani usati per la produzione tradizionale del kefir.....	pag. 38
<b>Figura 5.</b> Grani di kefir al microscopio elettronico.....	pag. 38
<b>Figura 6.</b> Allestimento della fermentazione: kefir di soia.....	pag. 57
<b>Figura 7.</b> Allestimento della prova: kefir di soia con differenti tempi di fermentazione.....	pag. 61
<b>Figura 8.</b> Colonie di <i>C. zeylanoides</i> su terreno WL.....	pag. 64
<b>Figura 9.</b> Colonie di <i>D. hansenii</i> 36 su terreno WL.....	pag. 64
<b>Figura 10.</b> Colonie di <i>D. hansenii</i> 78 su terreno WL.....	pag. 64
<b>Figura 11.</b> Colonie di <i>K. lactis</i> 80 su terreno WL.....	pag. 65
<b>Figura 12.</b> Colonie di <i>Metschnikowia</i> spp. su terreno WL.....	pag. 65
<b>Figura 13.</b> Acidimetro di Juffmann.....	pag. 69
<b>Figura 14.</b> Determinazione dell'attività antiossidante.....	pag. 71
<b>Figura 15.</b> Reazione tra DNS e glucosio.....	pag. 72
<b>Figura 16.</b> Retta di taratura zuccheri riducenti.....	pag. 72
<b>Figura 17.</b> Determinazione dei polifenoli.....	pag. 74
<b>Figura 18.</b> Retta di taratura acido gallico.....	pag. 74
<b>Figura 19.</b> Esempio cromatogramma analisi dei prodotti secondari di fermentazione tramite gascromatografia.....	pag. 76

<b>Figura 20.</b> Descrittori per l'analisi sensoriale.....	pag. 77
<b>Figura 21.</b> Prova preliminare: cinetica di crescita del pool di lieviti su YPD broth.....	pag. 82
<b>Figura 22.</b> Prova preliminare: cinetica di crescita dei lieviti su bevanda di soia.....	pag. 83
<b>Figura 23.</b> Cinetica di crescita del battere <i>L. casei Shirota</i> , dei lieviti <i>D. hansenii</i> 36 e Mp50 (a) e del pool di lieviti (b).....	pag. 86-87
<b>Figura 24.</b> Profilo sensoriale dei kefir di soia dopo 24 ore di fermentazione (a), due settimane di stoccaggio (b) e al termine dello stoccaggio (c). La figura (d) confronta i risultati ottenuti nei tre tempi di analisi.....	pag. 99-100
<b>Figura 25.</b> Cinetica di crescita del battere <i>L. casei Shirota</i> e del pool di lieviti in campioni con tempo di fermentazione 24 ore (a) e 120 ore (b).....	pag. 104
<b>Figura 26.</b> Analisi sensoriale dei kefir di soia dopo 24 ore e 120 ore di fermentazione.....	pag. 112

## INDICE DELLE TABELLE

<b>Tabella 1.</b> Differenti composizioni dei legumi.....	pag. 13
<b>Tabella 2.</b> Evoluzione della definizione di “probiotico”.....	pag. 21
<b>Tabella 3.</b> Classificazione scientifica di <i>L. casei Shirota</i> .....	pag. 26
<b>Tabella 4.</b> Principali aree di ricerca in cui è stato impiegato il <i>L. casei Shirota</i> .....	pag. 27
<b>Tabella 5.</b> Ceppi di lievito e battere impiegati nel presente studio.....	pag. 50
<b>Tabella 6.</b> Prova preliminare su YPD broth.....	pag. 55
<b>Tabella 7.</b> Prova preliminare su latte di soia.....	pag. 56
<b>Tabella 8.</b> Inoculi battere e lieviti nel kefir di soia.....	pag. 57
<b>Tabella 9.</b> Schema di allestimento della prova di fermentazione di kefir di soia.....	pag. 58
<b>Tabella 10.</b> Protocollo produzione kefir di soia.....	pag. 59
<b>Tabella 11.</b> Composizione MRS agar.....	pag. 62
<b>Tabella 12.</b> Composizione WL (Wallerstain Laboratory) Nutrient Agar.....	pag. 63
<b>Tabella 13.</b> Caratteristiche sensoriali attese nel kefir.....	pag. 78
<b>Tabella 14.</b> Risultati attitudine probiotica del lievito <i>Metschnikowia spp.</i> .....	pag. 80
<b>Tabella 15.</b> Prova preliminare su latte di soia: monitoraggio del pH.....	pag. 84
<b>Tabella 16.</b> Analisi chimiche, a differenti tempi di monitoraggio, dei kefir di soia....	pag. 88
<b>Tabella 17.</b> Contenuto degli acidi grassi nei kefir al termine del periodo di stoccaggio.....	pag. 92
<b>Tabella 18.</b> Principali prodotti secondari di fermentazione nel kefir di soia.....	pag. 94-95
<b>Tabella 19.</b> Note aromatiche percepite durante la degustazione dei kefir.....	pag. 101
<b>Tabella 20.</b> Analisi chimiche dei campioni con tempo di fermentazione 24 e 120 ore.. .....	pag. 107



**Tabella 21.** Determinazione degli acidi grassi polinsaturi: campioni con differenti tempi di fermentazione.....pag. 108

**Tabella 22.** Principali prodotti secondari di fermentazione nel kefir di soia: campioni con differenti tempi di fermentazione.....pag. 110

# CAPITOLO 1

## INTRODUZIONE

*“Fa che il cibo sia la tua medicina e che la medicina sia il tuo cibo”* scrisse Ippocrate di Kos, padre della medicina, sottolineando la correlazione tra la salute e l'alimentazione, un concetto molto antico, noto dai tempi più remoti, e oggi più che mai attuale.

Le abitudini alimentari sono strettamente legate alla storia dell'umanità, essendo condizionate da fattori geografici, ambientali, sociali ed economici, che a loro volta influenzano e condizionano l'evoluzione della specie umana, con meccanismi biologici in gran parte ancora oscuri (Cozzani e Dainese, 2006).

Oggi l'idea che lo scopo primario di una sana e corretta alimentazione sia fornire macro- e micronutrienti sufficienti a soddisfare le esigenze nutrizionali della persona è un concetto in parte superato o, più precisamente, completato da un'altra importante concezione, orientata non solo al raggiungimento e mantenimento di uno stato di salute ottimale attraverso la dieta, ma volta al suo miglioramento. È noto che alcuni alimenti, o componenti alimentari, procurano benefici che vanno oltre il semplice apporto di principi nutritivi di base, come carboidrati e proteine. Sono state infatti identificate numerose molecole biologicamente attive, in grado di ottimizzare il benessere sia fisiologico che mentale e di ridurre il rischio di contrarre malattie.

L'ampliamento del concetto di sana alimentazione ha come diretta conseguenza il crescente interesse, da parte del consumatore e di conseguenza dell'industria alimentare, verso gli alimenti funzionali: alimenti specificamente sviluppati per favorire la salute o ridurre il rischio dell'insorgenza di patologie.

In questa categoria si inserisce il kefir, una bevanda fermentata a base di latte, consumata abitualmente nelle regioni caucasiche ma del tutto sconosciuta in Occidente fino a pochi anni fa. Il kefir apporta numerosi benefici per la salute, attribuiti alla presenza di un consorzio di microrganismi che comprende batteri e lieviti con potenziale probiotico (Gut et al., 2019). La categoria dei probiotici costituisce oggi un campo di ricerca molto vasto, volto al miglioramento dell'equilibrio intestinale e alla prevenzione delle disbiosi.

A queste necessità nutrizionali si aggiungono la maggiore diffusione di intolleranze alimentari, in particolare nei confronti del latte vaccino, e di diete vegetariane o vegane. Le ragioni di questa scelta sono diverse e comprendono principalmente obiettivi etici, ecologici e di salute. Con la crescente adozione di stili di vita vegetariani, una grande varietà di prodotti vegetali è diventata maggiormente disponibile sul mercato. La soia e gli alimenti a base di soia rappresentano soluzioni nutrizionali comuni per i vegetariani, grazie al loro alto contenuto proteico e alla versatilità nella produzione di analoghi della carne e sostituti del latte (Rizzo e Baroni, 2018; Tangyu et al., 2019).

In questo contesto si inserisce l'idea della selezione di un consorzio microbico capace di fermentare latte di soia, per la produzione di un kefir o simil kefir, completamente vegetale. Lo scopo finale è quello di coadiuvare i benefici di una bevanda tradizionalmente considerata panacea di ogni male con quelli della soia, in una soluzione ottimale per diete vegane, ipocaloriche, naturali o per consumatori con intolleranza al lattosio. In aggiunta risulta essere un argomento interessante e promettente, che riserverà per il futuro ampie possibilità di ricerca e sviluppo.

## ***1.1 LA SOIA***

La soia, *Glicine max* (L.), è una pianta annuale di origine asiatica appartenente alla famiglia delle *Fabaceae*, denominate in precedenza *Leguminosae*.

Storicamente i maggiori consumatori mondiali di soia sono le popolazioni asiatiche, tuttavia nell'ultimo decennio il consumo di alimenti a base di soia nei paesi occidentali è cresciuto con la diffusione dello stile di vita vegetariano e la percezione sana della sua assunzione. Ad oggi è uno dei prodotti alimentari più coltivati nel mondo: la produzione mondiale raggiunge circa 353 milioni di tonnellate (dati 2017, fonte: FAO) mentre l'Italia è il paese europeo con la più alta produzione di fagioli di soia, con 933.140 tonnellate all'anno, basate su colture OGM-free (Rizzo e Baroni, 2018).

Normalmente, per l'alimentazione umana si usano i semi, che possono essere consumati interi (spesso fermentati) oppure macinati.

Tra i prodotti alimentari a base soia si ritrovano la farina di soia, le bevande di soia, l'olio di soia, il tofu, la salsa di soia, e molti altri.

### ***1.1.1 COMPOSIZIONE E INFORMAZIONI NUTRIZIONALI DELLA SOIA***

L'alto contenuto proteico, insieme al basso contenuto di carboidrati, caratterizza la soia come una fonte proteica vegetale unica rispetto ad altri legumi. Il contenuto proteico dei semi di soia varia tra il 36% e il 46%, a seconda delle coltivazioni; inoltre la soia, sulla base di studi sul bilancio dell'azoto umano, ha dimostrato avere proteine di alta qualità.

Uno dei metodi analitici più accettati è il Protein Digestibility Corrected for Amino Acid Score (PDCAAS), che valuta la qualità di una proteina sulla base del fabbisogno di aminoacidi degli esseri umani e sulla loro capacità di digerirla. Il valore massimo che può

essere raggiunto è il 100% o 1.00 di PDCAAS, quindi dopo la digestione essa fornisce per unità di proteina il 100% o più degli amminoacidi indispensabili richiesti.

I valori di PDCAAS riportati per la soia variano tra 0.91 e 1.00 che sono paragonabili alla qualità proteica di fonti animali. Altri metodi per definire la qualità proteica sono: Biological Value (BV), Net Protein Utilization (NPU), Nitrogen Balance e Protein Efficiency Ratio (PER).

La composizione in nutrienti di alcuni legumi, compresi i fagioli di soia, è riassunta nella Tabella 1 (Rizzo e Baroni, 2018).

Food	Energy <sup>2</sup>	Protein <sup>3</sup>	Carbohydrate <sup>3</sup>	Fats <sup>3</sup>	Fibre <sup>3</sup>	PUFA <sup>3,4</sup>	Iron <sup>5</sup>	Calcium <sup>5</sup>
Azuki beans	329	19.87	62.90	0.53	12.7	0.113	4.98	66
Fava beans	341	26.12	58.29	1.53	25.0	0.627	6.70	103
Chickpeas	378	20.47	62.95	6.04	12.2	2.731	4.31	57
Green peas	352	23.82	63.74	1.16	25.5	0.495	4.82	37
Kidney beans	333	23.58	60.01	0.83	24.9	0.457	8.20	143
Lentils	352	24.63	63.35	1.06	10.7	0.526	6.51	35
Lima beans	338	21.46	36.38	0.69	19.0	0.309	7.51	81
Lupins	371	36.17	40.37	9.74	18.9	2.439	4.36	176
Mug beans	347	23.86	62.62	1.15	16.3	0.384	6.74	132
Mungo beans	341	25.21	58.99	1.64	18.3	1.071	7.51	138
Navy beans	337	22.33	60.75	1.50	15.3	0.873	5.49	147
Peanuts	567	25.8	16.13	49.24	8.5	15.558	4.58	92
Pinto beans	347	21.42	62.55	1.23	15.5	0.407	5.07	113
Soy beans	446	36.49	30.16	19.94	9.3	11.255	15.70	277

<sup>1</sup> From USDA Food Composition Databases [15]. <sup>2</sup> Kcal per 100 g. <sup>3</sup> g per 100 g. <sup>4</sup> PUFA: polyunsaturated fatty acids. <sup>5</sup> mg per 100 g.

**Tabella 1.** Differenti composizioni dei legumi.

I componenti della soia che hanno stimolato il maggior interesse della ricerca sono gli isoflavoni, un gruppo di composti fitonutrienti con azione antiossidante. Fanno parte della categoria dei fitoestrogeni, sostanze di origine vegetale simili agli estrogeni umani sia dal punto di vista strutturale che da quello funzionale

(<https://www.humanitas.it/enciclopedia/integratori-alimentari/isoflavoni/>).

Il loro contenuto nella soia è molto più elevato rispetto ad altre fonti alimentari, ed è stato dimostrato l'effetto benefico sulla salute.

Le diverse condizioni climatiche e le pratiche di coltivazione portano a dimensioni variabili del fagiolo di soia e quindi del contenuto di isoflavoni (Rizzo e Baroni, 2018). Si è visto che le piante sintetizzano gli isoflavoni da vari stimoli di stress ambientali, come le infezioni o la scarsità di nutrienti.

I principali isoflavoni contenuti nei semi di soia sono: genisteina, daidzeina e gliciteina.

Oltre agli isoflavoni e alle proteine, i semi di soia sono una buona fonte di acidi grassi insaturi, specialmente di acido linoleico, un acido grasso polinsaturo omega-6 ritenuto benefico per la salute umana.

In aggiunta la soia presenta vitamine del gruppo B, fibre, ferro, calcio, zinco e altri composti bioattivi che la rendono un buon candidato per un alimento funzionale.

Il contenuto di fibre della soia è costituito principalmente da pectine, un tipo di fibra vegetale ben fermentabile dal microbiota intestinale: infatti, gli oligosaccaridi della soia sono stati proposti come prebiotici o alternative allo zucchero.

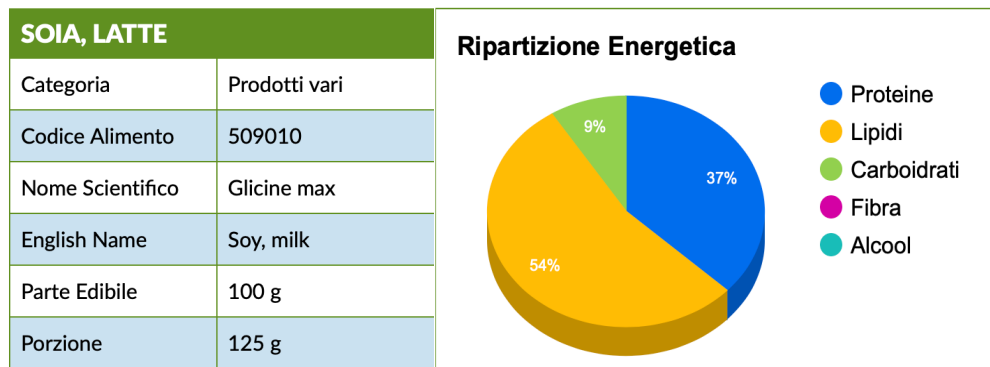
Per ultimo la soia contiene una vasta gamma di sostanze fitochimiche come l'acido fitico (1.0-2.2%), gli steroli (0.23-0.46%) e le saponine (0.17-6.16%), con un ampio spettro di potenziali benefici per la salute (Rizzo e Baroni, 2018). Nonostante i numerosi benefici della soia appena elencati, una piccola parte dell'opinione pubblica tende a demonizzare tale alimento, considerato sia in quanto tale che come ingrediente di altri cibi, principalmente a causa delle sue manipolazioni genetiche. È noto, infatti, che la soia sia tra le coltivazioni vegetali maggiormente modificata geneticamente (<https://royalsociety.org/topics-policy/projects/gm-plants/what-gm-crops-are-currently-being-grown-and-where/>). Negli Stati Uniti la soia geneticamente modificata è diventata addirittura molto più diffusa di

quella naturale, proprio perché la sua coltivazione è molto meno costosa, è garantito un maggiore raccolto e il diserbante viene distribuito spesso tramite un velivolo riducendo così l'utilizzo di macchine e trattori e, di conseguenza, anche le spese per la manodopera, a favore di un maggiore guadagno finale.

### *1.1.2 LE BEVANDE A BASE DI SOIA*

La bevanda di soia, chiamata comunemente anche latte di soia, consiste nell'estratto acquoso della soia (Wang et al., 2003) e il suo uso nei prodotti caseari fermentati è considerato una buona alternativa al latte vaccino, grazie al contenuto di proteine di alta qualità, isoflavoni e fibre alimentari. Inoltre, non contiene colesterolo né lattosio e solo una piccola quantità di acidi grassi saturi, pertanto è adatta ai consumatori intolleranti al lattosio (Karaçali et al., 2018); la Figura 1 rappresenta la ripartizione media energetica della bevanda (o latte) di soia (CREA: <https://www.alimentinutrizione.it/tabelle-nutrizionali/509010>). Tuttavia, i costituenti oligosaccaridici della soia come il raffiniosio e lo stachiosio non sono digeriti dagli esseri umani e quindi possono causare flatulenza. Questo, insieme al sapore sgradevole di fagioli, ha limitato il consumo della soia come materia prima alimentare (Wang et al., 2003).

Sono disponibili numerosi studi scientifici che riportano come i processi di fermentazione possano mascherare il caratteristico sapore e diminuire i frutto-oligosaccaridi non digeribili (da Silva et al., 2018); in aggiunta la fermentazione porta a un aumento dei peptidi bioattivi, che hanno proprietà antidiabetiche, antiossidanti, anticancro e ipocolesterolemiche.



**Figura 1.** Ripartizione energetica del latte di soia.

### 1.1.3 PROPRIETÀ BENEFICHE DELLA SOIA

Gli effetti benefici sulla salute umana dipendono soprattutto dal contenuto proteico e di isoflavoni dei semi di soia.

Tra gli effetti più importanti attribuiti agli isoflavoni, rientrano la protezione dei recettori degli estrogeni, la riduzione degli effetti collaterali della menopausa, la riduzione dei livelli del colesterolo LDL del 10-15% e la protezione delle cellule dell'organismo dal danno ossidativo. Per quanto riguarda la riduzione degli effetti della menopausa, gli isoflavoni sembrano essere di aiuto a partire dal periodo della premenopausa, riducendo i sintomi tipici di questa condizione (quali le vampate di calore), e contribuendo a migliorare l'aspetto estetico (soprattutto pelle e capelli); sembra inoltre che siano di aiuto nel mantenere la mobilità delle articolazioni e il mantenimento della densità minerale ossea durante questo particolare periodo della vita femminile (<https://www.humanitas.it/enciclopedia/integratori-alimentari/isoflavoni/>). Si è visto che la sostituzione di alimenti ricchi di acidi grassi saturi con alimenti di soia ha portato a una diminuzione della concentrazione di colesterolo, riducendo il rischio di malattia coronarica (Rizzo e Baroni, 2018). In aggiunta uno studio giapponese pubblicato su *Nutritional Journal* ha mostrato come il consumo regolare di soia



sia associato alla qualità del riposo notturno, grazie agli isoflavoni. Infine, grazie al suo contenuto di fibra aiuta a regolarizzare l'intestino e permette un miglior assorbimento sia della glicemia sia del colesterolo. (<https://www.humanitasalute.it/alimentazione/93511-i-benefici-della-soia/>).

## ***1.2 IL MICROBIOTA INTESTINALE***

Il termine “microbiota intestinale” ha sostituito la vecchia denominazione “microflora” e corrisponde alla componente microbica dell'ecosistema intestinale. L'EFSA (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare), infatti, definisce il microbiota come: *“The communities of microorganisms and their genomes in a defined environment are collectively referred to as microbiomes. They include representatives from the Bacteria, Archaea, lower and higher Eukarya, and viruses, and are found in most environments such as soils, aquatic habitats, surfaces and specific lumen of plants, animals and humans”* (Merten et al., 2020).

La relazione che si stabilisce tra microbiota e ospite può essere di tipo commensale o simbiotico.

I batteri del microbiota svolgono un ruolo fondamentale nel prevenire la colonizzazione intestinale da parte dei patogeni, e quindi la loro penetrazione nell'organismo: è dunque indispensabile che il sistema immunitario riconosca i componenti del microbiota come *self* e stabilisca una condizione di tolleranza nei loro confronti, non attaccandoli. La tolleranza immunologica nei confronti del microbiota è mediata da alcuni meccanismi complementari tra loro:

- i batteri del microbiota non esprimono fattori di virulenza e strutture antigeniche riconoscibili dai recettori epiteliali, detti TLR (*toll-like-receptors*), presenti sulla superficie delle cellule del sistema immune;
- alcuni batteri commensali sono in grado di sopprimere processi flogistici (attraverso meccanismi di soppressione o *down regulation*) di alcuni elementi del sistema immune.

Il microbiota e la mucosa epiteliale formano quindi un sistema di difesa, la barriera mucosa, nei confronti dei fattori potenzialmente patogeni (virus e batteri), che si oppone alla loro colonizzazione dell'intestino (Farris et al., 2012).

L'intestino è caratterizzato da una bassa concentrazione di ossigeno, alta pressione osmotica, un pH neutro e una temperatura di 37°C, caratteristiche che influenzano la composizione del microbiota.

Il duodeno e il digiuno risentono dell'acidità dello stomaco, pertanto in questa sede la concentrazione batterica rimane bassa, intorno a  $10^5$  cellule/ml, con una predominanza di streptococchi, lattobacilli, *Bacteroides* spp. e *Bifidobacterium* spp. Il numero di microrganismi aumenta invece in maniera rilevante nell'ileo, dove la concentrazione si eleva fino a  $10^9$  cellule/ml e la popolazione microbica si diversifica, compaiono *Enterococcus faecalis*, *Veillonella* spp. e *Clostridium* spp. Il colon ospita una popolazione complessa composta da circa  $10^{14}$  microrganismi, e spesso quando si parla di microflora batterica intestinale ci si riferisce indirettamente a quella del colon. I phyla dei *Bacteroidetes* e *Firmicutes* sono generalmente maggioritari, ma sono presenti anche altre specie (Dehò e Galli, 2014).

La composizione del microbiota è specifica per ogni individuo e si stabilizza intorno ai due anni di vita, per poi rimanere costante fino a 70-75 anni; ad oggi non esiste un consenso

scientifico sulla composizione di un microbiota che si possa definire “sano” (Farris et al., 2012).

Si è visto che il microbiota contribuisce alla salute dell’uomo fornendo una serie di funzioni fisiologiche assenti nel metabolismo umano, come ad esempio:

- la **digestione degli zuccheri complessi**, per i quali non sono presenti enzimi digestivi di produzione umana ma vengono idrolizzati da enzimi prodotti dai batteri intestinali;
- la **sintesi degli acidi grassi a catena corta (SCFA)** come l’acido propionico, acetico e butirrico, che fungono da fonte di energia per le cellule dell’epitelio del colon o per altri batteri intestinali;
- la **rimozione di sostanze tossiche** provenienti dai processi fermentativi;
- la **detossificazione** delle sostanze xenobiotiche potenzialmente tossiche;
- la **sintesi di vitamine** del gruppo B e K, che assicurano all’organismo un corretto apporto vitaminico;
- la **protezione contro i patogeni**, attraverso meccanismi diversi che includono la competizione per i nutrienti, l’esclusione di superficie e la produzione di sostanze antimicrobiche.

Tutte queste caratteristiche benefiche sono particolarmente presenti nei probiotici (Dehò e Galli, 2014; Farris et al., 2012), dunque la selezione di batteri utili a ripristinare o rafforzare le funzioni fisiologiche dell’organismo porta a ottenere batteri probiotici da incorporare negli alimenti o usare tal quali come integratori (Farris et al., 2012).

### *1.2.1 I PROBIOTICI*

Il termine “probiotico” deriva dal greco "pro-bios" e letteralmente significa “a favore della vita”; fu coniato nel 1965 da Lilly e Stillwell, che per primi descrissero alcune sostanze prodotte da un microrganismo in grado di stimolare la crescita di altri batteri, e quindi di essere probiotico (pro-vita), in contrapposizione al termine antibiotico.

Nel corso del tempo il termine ha assunto significati diversi, riportati nella Tabella 2, in funzione di una graduale evoluzione legata all’acquisizione di nuove conoscenze, spostando l’accento dalle sostanze ai microrganismi e aggiungendo il concetto di “adeguata quantità” (Farris et al., 2012).

DEFINIZIONE	AUTORI	NOTE	BIBLIOGRAFIA
Sostanze che prolungano la fase logaritmica di crescita in altre specie microbiche	Lilly & Stillwell, 1965		Lilly DM, Stillwell RH. "Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms" Science. 1965 Feb 12;147(3659):747-8.
Microrganismo vivente che esercita un effetto positivo sulla salute dell'ospite con il risultato di rafforzare l'ecosistema intestinale	Fuller, 1989	Passaggio da sostanze a microrganismo e accenno all'ecosistema intestinale	Fuller R. Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol. 1989 May;66(5):365-78. PMID: 2666378.
Organismi vivi che, consumati in quantità adeguata, conferiscono un beneficio all'ospite	Guarner & Schaafsma, 1998	Compare la necessità di una "adeguata quantità"	Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. Int J Food Microbiol. 1998 Feb 17;39(3):237-8.
Organismi vivi che, somministrati in quantità adeguata, apportano un beneficio alla salute dell'ospite	FAO/OMS, 2001	Precisazione dell'effetto benefico per la salute	<a href="http://www.fao.org">http://www.fao.org</a>
Microrganismi vivi e vitali che conferiscono benefici alla salute dell'ospite quando consumati, in adeguate quantità, come parte di un alimento o di un integratore	Ministero della Salute, 2005	Riprende la definizione FAO/OMS aggiungendo il riferimento agli integratori alimentari	<a href="http://www.salute.gov.it">http://www.salute.gov.it</a>

**Tabella 2.** Evoluzione della definizione di "probiotico" (Farris et al., 2012).

Attualmente i probiotici sono definiti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e dall'Organizzazione per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO) come "*microrganismi vivi che, se somministrati in quantità adeguate, forniscono effetti benefici alla salute umana*"; un esempio è la stimolazione del sistema immunitario, o la riduzione delle malattie infiammatorie intestinali (Agarbatl et al., 2020). In questa definizione si sottintende un effetto-dose strettamente legato al microrganismo somministrato. La dose ottimale per ottenere l'effetto benefico sull'ospite doveva essere determinata attraverso prove cliniche. Più recentemente è stata modificata la definizione precedente, indicando come ottimale un

numero di cellule vive pari a  $10^9$  CFU/ml, indipendentemente dal microrganismo considerato (Ubaldi e Callegari, 2019).

Per **alimenti/integratori con probiotici** si intendono “*quegli alimenti che contengono, in numero sufficientemente elevato, microrganismi probiotici vivi e attivi, in grado di raggiungere l'intestino, moltiplicarsi ed esercitare un'azione di equilibrio sulla microflora intestinale mediante colonizzazione diretta. Si tratta quindi di alimenti in grado di promuovere e migliorare le funzioni di equilibrio fisiologico dell'organismo, attraverso un insieme di effetti aggiuntivi rispetto alle normali attività nutrizionali*” ([https://www.salute.gov.it/portale/temi/p2\\_6.jsp?lingua=italiano&id=1426&area=Alimenti%20particolari%20e%20integratori&menu=integratori](https://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=1426&area=Alimenti%20particolari%20e%20integratori&menu=integratori)). Pertanto, i probiotici vengono aggiunti agli alimenti non a fini tecnologici (trasformazione e conservazione della materia prima), bensì per apportare benefici alla salute di chi li consuma (Farris et al., 2012).

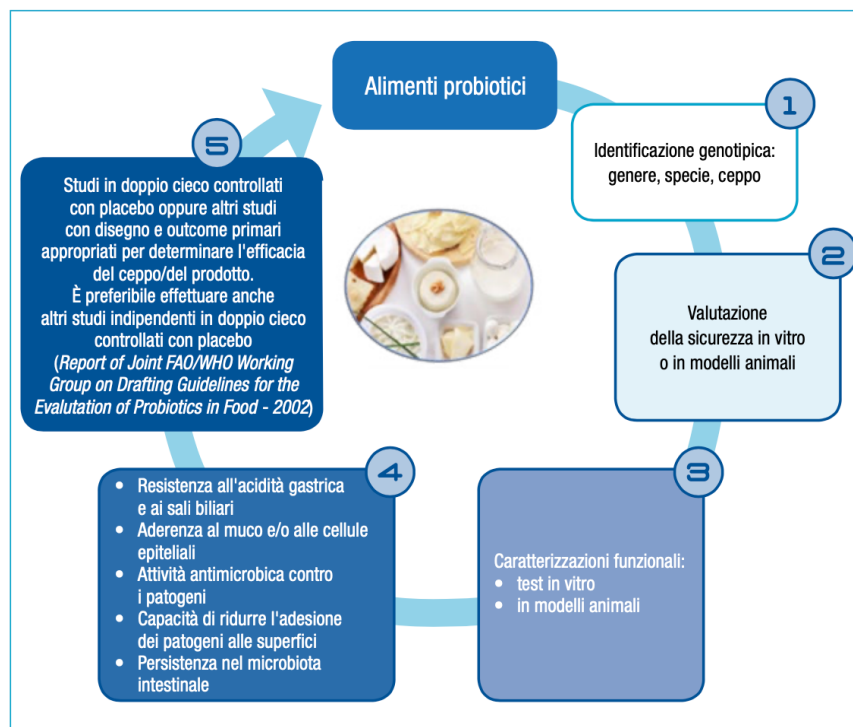
Per espletare la loro funzione probiotica, secondo le linee guida del Ministero della Salute (rev. marzo 2018), i microrganismi devono soddisfare i seguenti requisiti:

- a) **essere usati tradizionalmente per integrare la microflora (microbiota) intestinale dell'uomo.** L'insediamento è possibile solo se i ceppi batterici ingeriti sono in grado di superare i diversi ostacoli opposti dal tratto gastrointestinale (succo gastrico, azione tensio-attiva dei sali biliari). I lattobacilli presentano percentuali di sopravvivenza all'ambiente gastrico estremamente variabili da ceppo a ceppo. Ceppi di *Lactobacillus casei* si dimostrano più resistenti, anche se permane la variabilità di comportamento;
- b) **essere considerati sicuri per l'impiego nell'uomo.** Un utile riferimento a tal fine è rappresentato dai criteri emanati a cura della European Food Safety Authority (EFSA) circa lo status di “QPS” (“Presunzione Qualificata di Sicurezza”). In ogni

caso i microrganismi usati per la produzione di alimenti non devono essere portatori di antibiotico-resistenza acquisita e/o trasmissibile;

- c) **essere attivi a livello intestinale in quantità tale da potersi moltiplicare.** La porzione di prodotto raccomandata per il consumo giornaliero deve contenere una quantità pari a  $10^9$  cellule vive per almeno uno dei ceppi presenti. L'uso di quantità inferiori può essere sufficiente solo se adeguati studi scientifici, per il ceppo in questione, supportano la capacità di colonizzare a livello intestinale. In ogni caso, la quantità di cellule vive presenti nel prodotto deve essere garantita fino al termine della *shelf-life*.

Le caratteristiche di probioticità devono essere valutate prima *in vitro* e poi *in vivo*, come indicato in Figura 2.



**Figura 2.** Schema suggerito dagli esperti (FAO/WHO, 2001) per la valutazione dei ceppi probiotici come integratori alimentari (Ubaldi e Callegari, 2019).

Oltre che con i probiotici, gli alimenti possono essere supplementati con i **prebiotici**, ovvero *“composti che, sfuggendo alla digestione del primo tratto gastrointestinale, vengono fermentati nel grosso intestino dove stimolano selettivamente la crescita e/o l’attività di alcune specie microbiche endogene (bifidobatteri e batteri lattici), favorendo così lo stato di salute dell’ospite”* (Gibson, 1999).

Sono presenti sempre più prove a favore degli effetti benefici attribuiti ai probiotici, tra cui il miglioramento della salute intestinale, il potenziamento della risposta immunitaria, la riduzione del colesterolo e la prevenzione del cancro. Le proprietà salutari sono ceppo-specifiche e influenzate sia dalla dose giornaliera che dai vari meccanismi d'azione: questi vanno dalla produzione di batteriocine e di acidi grassi a catena corta, all'abbassamento del pH intestinale, competizione tra nutrienti, stimolazione della funzione di barriera della mucosa e modulazione della risposta immunitaria (sia innata che acquisita). Mentre alcuni dei benefici per la salute sono ben documentati, altri richiedono ulteriori studi per essere confermati; infatti, ci sono prove sostanziali a sostegno dell'uso dei probiotici nel trattamento delle malattie diarroiche acute, nella prevenzione della diarrea associata agli antibiotici e nel miglioramento del metabolismo del lattosio, ma non ci sono prove sufficienti per raccomandarne l'uso in altre condizioni cliniche (Kechagia et al., 2013).

La composizione dell’alimento utilizzato per veicolare il probiotico riveste un’importanza fondamentale, dato che le sue caratteristiche possono influenzare notevolmente la vitalità delle cellule batteriche sia durante la *shelf-life* del prodotto, sia durante il transito nel tratto gastro-intestinale. I prodotti lattiero-caseari sono gli alimenti più comuni per veicolare i batteri probiotici al consumatore (Farris et al., 2012): alcuni esempi sono Actimel e Activia (Danone), Yakult, LC1 (Nestlè), ecc. In aggiunta, anche il settore non lattiero-caseario è in continua evoluzione, come risultato dei progressi della tecnologia alimentare e della



crescente domanda: alcuni esempi sono i succhi di frutta probiotici, il salame probiotico o il gelato probiotico.

### 1.2.2 BATTERI LATTICI

Nel linguaggio comune è frequente utilizzare i termini “probiotici” e “fermenti lattici” in modo equivalente. In realtà le due definizioni coincidono solo parzialmente, dal momento che non tutti i fermenti lattici sono probiotici e, viceversa, non tutti i probiotici sono fermenti lattici.

Dal punto di vista filogenetico, i batteri lattici sono batteri Gram-positivi, caratterizzati da un metabolismo fermentativo che prevede la sintesi di acido lattico come risultato della degradazione degli zuccheri. Questo gruppo di microrganismi non sporigeni include diversi generi suddivisi in oltre 200 specie, molto diversificate dal punto di vista metabolico e correlate filogeneticamente.

Tra i microrganismi probiotici, i lattobacilli costituiscono la parte maggioritaria. *Lactobacillus* è il genere tipo per la famiglia *Lactobacillales*, e include numerose specie diffuse in una grande varietà di habitat. Infatti, possono essere isolati in qualsiasi ambiente ricco di carboidrati (come i prodotti lattiero-caseari e i prodotti vegetali), nel tratto gastrointestinale e genitale umano, acque reflue etc.

Si definiscono tre tipi di metabolismo glucidico (Gobbetti e Corsetti, 2010):

- **Lattobacilli omofermentanti obbligati**, che degradano i carboidrati esosi quasi esclusivamente ad acido lattico mediante la via EMP (Embden-Meyerhof-Parnas);
- **eterofermentanti obbligati**, che degradano i carboidrati pentosi ed esosi attraverso la via 6-PG/PK (6-fosfogluconato/fosfochetolasi) e producono acido lattico, etanolo/acido acetico e CO<sub>2</sub> (assente in presenza di pentosi) in quantità equimolari;

- **eterofermentanti facoltativi**, che oltre a degradare gli esosi ad acido lattico tramite la glicolisi via EMP, sono in grado di catabolizzare i pentosi e spesso anche il gluconato attraverso la via 6-PG/PK.

### 1.2.3 *Lactobacillus casei* Shirota

In questo studio è stato impiegato il battere *Lactobacillus casei* Shirota, che appartiene al genere *Lactobacillus* e alla specie *casei*; il ceppo prende il nome dal dottor Minoru Shirota che nel 1930 lo selezionò e coltivò presso l'Università di Kyoto, in quanto capace di resistere all'esposizione all'acido gastrico e ai sali biliari, così da poter raggiungere e colonizzare l'intestino. Dal punto di vista metabolico *L. casei* Shirota è un eterofermentante facoltativo.

La Tabella 3 riporta la classificazione scientifica:

<b>Dominio</b>	<i>Prokaryota</i>
<b>Regno</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Phylum</b>	<i>Firmicutes</i>
<b>Classe</b>	<i>Bacilli</i>
<b>Ordine</b>	<i>Lactobacillales</i>
<b>Famiglia</b>	<i>Lactobacillaceae</i>
<b>Genere</b>	<i>Lactobacillus</i>
<b>Specie</b>	<i>L. casei</i>
<b>Ceppo</b>	<i>L. casei</i> Shirota

**Tabella 3.** Classificazione scientifica di *L. casei* Shirota.

Come nel caso di ogni probiotico, per *L. casei Shirota* è stata dimostrata la sopravvivenza nell'intestino, la modulazione del microbiota intestinale, la produzione di metaboliti benefici, la stabilità del ceppo e il consumo sicuro per l'uomo.

Si è visto che la somministrazione di *L. casei Shirota* determina nell'intestino un aumento di lattobacilli e bifidobatteri, specie batteriche considerate benefiche, e nel contempo determina una riduzione dei batteri potenzialmente dannosi come *Enterobacteriaceae*, *Streptococchi*, *Stafilococchi*, *Pseudomonas*, *Prevotella*.

Esiste un'ampia letteratura scientifica relativa a ricerche effettuate con l'utilizzo di *L. casei Shirota*; nella Tabella 4 sono riportate le varie condizioni cliniche in cui è stata valutata l'efficacia di *L. casei Shirota* in termini preventivi o terapeutici (Ubaldi e Callegari, 2019).

Disturbi gastrointestinali: stipsi, sindrome dell'intestino irritabile (IBS), malattie infiammatorie intestinali (IBD), intolleranza al lattosio, epatopatie, danno intestinale da farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS)
Malattie infettive: diarrea infettiva, diarrea associata alla terapia antibiotica (AAD) e diarrea associata a <i>Clostridium difficile</i> (CDAD), infezione da <i>Helicobacter pylori</i> , infezioni delle alte vie respiratorie
Malattie metaboliche e rischio cardiovascolare: diabete mellito, resistenza insulinica, ipertensione arteriosa
Asse intestino-cervello: stress, umore, sindrome da fatica cronica
Cancro: colon-retto, vescica, polmone, mammella, cervice uterina, vie biliari e fegato, utero
Sistema immunitario
Miscellanea: patologie della cavità orale, nutrizione enterale, osteoartrite, densità ossea, sport ecc.

**Tabella 4.** Principali aree di ricerca in cui è stato impiegato il *L. casei Shirota*.

#### 1.2.4 LIEVITI CON ATTITUDINE PROBIOTICA

Per molto tempo l'attenzione da parte dei ricercatori si è focalizzata sull'impiego di batteri come microrganismi probiotici, senza ampliare gli studi ai lieviti.

Nella prima metà del ventesimo secolo, Henri Boulard isolò una specie di lievito dal frutto del litchi, classificata come *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (CODEX), e ne studiò le proprietà probiotiche. Questo lievito è ad oggi raccomandato per la prevenzione e il trattamento delle malattie gastrointestinali umane, come: ADD (diarrea associata agli antibiotici), IBD (disturbi infiammatori intestinali), controllo del colesterolo nel siero, diarrea cronica nei pazienti immunodeficienti (diarrea legata all'AIDS) e diarrea acuta in adulti e bambini. In aggiunta, sembra che abbia anche effetti positivi nel trattamento delle infezioni da *Clostridium difficile* e *Helicobacter pylori*.

Il lievito rappresenta dunque una buona alternativa ai batteri probiotici, poiché è immune all'effetto antibiotico consentendo di limitare l'utilizzo di questi ultimi e di diminuire lo sviluppo di resistenze agli antibiotici.

Queste ragioni hanno portato i ricercatori a spostare l'attenzione sullo studio di altre specie di lievito con proprietà probiotiche.

Diversi ceppi non-*Saccharomyces* appartenenti ai generi *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* e *Torulaspota* sono stati recentemente proposti come microrganismi con potenziali benefici per la salute e numerose applicazioni biotecnologiche (Agarbati et al., 2020).

In aggiunta, alcuni lieviti come *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* sono stati approvati dall'EFSA (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare) e inclusi nella lista dei

microrganismi "*Qualified Presumption of Safety*" (QPS), poiché ritenuti sicuri per l'utilizzo umano.

Tuttavia, ad oggi solo *S. boulardii* è considerato un lievito probiotico, perché altre specie "alternative" necessitano di una caratterizzazione in vitro più completa prima del loro utilizzo per applicazioni umane (Agarbaty et al., 2020).

#### 1.2.5 CARATTERI PROBIOTICI DEI LIEVITI

Affinché un potenziale ceppo probiotico sia in grado di esercitare gli effetti benefici, ci si aspetta che esibisca alcune proprietà desiderabili.

Quelle attualmente determinate dai test in vitro sono:

- a) **capacità di crescere alla temperatura interna corporea (~37°C);**
- b) **capacità di sopravvivere e proliferare con le proibitive condizioni gastrointestinali**, in particolare l'acidità dello stomaco (pH < 3) e la presenza di sali biliari intestinali, al fine di assicurare la sopravvivenza durante il transito gastrico e della prima parte dell'intestino a un numero di microrganismi sufficiente per garantire la colonizzazione dei tratti intestinali;
- c) **attività antiossidante;**
- d) **attività antimicrobica contro i batteri patogeni.**

Altre caratteristiche desiderabili sono la capacità di:

- e) **adesione all'epitelio intestinale**, che saggia la capacità del ceppo di rimanere *in situ* una volta raggiunto l'intestino. Inoltre, è una proprietà importante per il successo della modulazione immunitaria e l'esclusione competitiva dei patogeni, così come la prevenzione della loro adesione e della colonizzazione;

f) **autoaggregazione**, poiché gli aggregati cellulari possono aumentare l'aderenza microbica nell'intestino;

g) **attività di idrolisi dei sali biliari**.

Tuttavia, il valore di questi parametri è ancora in discussione come conseguenza della mancanza di standardizzazione delle procedure operative (Kechagia et al., 2012; Gil-Rodríguez et al., 2015; Agarbati et al., 2020).

### ***1.3 GLI ALIMENTI FUNZIONALI***

Negli ultimi anni è stato sviluppato il concetto di “cibo funzionale”, per descrivere gli alimenti contenenti ingredienti che generano effetti positivi sulla salute dell'ospite, al di là del loro valore nutritivo. Tra questi vi sono quei prodotti che contengono componenti biologicamente attivi che migliorano la salute, come i probiotici (Kechagia et al., 2013).

Il concetto di alimento funzionale fu proposto per la prima volta a metà degli anni '80 in Giappone, sull'osservazione di un progressivo allungamento dell'età media che venne attribuito ai particolari effetti benefici generati dall'alimentazione giapponese, basata sul largo consumo di pesce, un alimento ricco di grassi polinsaturi omega-3, e di riso, nel quale sono presenti carboidrati complessi.

Attualmente gli alimenti funzionali sono definiti: *“un alimento che ha un effetto benefico su una o più funzioni nell'organismo, al di là degli effetti nutritivi, in un modo rilevante per il miglioramento dello stato di salute e benessere e/o per ridurre il rischio di malattia. È consumato come parte di un regime alimentare normale. Non è una pillola, una capsula o qualsiasi forma di integratore alimentare”* (Diplock et al., 1999).

Le proprietà che rendono l'alimento "funzionale" sono dovute a composti:

- naturalmente presenti nell'alimento (**alimenti funzionali naturali**), come lo yogurt (vitamine del gruppo B, calcio, fermenti lattici e probiotici) o la frutta secca (omega-3, vitamina E);
- presenti nell'alimento ma aumentati in quantità (**alimenti funzionali arricchiti**), come lo yogurt con probiotici;
- non presenti naturalmente nell'alimento ma aggiunti (**alimenti funzionali supplementati**), come il latte con vitamine;
- eliminati o modificati per migliorare la biodisponibilità, come l'eliminazione del grasso dal latte.

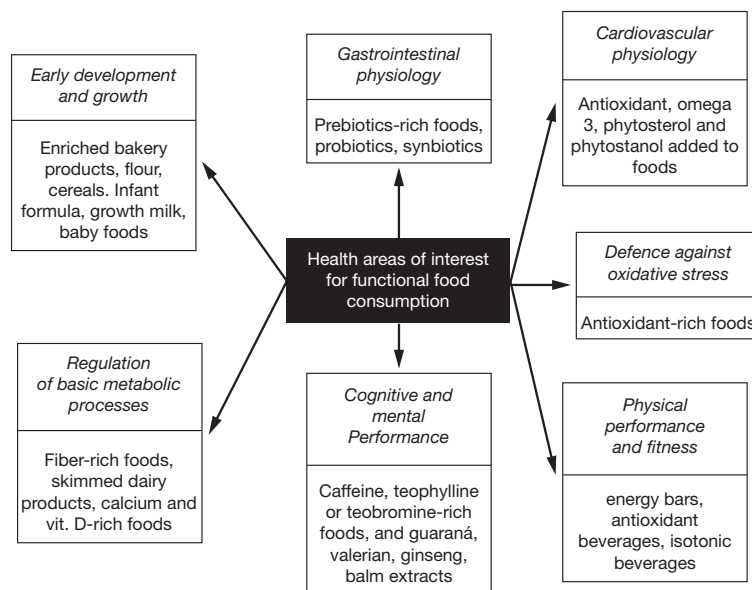
Gli alimenti funzionali sono spesso confusi con i concetti correlati di:

- **nutraceutici**: prodotti ricavati da un alimento ma venduti come pillole, polveri o altre forme di dosaggio non associate al cibo, e che hanno dimostrato proprietà fisiche benefiche o protettive contro le malattie croniche.
- **pharmafoods**: un termine universalmente accettato per designare i prodotti al confine tra cibo e medicina, emerso per la prima volta in Giappone. Sono anche chiamati "cibi di confine", in quanto rivendicano qualità preventive e terapeutiche simili ai farmaci.

Le aree della fisiologia umana interessate dall'azione degli alimenti funzionali sono riassunte nella Figura 3 (Tur e Bibiloni, 2016), e nello specifico l'attenzione è rivolta a:

- **funzioni gastrointestinali**: includono equilibrio della microflora, attività immunitaria, biodisponibilità dei nutrienti, motilità e transito intestinale (probiotici, prebiotici e fibre);

- **sistema cardiovascolare:** il controllo di colesterolemia e trigliceridemia riduce l'incidenza di patologie cardiovascolari (fitosteroli, omega-3, omega-6, vitamine B6, B12 e acido folico);
- **stress ossidativo:** richiede un soddisfacente introito di antiossidanti (polifenoli, carotenoidi, flavonoidi, vitamine A, C, E) per bilanciare l'attività ossidante dei radicali liberi e i sistemi di difesa;
- **metabolismo dei macronutrienti:** ruolo degli omega-3 nella modulazione genica delle vie metaboliche degli acidi grassi saturi;
- **sviluppo neonatale e accrescimento:** ruolo degli acidi grassi omega-3, acido folico e colina nello sviluppo fetale e neonatale.



**Figura 3.** Aree di interesse per il consumo di alimenti funzionali.

È importante notare che il beneficio per la salute non deve necessariamente coinvolgere tutti i membri della popolazione, ma può essere specifico per una determinata categoria.



La domanda nel mercato degli alimenti funzionali sta crescendo rapidamente a causa della maggiore consapevolezza del valore di questi prodotti: si prevede che raggiungerà 255 miliardi di dollari entro il 2024, rappresentando il 5% del mercato alimentare complessivo, e gli alimenti probiotici comprenderebbero dal 60 al 70% del mercato totale degli alimenti funzionali (da Silva et al., 2017).

#### ***1.4 I SUPERFOOD***

Attualmente non esiste una definizione ufficiale di superfood: si tratta di un termine ombrello che comprende quegli alimenti benefici per la salute e/o con proprietà che facilitano la prevenzione di patologie grazie all'elevato valore nutrizionale (alta concentrazione di nutrienti) e biologico, dovuto a un'ampia biodisponibilità e bioattività all'interno dell'organismo per la presenza di una varietà di ingredienti bioattivi (Proestos, 2018; Lunn, 2006).

I superfood includono alimenti naturali o mediamente lavorati in grado di aumentare la vitalità del corpo umano, e possono essere una buona scelta per migliorare la salute generale, rafforzando il sistema immunitario.

Pur essendo simili agli alimenti funzionali nel mostrare numerosi benefici per la salute oltre al solo apporto di nutrienti, differiscono per alcune prospettive. In particolare, possono essere descritti come alimenti funzionali tradizionali e minimamente lavorati, con la loro proprietà distintiva di essere "usati tradizionalmente" (Tacer-Caba, 2019).

I componenti bioattivi più importanti, che hanno dimostrato benefici per il corpo umano, sono: acidi grassi polinsaturi (omega-3, omega-6), vitamine, minerali, microrganismi probiotici, antiossidanti, aminoacidi essenziali, polisaccaridi e vari enzimi.

Nello specifico, i superalimenti più importanti, secondo i dati ottenuti da diversi studi, sono i seguenti:

- frutta: melograno, bacche, mirtilli, lamponi, fragole, bacche di goji, uva, ecc;
- frutta secca: noci, mandorle, cereali;
- legumi: fagioli rossi, cacao, patate dolci, mastice, soia;
- verdure: broccoli, spinaci;
- alghe: spirulina, clorella;
- prodotti lattiero-caseari: kefir, latte d'asina;
- erbe: zenzero, ginkgo biloba, tè;
- prodotti delle api: miele, pappa reale, propoli, cere.

Numerosi dati di ricerca suggeriscono che i superalimenti sono un'ottima opzione per migliorare la salute generale, potenziando il sistema immunitario, aumentando la produzione di serotonina e altri ormoni e promuovendo il buon funzionamento dei sistemi organici del corpo umano, ma solo se vengono inseriti in una dieta equilibrata e consumati con moderazione e prudenza (Proestos, 2018).

Il termine superfood era stato utilizzato anche per descrivere cibi particolarmente attraenti e densi di energia, per esempio i dolciumi: in questo contesto, il termine viene utilizzato come antonimo della definizione che è popolare oggi, e il consumo di questi superalimenti dovrebbe essere limitato (Lunn, 2006).

### **1.5 LE BEVANDE FERMENTATE VEGETALI COME SUPERFOOD**

Nonostante le alternative che utilizzano come sostituto il latte a base vegetale siano destinate ad assomigliare a quello animale in termini di colore e consistenza, spesso non forniscono il pieno valore nutrizionale del latte vaccino e soffrono di *off-flavour* indesiderati. Pertanto, i prodotti commerciali a base vegetale proposti sono tipicamente modificati con additivi come vitamine, aminoacidi e minerali. Tuttavia, le principali aziende alimentari e di bevande si stanno impegnando a rimuovere dai loro prodotti gli additivi, e un'opzione interessante per raggiungere questo obiettivo è la fermentazione.

Fin dall'antichità la fermentazione è stata usata come approccio naturale per produrre cibo migliorandone il valore nutrizionale, l'aroma, il gusto, la consistenza e la stabilità (Tangyu et al., 2019).

In linea generale, gli obiettivi della fermentazione sono:

- complessivo miglioramento dell'apporto nutrizionale in maniera naturale, economica e sostenibile;
- miglioramento della *shelf-life* e aumento della stabilità dovuto alla presenza di acidi organici, che abbassano il pH e rendono l'ambiente ostile allo sviluppo di microrganismi alterativi e/o patogeni. Anche le batteriocine possono contribuire ad aumentare la *shelf-life* e la sicurezza del prodotto;
- potenziamento delle proprietà sensoriali quali l'aroma e il gusto, dovuto alla produzione di acidi organici e composti volatili come l'acetaldeide e il diacetile;
- miglioramento delle proprietà reologiche (consistenza, viscosità e struttura);
- aumento delle caratteristiche funzionali, soprattutto attraverso l'impiego di microrganismi probiotici.

Queste funzioni possono essere attribuite principalmente all'azione dei microrganismi: di fatto, le tipologie di latti fermentati si differenziano soprattutto per la composizione microbica, ma anche per la composizione chimico-fisica, per la matrice di partenza e la tecnologia di trasformazione. Infatti, pur partendo dal medesimo latte, se si impiegano specie microbiche differenti, questo adduce a prodotti con un profilo diverso.

Sulla base dei criteri microbiologici è possibile classificare i latti fermentati in tre ampie categorie (Farris et al., 2012):

1. **latti fermentati acidi**, derivati dall'azione di batteri lattici termofili e/o mesofili (yogurt);
2. **latti fermentati probiotici**, che contengono microrganismi con più spiccati effetti benefici per la salute;
3. **latti fermentati acido-alcolic**, dove sono presenti, oltre ai batteri lattici, i lieviti che realizzano la fermentazione alcolica. Il più noto latte acido-alcologico è il kefir.

Recentemente, le fermentazioni a coltura mista con due o più microrganismi stanno diventando sempre più diffuse e sembrano particolarmente promettenti per la fermentazione alternativa del latte a base vegetale, grazie ai potenziali effetti sinergici all'interno dei consorzi microbici, che aiutano a migliorare la qualità con un solo processo (Tangyu et al., 2019).

I latti fermentati sono stati da sempre associati alla salute e alla longevità, e i loro benefici unanimemente riconosciuti da tutte le culture (Farris et al., 2012). Infatti, gli alimenti fermentati hanno proprietà funzionali uniche, che conferiscono alcuni benefici per la salute dei consumatori grazie alla presenza di microrganismi funzionali, che possiedono proprietà probiotiche, antimicrobiche, antiossidanti, producono peptidi, ecc.

## ***1.6 IL KEFIR***

Il kefir è una bevanda fermentata a base di latte dal gusto fresco, leggermente acido e dalla consistenza cremosa.

Originario della regione del Caucaso, in Asia centrale, attualmente è sempre più popolare nei Paesi europei, in Giappone e negli Stati Uniti, grazie ai suoi apporti nutrizionali e terapeutici. Il nome stesso deriva infatti dalla parola turca “*kef*”, che letteralmente significa "gusto piacevole".

Il kefir è prodotto dalla fermentazione lattica e alcolica operata da una grande varietà di batteri e lieviti che coesistono in associazione simbiotica all'interno dei grani. Per questa ragione è considerato “superiore” allo yogurt, che viene prodotto solo in seguito alla fermentazione lattica; infatti, il kefir si differenzia dagli altri prodotti fermentati lattiero-caseari in quanto non è il risultato dell'attività metabolica di uno o pochi microrganismi, bensì di un consorzio microbico numeroso ed eterogeneo (Arslan, 2015; Proestos, 2018; Gut et al., 2019; Farag et al., 2020).

### ***1.6.1 KEFIR ARTIGIANALE E INDUSTRIALE***

Nella produzione tradizionale del kefir si impiegano come innesto i caratteristici grani o granuli, detti anche “miglio del profeta” (Figura 4).

I grani presentano un aspetto globoso e irregolare, dal diametro variabile tra pochi millimetri e 3.5 centimetri, di colore bianco o giallastro, e assomigliano ai cavolfiori (Arslan, 2015; Gut et al., 2019).

Sono costituiti da una matrice gommosa ed elastica, di natura proteica e polisaccaridica, nella quale restano inglobati i microrganismi che instaurano una forma speciale di simbiosi

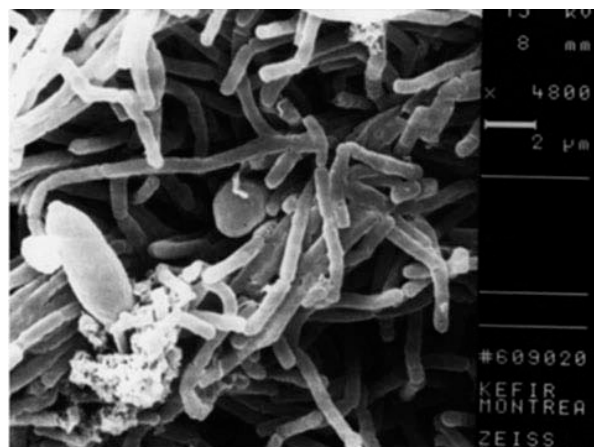
molto stabile (Farris et al., 2012), come mostrato dalla Figura 5. Il polisaccaride più abbondante è il kefirano, che comprende quantità uguali di glucosio e galattosio.

La distribuzione spaziale dei microrganismi non è ancora completamente chiara, tuttavia è stato generalmente riportato che i lieviti si trovano nella sezione interna e intermedia dei grani, mentre i batteri sulle aree superficiali.

Dal punto di vista chimico, i grani di kefir sono composti da 890-900 g/kg di acqua, 60 g/kg di zuccheri, 30 g/kg di proteine, 7 g/kg di ceneri e 2 g/kg di lipidi; i rapporti possono però variare a seconda dell'origine (Gut et al., 2019).



**Figura 4.** Grani usati per la produzione tradizionale del kefir (<https://kefiritalia.it>).



**Figura 5.** Grani di kefir al microscopio elettronico (Arslan, 2015): viene evidenziata l'associazione tra lieviti e batteri.

L'associazione dei microrganismi accosta la fermentazione lattica (batteri) a quella alcolica (lieviti) e promuove diverse interazioni metaboliche quali la produzione di polisaccaridi (batteri lattici), vitamina B<sub>12</sub> e l'ossidazione dell'acido lattico (batteri acetici).

La preparazione dei grani di kefir si realizza, nei Paesi d'origine, aggiungendo al latte fresco contenuto in mastelli di legno, pezzi di stomaco di agnello e montone. Il latte viene continuamente agitato fino alla formazione del coagulo, e successivamente questo viene rimosso e sostituito con altro latte. L'operazione deve essere eseguita più volte, fino a quando nella parete del recipiente si forma una crosta che viene asportata ed essiccata al sole: i frammenti ottenuti costituiscono i grani di kefir. Tradizionalmente i grani vengono tramandati o regalati così come è consueto fare per il lievito madre nel caso della panificazione.

I grani vengono quindi aggiunti al latte e lasciati fermentare per circa 24 ore a una temperatura compresa tra i 20 e i 25°C. Durante questo tempo aumentano di numero e di dimensione e, terminata la fermentazione, possono essere recuperati per filtrazione, lavati e riutilizzati per ulteriori preparazioni; in alternativa possono essere conservati a 4°C fino al nuovo utilizzo.

Le matrici impiegate possono essere differenti, sia latti animali che vegetali, e il risultato finale varia in base a: stabilità dei grani, quantità dell'innesto, latte impiegato (tipo, qualità e trattamenti subiti), temperatura, durata della fermentazione e tipo di tecnologia.

La bevanda che si ottiene è il kefir, dalla consistenza cremosa e omogenea, e va consumato preferibilmente sempre fresco poiché è facilmente contaminabile; inoltre, dopo qualche giorno diventa eccessivamente acido (Farris et al., 2012).

Al contrario del metodo tradizionale, la produzione industriale viene oggi realizzata impiegando colture starter con l'obiettivo di raggiungere risultati costanti, prevedibili, riproducibili e sicuri.

Consiste nell'inoculo nella matrice di colture pure di poche specie precedentemente isolate dai grani ma anche da altre fonti, come ad esempio possono essere i formaggi o ceppi commerciali.

La quantità di inoculo varia in funzione della carica cellulare, e soprattutto in base alla loro abilità metabolica di fermentazione. Inoltre, il ceppo deve essere inizialmente testato in prove pilota in laboratorio, per poi passare alla scala produttiva a livello industriale.

La scelta dei microrganismi impiegati per la fermentazione può ricadere sull'uso di ceppi probiotici, così da potenziare l'effetto benefico del prodotto. In questo caso, alla selezione preliminare sulla base dei caratteri probiotici deve seguire un processo di selezione tecnologica, atto a verificare la possibilità di produrre il ceppo in una forma compatibile con le esigenze di distribuzione commerciale.

La valutazione dei caratteri tecnologici consiste nella verifica:

- della **stabilità genetica**, che viene controllata per assicurare la continuità nel tempo delle caratteristiche per cui si è selezionato il ceppo;
- della **producibilità su scala industriale**, raggiungendo concentrazioni di cellule elevate a costi contenuti;
- della **compatibilità con altri ingredienti/componenti/eccipienti** del prodotto finale;
- della **shelf-life dell'ingrediente attivo**, che nel caso dei prodotti lattiero-caseari consiste nella capacità di sopravvivenza in un ambiente generalmente acido e mediamente ossigenato;



- della *shelf-life* del prodotto finito, evitando fermentazioni secondarie post-produzione, che portano alla formazione di sapori e/o aromi sgradevoli, nonché di acidificazione del prodotto finito.

In aggiunta altre caratteristiche importanti sono (Farris et al., 2012):

- grado di termofilia;
- capacità e velocità di acidificazione, che deve essere veloce e intensa;
- produzione di composti organoletticamente attivi;
- produzione di esopolisaccaridi, importanti per struttura e viscosità;
- produzione di metaboliti funzionali;
- produzione di metaboliti batteriocine-simili;
- resistenza all'autolisi;
- resistenza ai batteriofagi.

### 1.6.2 COMPOSIZIONE MICROBIOLOGICA DEI GRANI DI KEFIR

I grani di kefir rappresentano un quadro microbico molto complesso e le ricerche finora condotte hanno evidenziato una certa eterogeneità. Queste colture rispecchiano le caratteristiche ambientali delle zone dove vengono prodotte, dunque sono tipiche e difficilmente riproducibili in un altro luogo.

Le specie batteriche più rappresentate sono: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus parakefir*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroide*, *Streptococcus thermophilus*, *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus*.

Mentre tra i lieviti si riscontrano maggiormente *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus e lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida tenuis*, *Candida kefir*, *Torulasporea delbrueckii* e *Pichia fermentas*.

I lieviti del kefir, nonostante siano meno studiati rispetto ai batteri, giocano un ruolo chiave poiché forniscono nutrienti essenziali per la crescita come aminoacidi e vitamine, alterano il pH, secernono etanolo, producono CO<sub>2</sub>, creano un ambiente favorevole alla crescita dei batteri e producono metaboliti che influenzano il profilo organolettico (Arslan, 2015; Farris et al., 2012).

### *1.6.3 POTENZIALITÀ NUTRIZIONALI E BENEFICHE DEL KEFIR*

Il kefir conserva tutte le proprietà nutritive e il valore energetico del latte da cui deriva, ma per effetto dello sviluppo microbico presenta alcune caratteristiche estremamente utili per il benessere del consumatore.

Il contributo del kefir al miglioramento della salute umana dipende dal fatto che questo mostra livelli più alti di assimilazione da parte del corpo rispetto allo yogurt, poiché fornisce batteri benefici, lieviti, vitamine, minerali e proteine ad alto valore biologico (Proestos, 2018).

Dai dati delle ricerche esistenti, le proprietà benefiche del kefir per la salute umana sono (Farag et al., 2020; Zhu et al., 2020):

- **produzione di composti bioattivi.** Alcuni studi hanno dimostrato che durante la fermentazione le proteasi microbiche degli starter promuovono la degradazione delle proteine e rilasciano peptidi bioattivi. Dunque, la fermentazione può migliorare le concentrazioni dei componenti bioattivi, come per esempio aminoacidi liberi e peptidi di piccole dimensioni. Al tempo stesso, i probiotici utilizzano i grassi e i

carboidrati del latte di soia per accrescersi, portando a dei cambiamenti nel rapporto nutrizionale originale. Come è noto, il latte di soia contiene zuccheri quali raffiniosio e stachiosio, che non vengono digeriti dall'uomo ma il tasso di assunzione da parte dei microrganismi, soprattutto del raffiniosio da parte dei lattobacilli, è alto e lo zucchero viene completamente metabolizzato;

- **miglioramento del sapore.** Si è notato che i lattobacilli possono idrolizzare le proteine in peptidi a catena corta e poi in aminoacidi, migliorando il tasso di assorbimento delle proteine della soia e migliorando le qualità sensoriali. In aggiunta la lipossigenasi della soia può ossidare gli acidi grassi insaturi in alcoli, aldeidi, chetoni, furani e altri composti. Tra i molti composti odorosi, gli alcoli e le aldeidi sono importanti composti volatili *off-flavor*, influenzati dal contenuto proteico, dall'attività della lipossigenasi e dal contenuto di acido linoleico della soia. Dalle evidenze sperimentali si è visto che la fermentazione può effettivamente migliorare il sapore attraverso la degradazione delle sostanze aromatiche indesiderate;
- **maggiore biodisponibilità degli isoflavoni.** La soia contiene un gran numero di isoflavoni, che esercitano effetti positivi contro una varietà di malattie, specialmente il cancro, l'osteoporosi e le malattie cardiovascolari. La maggior parte degli isoflavoni della soia sono presenti nella forma di glicosidi, meno bioattivi delle loro controparti aglicone. I lattobacilli impiegano la  $\beta$ -glucosidasi per la scissione del legame  $\beta$ -1,6-glicosidico, rilasciando così gli agliconi durante la fermentazione, più facili da assorbire grazie alla maggiore biodisponibilità;
- **aumento delle vitamine del gruppo B.** Il latte di soia è carente di alcune vitamine essenziali, specialmente quelle del gruppo B, come la riboflavina (B<sub>2</sub>), la piridossina (B<sub>6</sub>), l'acido folico (B<sub>9</sub>), la cobalamina (B<sub>12</sub>) e, soprattutto, le concentrazioni vengono

- ulteriormente ridotte durante la lavorazione degli alimenti. Nei prodotti commerciali possono essere aggiunte come additivi, in alternativa possono essere fornite endogenamente dai lattobacilli attraverso la fermentazione;
- **effetto ipocolesterolemizzante.** Diversi studi sia sui topi che sull'uomo hanno mostrato l'associazione tra l'assunzione del kefir e la riduzione del colesterolo totale, colesterolo LDL, trigliceridi e triacilglicerolo, sia nel sangue che nel fegato; questi sono correlati all'insorgenza di malattie cardiovascolari. L'effetto di ipocolesterolemia del kefir sembra essere mediato dall'up-regolazione dei geni coinvolti nell'ossidazione degli acidi grassi, e questa funzione viene attribuita non ai microorganismi bensì ai loro metaboliti;
  - **azione antiobesità.** Il tasso di obesità è in continuo aumento, e recentemente diversi studi hanno sostenuto la regolazione positiva del metabolismo lipidico (e quindi la riduzione dell'insorgenza di obesità da parte dei probiotici) dopo la somministrazione di latte di soia fermentato in modelli *in vivo*;
  - **azione antidiabetica.** Il kefir ha mostrato effetti promettenti nell'alleviare l'obesità e quindi le disfunzioni metaboliche associate: infatti, l'alimentazione di ratti diabetici con kefir di capra e di soia ha dimostrato un'azione antidiabetica, dunque una diminuzione del livello di glucosio nel plasma in concomitanza con un aumento dell'attività della glutazione perossidasi (GPx), e un migliore rilascio di insulina;
  - **azione antiossidante e antinfiammatoria;**
  - **attività antimicrobica.** Si è visto che il kefir ha un'azione antimicrobica contro diversi patogeni batterici e fungini, tra cui: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*;

- **attività anticancerogenica.** Il cancro è uno dei principali problemi di salute in tutto il mondo, e le richieste di alimenti funzionali o supplementi nutrizionali che possano fornire benefici per il trattamento della patologia sono in aumento. Diversi studi hanno suggerito le potenziali proprietà antitumorali del kefir contro il cancro al seno, il cancro colon rettale e i linfociti T maligni.

Il meccanismo di inibizione delle cellule tumorali sembra essere collegato all'arresto del ciclo cellulare e all'induzione dell'apoptosi. I notevoli effetti positivi del kefir sulle linee cellulari tumorali incoraggiano il suo consumo come dieta funzionale nella prevenzione del cancro, tuttavia le analisi sono per lo più basate su saggi con colture cellulari e sono quindi necessari maggiori studi clinici.

- **azione sul tratto gastro-intestinale e modulazione del microbiota intestinale,** grazie alla presenza dei microrganismi probiotici.

In sintesi, molti studi hanno dimostrato il potenziale nutrizionale e benefico del kefir, che risulta quindi essere un superalimento sano ed equilibrato che contribuisce al mantenimento della buona salute del corpo; sono comunque necessari ulteriori studi sugli effetti a lungo termine nei modelli umani.

#### *1.6.4 PRODOTTI COMMERCIALI A BASE DI KEFIR DI SOIA*

Tenendo presente che il kefir è una bevanda ad alta attività probiotica e ricca di proprietà benefiche per la salute dell'uomo, sempre più aziende hanno iniziato a produrlo a livello industriale, per ampliare la propria gamma di prodotti.

Attualmente la maggior parte dei prodotti proposti nel mercato sono a base di latte vaccino, ma si possono trovare delle alternative con tipologie differenti di latte, come quello di capra. Alcuni kefir proposti sul mercato italiano sono delle aziende: Milk<sup>®</sup>, Nestlé<sup>®</sup>, Granarolo<sup>®</sup>, Podere Cittadella<sup>®</sup>, Almaverde Bio<sup>®</sup>, Bella Vita<sup>®</sup>, Kunín<sup>®</sup>, Bio Bruni<sup>®</sup> (kefir con latte di capra).

Generalmente oltre al kefir naturale bianco, queste aziende propongono opzioni con l'aggiunta di frutta, che ne rendono più gradevole l'aroma (<https://ilfattoalimentare.it/kefir-segreti-spisni.html>).

D'altra parte, nonostante le grandi potenzialità delle bevande vegetali, in Italia non sembrano essere presenti in commercio kefir di soia, e in generale kefir vegetali.

Sono presenti, seppur molto pochi, alcuni prodotti esteri:

- Sojade: Kefir di soia al naturale (Francia);
- Ferments Soy Milk Kefir (Nepal);
- Lifeway: Non-Dairy Kefir;
- Amphore: Cocomilk Kefir (Australia);
- Home Riviera: Free Coconut Milk Kefir (Canada).

## CAPITOLO 2

### SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del presente studio è quello di produrre, su scala di laboratorio, un kefir di soia ispirandosi al metodo industriale, impiegando cinque ceppi di lievito “non convenzionali” di tipo non-*Saccharomyces* che mimi un microbiota in co-coltura con il battere commerciale *Lactobacillus casei Shirota*, per ottenere un *superfood*, ovvero una bevanda innovativa dal profilo nutrizionale unico e ricco di proprietà benefiche per la salute del consumatore.

In prima istanza è stato testato il potenziale probiotico dei singoli lieviti e la loro coesistenza. Nella seconda parte del lavoro si è allestita la fermentazione con il pool di lieviti (sia in coltura singola che in coltura mista) in co-coltura con il battere. Al termine della fermentazione e durante la *shelf-life* è stata analizzata la cinetica microbica, così come le caratteristiche fisico-chimiche e organolettiche, al fine di ottenere un prodotto benefico e al tempo stesso accettabile in termini di gusto.

Per ultimo si sono allestite delle prove con tempi di fermentazione differenti, allo scopo di valutare l’influenza del tempo di fermentazione sull’andamento della cinetica microbica e sulla produzione di acidi grassi polinsaturi.

La scelta di questo studio deriva dalla sempre più chiara e affermata consapevolezza che il ruolo della nutrizione non comprende unicamente l’adeguatezza dell’alimentazione di base e la prevenzione di patologie da carenza, ma anche la promozione del benessere, della salute umana e la riduzione del rischio di insorgenza di altre patologie.

Questa evoluzione del concetto classico di nutrizione ha come diretta conseguenza il crescente interesse verso gli alimenti funzionali di cui il kefir è un ottimo rappresentante.

Nella produzione tradizionale vengono utilizzati come starter i grani di kefir, ma questo comporta un alto rischio di contaminazione e una ridotta riproducibilità dovuta alla differente composizione dei grani. In questa ottica si è deciso di seguire una produzione in scala di laboratorio per applicarla poi su scala industriale, che prevede l'inoculo di colture pure al fine di ottenere un prodotto con proprietà benefiche e un profilo organolettico desiderato che sia riproducibile.

Per molto tempo l'attenzione dei ricercatori si è focalizzata sull'impiego soprattutto di batteri come microrganismi probiotici: per questa ragione nel presente lavoro di tesi si è voluto approfondire il ruolo dei lieviti come possibili microrganismi probiotici da utilizzare come starter per la produzione di kefir (sia in coltura singola ma soprattutto in coltura mista), così che i loro effetti benefici siano sinergici per migliorare il processo di fermentazione e la qualità del prodotto finale. Rispetto ai batteri, infatti, i lieviti sono microrganismi più facili da gestire sia in laboratorio che su scala industriale, e il loro utilizzo è meno costoso. In aggiunta, i lieviti impiegati sono stati isolati da caseifici del territorio marchigiano, che non impiegano starter commerciali per la produzione dei formaggi.

La scelta di una bevanda di soia al posto del latte vaccino come matrice deriva dall'aumento, in tempi recenti, di consumatori vegetariani e vegani, così come dall'incremento delle allergie e intolleranze alimentari, specialmente nei confronti del latte vaccino, del quale la bevanda a base di soia è un valido sostituto. In aggiunta la soia presenta un elevato contenuto di proteine di alta qualità, isoflavoni e fibre alimentari: evidenze sperimentali mostrano come i processi di fermentazione portino a un miglioramento del profilo organolettico e a un aumento dei peptidi bioattivi, le cui proprietà benefiche si sommano a quelle del kefir.



## CAPITOLO 3

### MATERIALI E METODI

#### 3.1 CEPPI DI LIEVITO E BATTERI IMPIEGATI

In questo studio sono stati impiegati cinque ceppi di lievito non-*Saccharomyces* e un ceppo di battere lattico; questi sono elencati nella Tabella 5.

I ceppi di lievito appartenenti alle specie *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii* e *Kluyveromyces lactis* sono stati scelti per le loro attitudini probiotiche (Agarbati et al., 2020) e appartengono alla collezione del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DiSVA) dell'Università Politecnica delle Marche. Tali ceppi sono stati campionati da formaggi e ambienti di lavorazione degli stessi, di caseifici localizzati nella zona di Visso, fortemente colpita dal sisma del 2016, e nei quali non vengono utilizzati ceppi starter commerciali per la fermentazione dei prodotti caseari. Si tratta pertanto di lieviti a selezione spontanea.

Un altro ceppo di lievito utilizzato, appartenente alla specie *Metschnikowia pulcherrima*, è stato isolato dal vinsanto e selezionato per la sua capacità di produrre acidi grassi polinsaturi (Canonico et al., 2016).

I ceppi di lievito sono stati mantenuti crioconservati per lungo termine a -80°C nel terreno YPD broth (1% estratto di lievito; 2% peptone; 2% D-glucosio) contenente una soluzione di glicerolo (80%). Prima dell'uso sperimentale, i ceppi sono stati coltivati su terreno YPD agar (1% estratto di lievito; 2% peptone; 2% D-glucosio; 1.8% agar) e conservati per breve termine alla temperatura di 4°C.

Il battere, *Lactobacillus casei Shirota*, è stato isolato da Yakult, una bevanda fermentata a base di latte contenente circa 20 miliardi di *L. casei Shirota*, che favoriscono l'equilibrio della flora intestinale (<https://yakult.it>). Tale ceppo è stato crioconservato a -80°C usando il terreno di coltura MRS broth (LIOFILCHEM® S.r.l., Teramo, Italia) addizionato con una soluzione di glicerolo (80%). Prima dell'uso sperimentale, il battere è stato coltivato su terreno MRS agar (LIOFILCHEM® S.r.l., Teramo, Italia) e stoccato a 4°C fino al momento dell'utilizzo.

CEPPO	CODICE
<i>Candida zeylanoides</i> biotipo III	13
<i>Debaryomyces hansenii</i> biotipo III	36
<i>Debaryomyces hansenii</i> biotipo XVI	78
<i>Kluyveromyces lactis</i>	80
<i>Metschnikowia</i> spp.	Mp50
<i>Lactobacillus casei Shirota</i>	SH

**Tabella 5.** Ceppi di lievito e battere impiegati nel presente studio.

### **3.2 DETERMINAZIONE DEL POTENZIALE PROBIOTICO DEI LIEVITI**

Il lievito *Metschnikowia spp.* (Mp50) è stato analizzato come eventuale potenziale probiotico: è stata valutata la capacità di crescere alla temperatura corporea (37°C) e di sopravvivere a condizioni simili a quelle del tratto gastrointestinale (pH acido e presenza di sali biliari); in aggiunta sono state analizzate l'attività antiossidante e l'azione antimicrobica contro alcuni comuni batteri patogeni umani (*Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*), seguendo quanto descritto da Agarbati et al., 2020.

#### **3.2.1 CAPACITÀ DEL LIEVITO DI CRESCERE A 37°C**

Il lievito Mp50 è stato pre-coltivato in terreno YPD broth per 24 ore a 25°C in agitazione, così da aumentare l'ossigenazione e pertanto favorire la crescita microbica. Al termine delle 24 ore si è misurata la densità ottica (OD) a 600nm per conoscerne la concentrazione cellulare. Tale pre-coltura è stata utilizzata per allestire la prova di crescita a 37°C, inoculando il lievito ad una concentrazione finale di 10<sup>6</sup> cellule/ml (corrispondente ad una OD di circa 0.1) in 10ml di YPD broth, utilizzando la relazione:

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

$$\text{con } C_f = 0.1 \text{ cell/ml}$$

La coltura è stata incubata a 37°C per 48 ore, dopodiché è stato monitorato l'eventuale aumento di OD a 600nm, indice di crescita microbica. Come ceppo di controllo si è utilizzato il probiotico commerciale *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (CODEX, Zambon Italia S.r.l., Bresso, Italia).

### 3.2.2 CAPACITÀ DI SOPRAVVIVERE A CONDIZIONI SIMILI A QUELLE DEL TRATTO GASTROINTESTINALE

Analogamente alla prova precedente, Mp50 è stato pre-coltivato su YPD broth. La pre-coltura è stata utilizzata per allestire la prova in terreno Yeast Nitrogen Base (YNB, Biolife, Milano, Italia) con l'aggiunta dello 0,3% (w/v) di sali biliari (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) e acidificato con HCl 2 N per raggiungere un pH di 2.5. Il ceppo Mp50 è stato inoculato ad una concentrazione di circa  $10^6$  cellule/ml, come descritto precedentemente. Come controllo si è utilizzato YNB privo di sali biliari e non acidificato. La prova è stata effettuata in duplicato e incubata a 37°C per 48 ore e 120 ore, al termine delle quali sono stati monitorati eventuali cambiamenti nella densità ottica a 600nm. Per stimare la vitalità si è utilizzata la camera di conta Thoma-Zeiss sfruttando la colorazione con blu di metilene: le cellule vive rimangono incolori, mentre quelle morte appaiono blu/azzurro. Come ceppo di controllo positivo è stato utilizzato il probiotico commerciale *S. cerevisiae* var. *boulardii* (CODEX, Zambon Italia S.r.l., Bresso, Italia).

### 3.2.3 ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE

Il lievito Mp50 è stato testato anche per la sua capacità di ridurre il radicale DPPH (1,1-Difenil-2-Picrylhydrazyl), seguendo il metodo descritto da Chen et al., 2010.

Mp50 è stato pre-coltivato come descritto in precedenza e *S. cerevisiae* var. *boulardii* è stato usato come ceppo di controllo positivo. In breve, 800 µl di campione e 1 ml di soluzione DPPH (0.2 mM in metanolo) sono stati addizionati in una eppendorf e lasciati a temperatura ambiente per 30 minuti. I campioni hanno subito una centrifugazione a 2000 rpm per 2 minuti e la percentuale di riduzione del DPPH è stata monitorata misurando la diminuzione

dell'assorbanza a 517nm del surnatante. La prova è stata condotta in duplicato e il bianco preparato utilizzando acqua deionizzata al posto del campione.

La capacità di *scavenging* di ogni ceppo si è calcolata come segue:

$$\% \text{ riduzione DPPH} = [1 - A_{517(\text{campione})}/A_{517(\text{bianco})}] \times 100$$

#### 3.2.4 AZIONE ANTIMICROBICA

Si è scelto di valutare l'attività antimicrobica con la tecnica dell'agar a doppio strato e come ceppi sensibili sono state utilizzate cinque specie microbiche potenzialmente patogene per l'uomo: *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*.

I batteri sono cresciuti su Plate Count Broth (triptone 5.0 g/l; estratto di lievito 2.5 g/l; glucosio 1.0 g/l) a 30°C per 24 ore, mentre *C. albicans* è cresciuto su YPD broth alle stesse condizioni. Il potenziale probiotico è stato pre-coltivato su YPD broth per 24 ore a 25°C, successivamente 100 µl della pre-coltura (7 log CFU/ml) sono stati distribuiti sulla superficie di YPD agar e incubati a 30°C per 24 ore. Sulla superficie del YPD agar si è poi distribuito un secondo strato morbido di nutrient agar (estratto di manzo 3 g/l; peptone 5 g/l; agar 15 g/l), i ceppi patogeni sono stati strisciati sulla superficie dello strato morbido e incubati a 37°C per 24 ore. Il probiotico *S. cerevisiae* var. *boulardii* è stato usato come ceppo di controllo positivo mentre come controlli negativi si sono preparate piastre senza potenziali probiotici. L'attività antimicrobica del lievito testato è stata valutata con la presenza di un'area di inibizione della crescita del patogeno.

### ***3.3 PRODUZIONE DEL KEFIR DI SOIA: ALLESTIMENTO DELLA FERMENTAZIONE***

Il kefir è stato prodotto utilizzando come matrice la bevanda di soia Alpro® “original” 100% vegetale, in condizioni sterili per escludere l'interferenza da parte di microrganismi contaminanti. Prima dell'allestimento della fermentazione si sono effettuate due prove preliminari al fine di verificare la capacità di coesistenza ed interazione tra le varie specie di lievito utilizzate, che saranno co-inoculate in fermentazione mista determinando un pool di lieviti.

#### ***3.3.1 PROVE PRELIMINARI DI COESISTENZA DEI LIEVITI***

La prova è stata allestita su falcon contenenti 40ml di YPD broth (1% estratto di lievito; 2% peptone; 2% D-glucosio), in doppio, dove sono stati inoculati contemporaneamente tutti i ceppi di lievito descritti nel paragrafo 3.1. Essendo il YPD un terreno complesso ricco in nutrienti, ideale per la crescita dei lieviti, l'obiettivo era quello di comprovare la coesistenza del pool di lieviti.

Il giorno antecedente all'allestimento della prova preliminare, si sono preparate le pre-culture dei cinque lieviti in YPD broth e incubate per 24 ore a 25°C. Le pre-culture sono state utilizzate per l'allestimento della prova in YPD broth e tutti i lieviti sono stati inoculati ad una concentrazione finale definita, come riportato nella Tabella 6.

La prova è stata incubata per 24 ore a 25°C e successivamente stoccata a 4°C per cinque giorni. La cinetica di crescita dei lieviti è stata monitorata al tempo zero, al termine del periodo di fermentazione e dopo 1, 2 e 5 giorni di stoccaggio a 4°C. Il monitoraggio è stato fatto attraverso conte vitali su piastra, utilizzando i terreni YPD agar e WL Nutrient Agar

(LIOFILCHEM® S.r.l., Teramo, Italia). Quest'ultimo è un terreno differenziale che facilita il riconoscimento delle diverse specie di lievito impiegate.

PROVA PRELIMINARE		
TEST COESISTENZA POOL DI LIEVITI SU YPD broth (40ml; in doppio)		
25°C x 24 ore --> 4°C x 5 giorni		
LIEVITI	CODICE	CONCENTRAZIONE DI INOCULO
<i>C. zeylanoides</i> biotipo III	13	5 x 10 <sup>2</sup> cell/ml
<i>D. hansenii</i> biotipo III	36	5 x 10 <sup>3</sup> cell/ml
<i>D. hansenii</i> biotipo XVI	78	5 x 10 <sup>3</sup> cell/ml
<i>K. lactis</i>	80	10 <sup>3</sup> cell/ml
<i>Metschnikowia</i> spp.	Mp50	10 <sup>3</sup> cell/ml

**Tabella 6.** Prova preliminare su YPD broth.

Una volta comprovata la coesistenza del pool di lieviti, è stata allestita una nuova prova preliminare di fermentazione in falcon contenenti 40 ml di latte di soia Alpro®, in doppio. L'obiettivo era quello di valutare la crescita e l'interazione di questi nella stessa matrice vegetale su cui poi è stata allestita la definitiva prova di fermentazione.

Si è eseguito lo stesso protocollo precedente e anche l'inoculo dei lieviti si è mantenuto alle stesse concentrazioni, come riassunto in Tabella 7.

I campioni sono stati incubati a 25°C per 24 ore e successivamente stoccati per una settimana a 4°C.

Con lo scopo di verificare la crescita microbica, sono state effettuate conte vitali utilizzando terreno YPD agar e WL Nutrient Agar al momento dell'inoculo, alle 24 ore e al termine dello stoccaggio (una settimana). In aggiunta si è monitorato il pH al momento dell'inoculo, dopo 24 ore e dopo una settimana.

PROVA PRELIMINARE		
TEST POOL DI LIEVITI SU BEVADA DI SOIA (40ml; in doppio)		
25°C x 24 ore --> 4°C x 1 settimana		
LIEVITI	CODICE	CONCENTRAZIONE DI INOCULO
<i>C. zeylanoides</i> biotipo III	13	5 x 10 <sup>2</sup> cell/ml
<i>D. hansenii</i> biotipo III	36	5 x 10 <sup>3</sup> cell/ml
<i>D. hansenii</i> biotipo XVI	78	5 x 10 <sup>3</sup> cell/ml
<i>K. lactis</i>	80	10 <sup>3</sup> cell/ml
<i>Metschnikowia</i> spp.	Mp50	10 <sup>3</sup> cell/ml

**Tabella 7.** Prova preliminare su latte di soia.

### 3.3.2 ALLESTIMENTO DELLA FERMENTAZIONE

Al termine delle due prove preliminari è comprovata la coesistenza e l'interazione positiva tra il pool di lieviti utilizzato, si è allestita la prova di fermentazione in barattolini di vetro contenenti 150ml di bevanda di soia Alpro® (Figura 6).

Sono state allestite pre-culture di *L. casei* Shirota in beute contenenti 150ml di MRS broth e incubate a 37°C per 48 ore; mentre le pre-culture di ciascun lievito (*C. zeylanoides* 13, *D. hansenii* 36 e 78, *Metschnikowia* spp. 50 e *K. lactis* 80) sono state allestite in sterilin contenenti 10ml di YPD broth e incubate per 24 ore a 25°C. Le cellule sono state poi raccolte per centrifugazione (lieviti: 40 rpm per 5 minuti; batteri: 40 rpm per 20 minuti), lavate con acqua deionizzata sterile per rimuovere i residui di terreno esausto, nuovamente centrifugate e sospese in acqua deionizzata sterile. Si è proceduto quindi al calcolo del volume di inoculo utilizzando una camera di conta Thoma-Zeiss; le concentrazioni di inoculo sono riassunte nella Tabella 8.





**Figura 6.** Allestimento della fermentazione: kefir di soia.

KEFIR DI SOIA		
25°C x 24 ore --> stoccaggio 4°C x 4 settimane		
MICROORGANISMO	CODICE	CONCENTRAZIONE DI INOCULO
<i>C. zeylanoides</i> biotipo III	13	5 x 10 <sup>2</sup> cell/ml
<i>D. hansenii</i> biotipo III	36	5 x 10 <sup>3</sup> cell/ml
<i>D. hansenii</i> biotipo XVI	78	5 x 10 <sup>3</sup> cell/ml
<i>K. lactis</i>	80	10 <sup>3</sup> cell/ml
<i>Metschnikowia</i> spp.	Mp50	10 <sup>3</sup> cell/ml
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	SH	10 <sup>8</sup> cell/ml

**Tabella 8.** Inoculi battere e lieviti nel kefir di soia.

Si sono allestite quattro prove di fermentazione, ciascuna in quadruplicato (Tabella 9), di cui:

- una prova nella quale è stato inoculato solo il battere *L. casei Shirota* come controllo positivo;

- una prova contenente il battere ed il lievito *D. hansenii* biotipo III (36), poiché da prove preliminari di fermentazione ha conferito interessanti proprietà organolettiche al prodotto finale;
- una prova di fermentazione con il battere e *Metschnikowia* spp. (Mp50) per confrontare la cinetica di fermentazione e la capacità di produrre acidi grassi polinsaturi tra la fermentazione in coltura pura e la fermentazione mista con le altre specie di lievito;
- una prova con il battere e il pool di lieviti.

KEFIR DI SOIA	
25°C x 24 ore --> stoccaggio 4°C x 4 settimane	
CAMPIONE	CODICE
<i>Latte di soia + L. casei Shirota (controllo)</i>	C+
<i>Latte di soia + L. casei Shirota + D. hansenii biotipo III</i>	SH + 36
<i>Latte di soia + L. casei Shirota + Metschnikowia spp.</i>	SH + Mp50
<i>Latte di soia + L. casei Shirota + Pool di lieviti (C. zeylanoides biotipo III + D. hansenii biotipo III + D. hansenii biotipo XVI + K. lactis + Metschnikowia spp.)</i>	SH + POOL

**Tabella 9.** Schema di allestimento della prova di fermentazione di kefir di soia.

I campioni sono stati mantenuti a 25°C per 24 ore per il processo fermentativo e successivamente sono stati stoccati per quattro settimane a 4°C per simulare la *shelf-life* del prodotto.

La Tabella 10 riporta il protocollo seguito per l'allestimento della fermentazione e le rispettive analisi effettuate.

PROTOCOLLO PRODUZIONE KEFIR DI SOIA		
<b>GIORNO 1</b>	Pre-coltura <i>L. casei Shirota</i> su MRS broth	37°C x 48ore
<b>GIORNO 2</b>	Pre-culture lieviti su YPD broth	25°C x 24ore
<b>GIORNO 3</b>	<b>ALLESTIMENTO PROVA</b> CONTE T <sub>0</sub> e pH T <sub>0</sub>	25°C x 24ore
<b>GIORNO 4</b>	<b>MONITORAGGIO CRESCITA MICROBICA:</b> conte vitali a T <sub>24ore</sub>	Stoccaggio 4°C x 4 settimane
	<b>ANALISI CHIMICHE T<sub>24ore</sub></b> 1. pH 2. Acido Lattico 3. Acido Acetico 4. Attività Antiossidante 5. Zuccheri Riducenti 6. Polifenoli	
	<b>DETERMINAZIONE PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE T<sub>24ore</sub></b>	
	<b>ANALISI SENSORIALE T<sub>24ore</sub></b>	
<b>DOPO 2 SETTIMANE (T<sub>2settimane</sub>)</b>	<b>MONITORAGGIO CRESCITA MICROBICA:</b> conte vitali a T <sub>2settimane</sub>	
	<b>ANALISI CHIMICHE T<sub>2settimane</sub></b> 1. pH 2. Acido Lattico 3. Acido Acetico 4. Attività Antiossidante 5. Zuccheri Riducenti 6. Polifenoli	
	<b>DETERMINAZIONE PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE T<sub>2settimane</sub></b>	
	<b>ANALISI SENSORIALE T<sub>2settimane</sub></b>	
<b>DOPO ULTERIORI DUE SETTIMANE (T<sub>4settimane</sub>)</b>	<b>MONITORAGGIO CRESCITA</b> CONTE T <sub>2settimane</sub> e pH T <sub>2settimane</sub>	
	<b>ANALISI CHIMICHE T<sub>4settimane</sub></b> 1. pH 2. Acido Lattico 3. Acido Acetico 4. Attività Antiossidante 5. Zuccheri Riducenti 6. Polifenoli 7. Acidi Grassi Polinsaturi	
	<b>DETERMINAZIONE PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE T<sub>4settimane</sub></b>	
	<b>ANALISI SENSORIALE T<sub>4settimane</sub></b>	

**Tabella 10.** Protocollo produzione kefir di soia.

### 3.3.3 SECONDA PROVA DI FERMENTAZIONE: RIMODULAZIONE DEL TEMPO DI FERMENTAZIONE

Dopo aver esaminato i risultati ottenuti nella prova precedente, si è deciso di allestire una nuova prova di fermentazione seguendo pressoché il protocollo della fermentazione precedente ma con alcune variazioni:

- sono state allestite, in quadruplicato, prove di fermentazione inoculando solo il battere *L. casei Shirota*, come controllo positivo, e prove inoculando il battere e il pool di lieviti; le concentrazioni dei microrganismi sono state mantenute come nella prova descritta al paragrafo 3.3.3.
- Le prove sono state suddivise in due set con tempi di fermentazione differenti: 24 ore (come nell'analisi precedente) e 120 ore sempre a 25°C; Il prolungamento del tempo di fermentazione è stato effettuato per permettere una maggiore produzione e accumulo la parte dei lieviti di acidi grassi polinsaturi, soprattutto da parte del lievito *Metschnikowia* spp.
- Con il fine di consolidare i dati ottenuti nella prova descritta al paragrafo 3.3.3., sono state effettuate analisi della cinetica microbica e analisi chimiche (ad eccezione dell'acido acetico che non è stato determinato) per il set di prove lasciate fermentare per 24 ore; le analisi sono state condotte a fine fermentazione e al termine delle quattro settimane di stoccaggio. Le stesse analisi sono state effettuate anche per le prove lasciate fermentare 120 ore. Inoltre, al termine delle quattro settimane di stoccaggio, tutte le prove sono state sottoposte ad analisi dei principali sottoprodotti di fermentazione mediante gascromatografia e degustazione, con lo scopo di

evidenziare le principali differenze dal punto di vista aromatico/organolettico dovute a tempi di fermentazione differenti.



**Figura 7.** Allestimento della prova: kefir di soia con differenti tempi di fermentazione.

### ***3.4 ANALISI MICROBIOLOGICHE***

Il numero di cellule vitali del battere e dei lieviti presenti nel latte è stato monitorato a diversi tempi ed espresso come logaritmo del numero di unità formanti colonie (UFC) per ml.

I campioni di kefir sono stati prelevati sterilmente e sottoposti a diluizioni seriali in base 10, per poi essere piastrati su differenti terreni di crescita.

Per il monitoraggio dei batteri è stato utilizzato MRS agar (LIOFILCHEM® S.r.l., Teramo, Italia), si tratta di un terreno selettivo indicato per l'isolamento dei lattobacilli e la cui composizione è riportata nella Tabella 11. Nello specifico, la digestione enzimatica della caseina e l'estratto di carne forniscono aminoacidi, azoto, carbonio, vitamine e minerali per

la crescita dei microrganismi. L'estratto di lievito è una fonte di vitamine, in particolare del gruppo B, mentre il citrato di ammonio e l'acetato di sodio sono gli agenti selettivi efficaci contro gli streptococchi e le muffe. Il pH basso è inibitorio per la maggior parte dei microrganismi diversi dai lattobacilli; i solfati di magnesio e manganese sono fonti di ioni e solfato che agiscono come stimolanti della crescita.

Il fosfato dipotassico è il tampone, il glucosio è il carboidrato fermentabile, infine l'agar è l'agente solidificante ([http://www.liofilchem.net/login/pd/ts/620024\\_TS.pdf](http://www.liofilchem.net/login/pd/ts/620024_TS.pdf)).

Le piastre sono state poi incubate a 37°C e in condizioni anaerobiche, fino allo sviluppo di colonie ben visibili e facilmente contabili.

TYPICAL FORMULA	(g/l)
Enzymatic Digest of Casein	10.0
Meat Extract	10.0
Yeast Extract	4.0
Triammonium Citrate	2.0
Sodium Acetate	5.0
Magnesium Sulfate Heptahydrate	0.2
Manganese Sulfate Tetrahydrate	0.05
Dipotassium Hydrogen Phosphate	2.0
Glucose	20.0
Agar	15.0
Final pH 5.7 ± 0.1 at 25°C	

**Tabella 11.** Composizione MRS agar ([http://www.liofilchem.net/login/pd/ts/620024\\_TS.pdf](http://www.liofilchem.net/login/pd/ts/620024_TS.pdf)).

Per il monitoraggio dei lieviti sono stati utilizzati come terreni il YPD Agar e il WL Nutrient Agar, entrambi addizionati con 0.1% di cloramfenicolo, un antibiotico che previene la crescita dei batteri. Le piastre sono state poi incubate a 25°C per 3/4 giorni.

Il terreno YPD agar (1% estratto di lievito; 2% peptone; 2% D-glucosio; 1.8% agar) è stato utilizzato solo per i campioni i cui lieviti erano in fermentazione singola con il battere (*L. casei Shirota* + *D. hansenii* 36 e *L. casei Shirota* + *Mp50*). Nello specifico, il D-glucosio

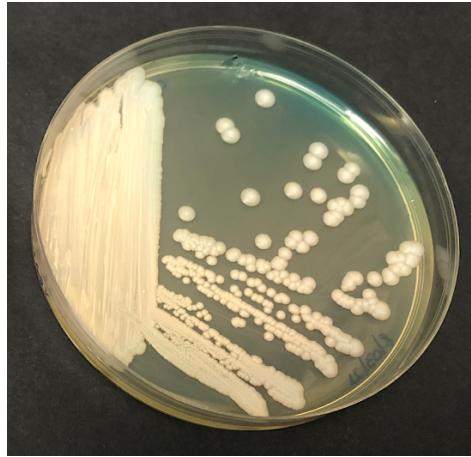
rappresenta la fonte di carbonio per i lieviti, il peptone la fonte di azoto, carbonio, vitamine e minerali, mentre l'estratto di lievito è ottenuto dall'idrolisi delle cellule di lievito, e fornisce precursori di nucleotidi e vitamine, per ultimo, l'agar rappresenta l'agente solidificante del terreno (<https://www.fishersci.it>).

Il WL (Wallerstain Laboratory) Nutrient Agar (LIOFILCHEM® S.r.l., Teramo, Italia) è un terreno differenziale, che è stato utilizzato per il campione contenente il pool di lieviti al fine di discriminarne le varie specie; infatti, i lieviti che crescono su tale terreno assumono colorazioni, elevatura, consistenza e morfologia diverse a seconda della specie. La Tabella 12 mostra la composizione del terreno mentre le Figure 8, 9, 10, 11, 12 mostrano come appaiono le diverse specie di lievito oggetto di studio, su WL Nutrient Agar.

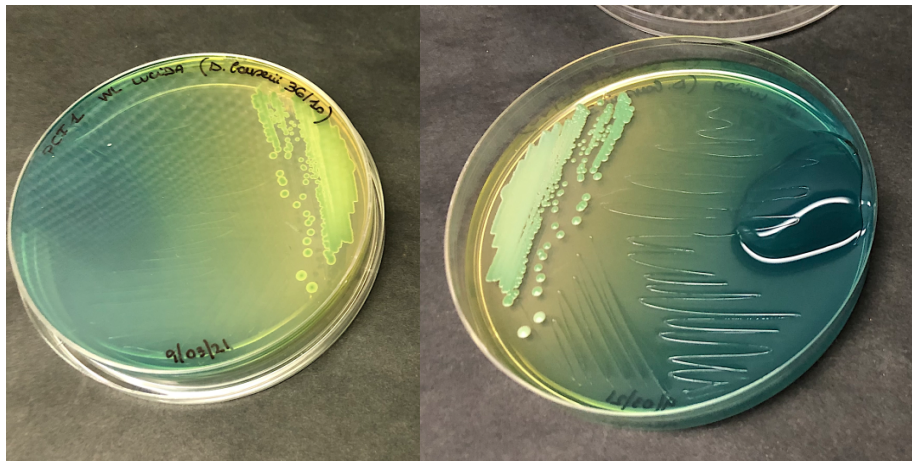
TYPICAL FORMULA*	(g/litre)
Enzymatic Digest of Casein	5.0
Yeast Extract	4.0
Dextrose	50.0
Monopotassium Phosphate	0.55
Potassium Chloride	0.425
Calcium Chloride	0.125
Magnesium Sulfate	0.125
Manganese Sulfate	0.0025
Ferric Chloride	0.0025
Bromcresol Green	0.022
Agar	20.0
Final pH 5.5 ± 0.2 at 25°C	

\*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

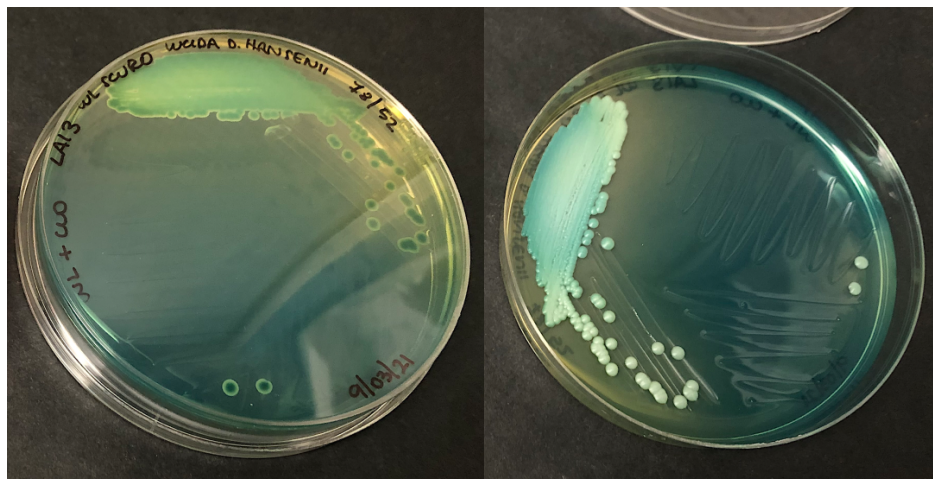
**Tabella 12.** Composizione WL (Wallerstain Laboratory) Nutrient Agar  
([http://www.liofilchem.net/login/pd/ifu/163712\\_IFU.pdf](http://www.liofilchem.net/login/pd/ifu/163712_IFU.pdf))



**Figura 8.** Colonie di *C. zeylanoides* su terreno WL (colonie di colore grigio perlato).

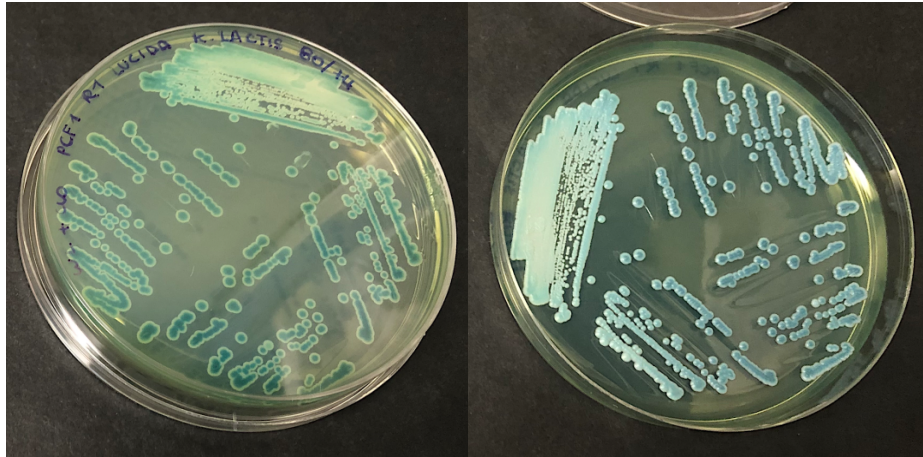


**Figura 9.** Colonie di *D. hansenii* 36 su terreno WL (colonie verdi, più chiare nella parte esterna).

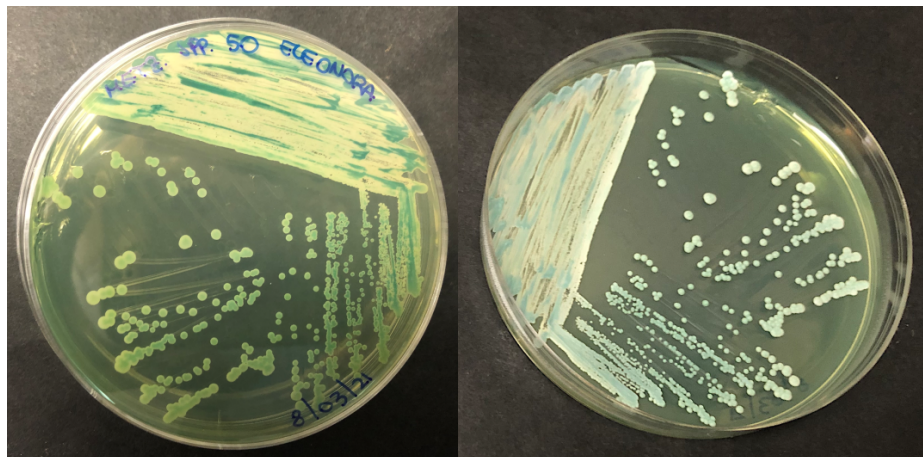


**Figura 10.** Colonie di *D. hansenii* 78 su terreno WL (colonie verdi, più chiare nella parte esterna).





**Figura 11.** Colonie di *K. lactis 80* su terreno WL (colonie celestine, più piccole rispetto a *D. hansenii*).



**Figura 12.** Colonie di *Metschnikowia* spp. su terreno WL (colonie bianche e “panciute”).

### 3.5 ANALISI CHIMICHE

Le analisi chimiche sono state condotte al termine della fermentazione (T<sub>24ore</sub>), dopo due settimane (T<sub>2settimane</sub>) e al termine dello stoccaggio (T<sub>4settimane</sub>) per la prima prova di fermentazione del kefir di soia, al fine di monitorare i vari parametri al termine del processo fermentativo e durante la *shelf-life* del prodotto. Nella seconda prova di fermentazione del kefir di soia sono state invece effettuate unicamente al termine della fermentazione per i set

sottoposti a 24 ore e 120 ore di fermentazione ( $T_{24\text{ore}}/T_{120\text{ore}}$ ) e al termine dello stoccaggio a  $4^{\circ}\text{C}$  ( $T_{4\text{settimane}}$ ). Unica eccezione per la determinazione dell'acido acetico che non è stata effettuata e degli acidi grassi, i quali sono stati determinati solamente al termine del periodo di stoccaggio.

Tutte le analisi sono state eseguite in doppio ed i risultati sperimentali espressi come valori medi  $\pm$  deviazione standard.

### *3.5.1 DETERMINAZIONE DEL pH*

Nelle bevande fermentate il pH è un parametro rilevante per la stabilità microbiologica, infatti evita lo sviluppo di patogeni di origine alimentare e microrganismi sensibili all'acido, inoltre può essere direttamente correlato al gusto del prodotto (da Silva et al., 2018).

Si è determinato il pH con un pH-metro, opportunamente calibrato prima dell'uso con soluzioni tampone a pH 4.0 e 7.0. Il dispositivo è costituito da una sonda in vetro che misura la differenza di potenziale elettrico sui due lati di una sottile membrana: tale differenza di potenziale è legata alla differenza tra le concentrazioni degli ioni idrogeno all'interno e all'esterno della membrana. Una volta calibrata, la sonda viene immersa nel campione da analizzare, precedentemente omogeneizzato. Oltre alla sonda per il pH viene utilizzata anche una sonda di temperatura, il cui compito è correggere la lettura del pH in funzione dell'effettiva temperatura del campione. Lo strumento riporta sul display il valore del pH con espressione alla seconda cifra decimale.

### 3.5.2 DETERMINAZIONE DELL'ACIDO LATTICO

L'acido lattico è un acido debole prodotto in seguito alla fermentazione lattica degli zuccheri e contribuisce all'acidificazione del kefir riducendone il pH.

L'acido lattico è stato determinato in accordo con il metodo analitico proposto dall'AOAC (Association of Official Analytical Chemists), mediante titolazione con una soluzione standard di NaOH 0.1 N e rilevazione del punto finale tramite l'indicatore fenolftaleina. Nello specifico, si utilizza come indicatore la fenolftaleina poiché ha un intervallo di viraggio tra pH 8.0 e 9.6; inoltre nella forma acida si presenta incolore (forma indissociata) mentre nella forma basica (forma dissociata) si presenta di colore rosa, dunque è possibile individuare facilmente il punto finale della titolazione grazie alla comparsa di un colore rosato persistente per almeno 30 secondi.

Il risultato è espresso in percentuale di acido lattico o in termini di grammi di acido lattico in 100 ml di campione.

Procedura:

- porre 5 g di campione in un beaker da 100 ml;
- aggiungere 45 ml di acqua deionizzata (diluizione 1:10);
- agitare e aggiungere 6 gocce di fenolftaleina al 2% (2 g in 100 ml di alcool etilico);
- titolare con NaOH 0.1 N fino alla comparsa di un colore rosato persistente e annotare il volume equivalente ( $V_{eq}$ ), ovvero i ml di NaOH 0.1 N utilizzati per raggiungere il viraggio dell'indicatore;
- calcolare la concentrazione dell'acido lattico come segue:

la reazione tra acido lattico e NaOH (base) ha un rapporto stechiometrico 1:1 quindi vale la relazione:

$$\text{moli di acido lattico} = \text{moli di NaOH } 0.1N \text{ aggiunte}$$

Conoscendo il numero di moli dell'acido lattico è possibile determinare la concentrazione di acido lattico utilizzando la formula:

$$\% \text{ Acido lattico} \left( \frac{\text{g ac. lattico}}{100\text{ml}} \right) = \frac{\text{Veq. (NaOH)} * 0.1}{1000} * \text{PM ac. lattico} * \text{FD} * 2$$

Con:

PM dell'acido lattico = 90.08;

FD (fattore di diluizione) = 10;

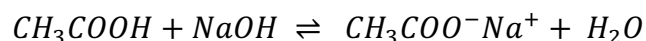
moltiplicatore 2 = poiché le analisi sono state effettuate su un volume finale di 50 ml invece che di 100 ml.

### 3.5.3 DETERMINAZIONE DELL'ACIDO ACETICO

L'acido acetico viene prodotto in concomitanza con l'acido lattico durante la fermentazione eterolattica operata da *L. casei Shirota*.

L'acido acetico è determinato mediante distillazione del campione in corrente di vapore con l'acidimetro di Juffmann (Figura 13) e successiva titolazione acido-base utilizzando NaOH 0.02 N come titolante e fenolftaleina al 2% (2 g in 100 ml di alcool etilico) come indicatore di viraggio.

Durante la titolazione avviene la seguente reazione:



Essendo l'acido acetico un acido debole, il pH al punto di equivalenza dovrà risultare alcalino poiché in soluzione si ha il sale di un acido debole che dà idrolisi, quindi si utilizza come indicatore la fenolftaleina che ha un intervallo di viraggio tra pH 8 e 9.6.

Procedura:

- inserire 5 ml di campione e acqua deionizzata nel palloncino di distillazione dell'acidimetro di Juffmann;
- attendere la distillazione di 40 ml di campione;
- aggiungere 2 gocce di fenolftaleina al 2% e titolare con NaOH 0.02 N fino al viraggio dell'indicatore;
- a partire dal volume equivalente di NaOH utilizzato, calcolare la concentrazione di acido acetico in g/l utilizzando l'opportuna tabella di conversione.



**Figura 13.** Acidimetro di Juffmann.

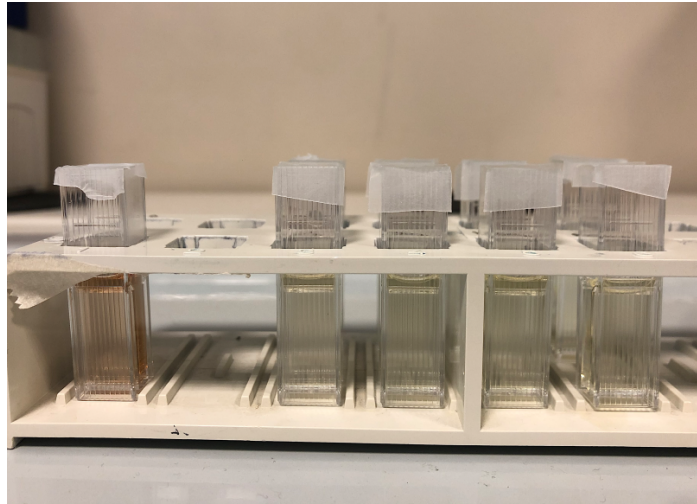
### 3.5.4 DETERMINAZIONE DELL' ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE

Per determinare il potere antiossidante dei campioni si è seguita la metodica descritta da Chen et al., 2010 che prevede l'utilizzo del radicale 1,1-difenile-2-picrylhydrazyl (DPPH). Nello specifico, facendo reagire il campione da analizzare con una soluzione di DPPH (0.2 mM in metanolo), i composti antiossidanti sono capaci di trasferire un atomo di idrogeno al radicale: il DPPH passa così dal colore viola fino a diventare DPPH-H virando a un giallo pallido (Figura 14). Si analizza quindi all'UV-Vis la diminuzione del picco a 517 nm (causata dalla formazione di DPPH-H) che è proporzionale alla carica antiossidante presente nel campione.

Procedura:

- prelevare 800 µl di campione e aggiungere 1 ml di radicale DPPH (0.2 mM in metanolo);
- preparare la soluzione del bianco con 800 µl di acqua deionizzata (nel caso specifico il bianco è stato fatto utilizzando latte di soia) e 1 ml di DPPH;
- vortexare, incubare per 30 minuti a temperatura ambiente e al buio;
- centrifugare a 12000 rpm per 5 minuti;
- prelevare 1 ml di surnatante e misurare l'assorbanza a 517 nm con spettrofotometro;
- la percentuale di riduzione del DPPH è stata calcolata come segue:

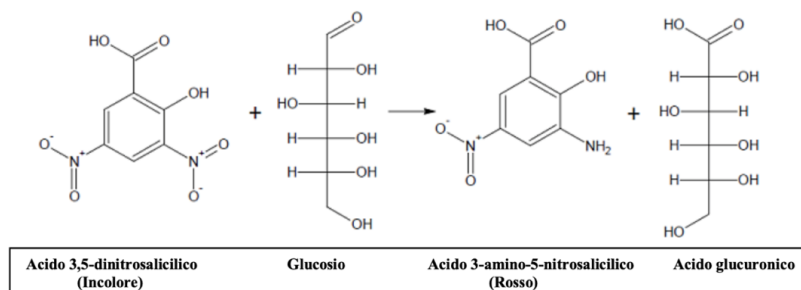
$$\left[ 1 - \left( \frac{A_{517}(\text{campione})}{A_{517}(\text{bianco})} \right) \right] * 100$$



**Figura 14.** Determinazione dell'attività antiossidante.

### *3.5.5 DETERMINAZIONE DEGLI ZUCCHERI RIDUCENTI*

Durante il processo di fermentazione gli oligosaccaridi e gli zuccheri complessi vengono scissi in zuccheri riducenti (glucosio e fruttosio). Per l'analisi degli zuccheri riducenti viene utilizzato l'acido 3,5 dinitrosalicilico (DNS) in presenza di sodio potassio tartrato. Il saggio con DNS è colorimetrico, e si basa su una reazione redox: il gruppo aldeidico del glucosio e il gruppo chetonico del fruttosio vengono ossidati, contemporaneamente l'acido 3,5-dinitrosalicilico (giallo) viene ridotto (in condizioni alcaline) ad acido 3-amino-5-nitrosalicilico (Figura 15), un composto rosso-arancio che assorbe a 540 nm. Il sodio potassio tartrato limita l'ossigeno disciolto in soluzione che altrimenti interferirebbe con l'ossidazione del glucosio (Jain et al., 2020).



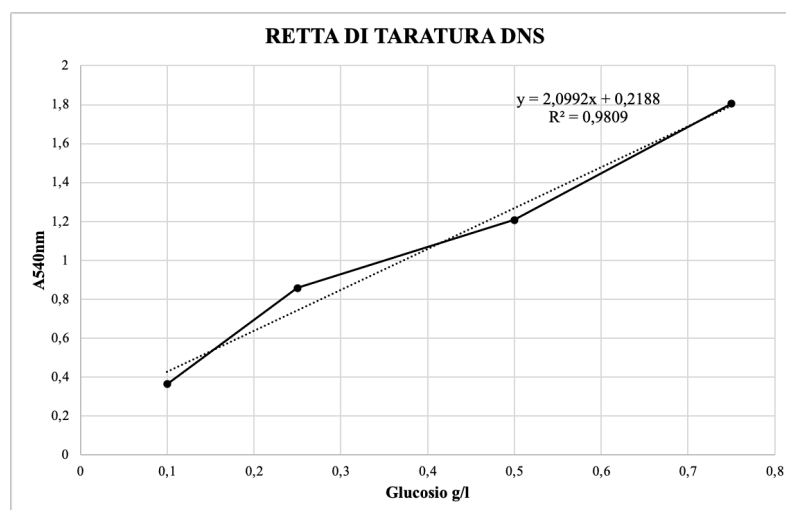
**Figura 15.** Reazione tra DNS e glucosio.

Procedura:

- in una sterilin porre 1 ml di campione (o sue diluizioni) + 2 ml di reattivo DNS;
- scaldare per 5 minuti in acqua bollente (100°C);
- lasciare raffreddare a temperatura ambiente;
- prelevare 1 ml di campione e leggere l'assorbanza a 540 nm con lo spettrofotometro;
- calcolare la concentrazione di zuccheri riducenti (g/l) utilizzando la retta di taratura (Figura 16) realizzata con soluzioni a concentrazione nota di glucosio:

$$y = 2,0992x + 0,2188$$

$$R^2 = 0,9809$$



**Figura 16.** Retta di taratura zuccheri riducenti.



### 3.5.6 DETERMINAZIONE DEI POLIFENOLI

I polifenoli totali del kefir, in ambiente alcalino, riducono la miscela di acido fosfotungstico e acido fosfomolibdico, costituenti del reattivo di Folin-Ciocalteu, in una miscela di ossidi di tungsteno e di molibdeno avente una colorazione blu (Figura 17) e un massimo di assorbanza intorno a 760 nm.

Procedura:

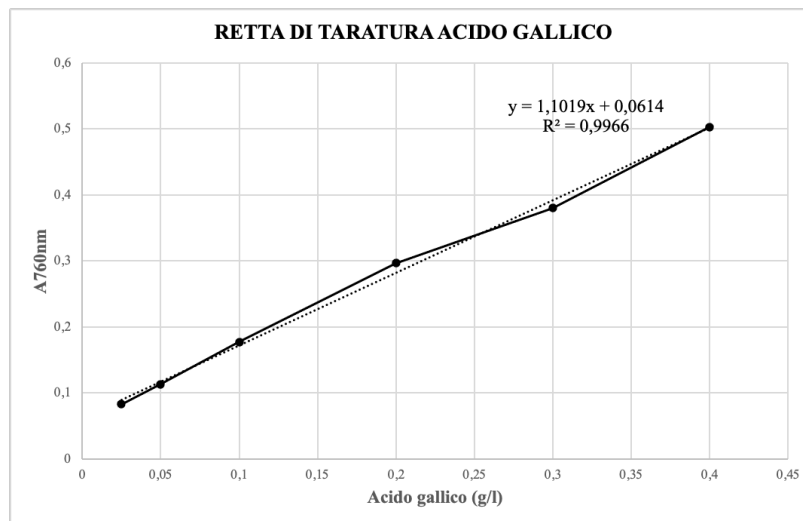
- in un matraccio da 100 ml porre 1 ml di campione (o sue diluizioni), per il bianco usare 1 ml di acqua deionizzata al posto del campione;
- aggiungere 50 ml di acqua deionizzata;
- aggiungere 5 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu;
- aggiungere 20 ml di soluzione di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anidro al 20%;
- portare a volume (100 ml) con acqua deionizzata;
- lasciare i matracci per 30 minuti a temperatura ambiente;
- prelevare 1 ml di campione e leggere l'assorbanza a 760 nm con lo spettrofotometro;
- determinare la concentrazione di polifenoli (g/l) utilizzando la retta di taratura realizzata con soluzioni a concentrazione nota di acido gallico (Figura 18):

$$y = 1.1019x + 0.0614$$

$$R^2 = 0.9966$$



**Figura 17.** Determinazione dei polifenoli.



**Figura 18.** Retta di taratura acido gallico.

### *3.5.7 DETERMINAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI POLINSATURATI*

Per la determinazione degli acidi grassi nella prima prova di fermentazione, i campioni sono stati addizionati con materiali di riferimento interno e sottoposti a transesterificazione con una soluzione di metossido di sodio; alcune tipologie di matrici, prima della transesterificazione, vengono trattate a caldo con acido cloridrico per favorire l'idrolisi della

matrice. La soluzione ottenuta viene neutralizzata ed estratta con esano, la fase organica viene analizzata in gascromatografo equipaggiato con rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC/FID).

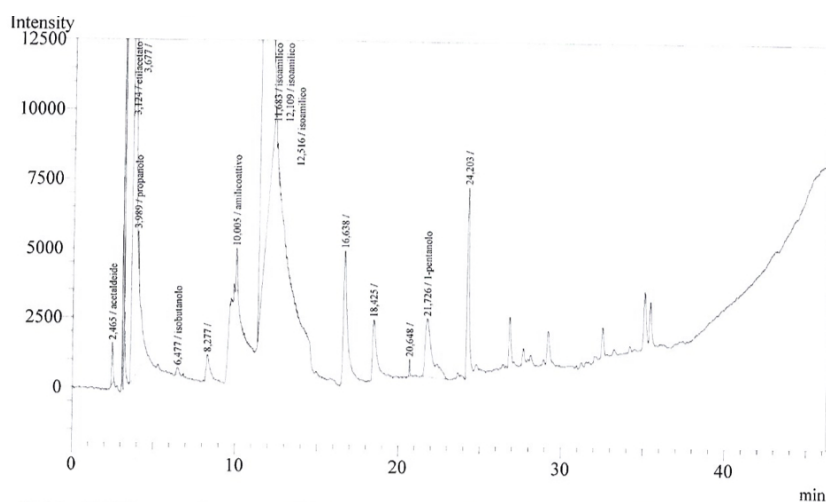
Per gli acidi grassi il limite di quantificazione è pari a 0.005% sul grasso o 0.001 g/100 g sul campione tal quale. Per il grasso il limite di quantificazione è pari a 0.001 g/100 g. Per gli acidi grassi i risultati vengono espressi in g/100 g (sul campione tal quale) e in % sul grasso. La precisione degli acidi grassi è stata valutata mediante misure ripetute, in giorni diversi e normalizzate per medie.

Nella seconda prova, invece, è stata rotta la membrana cellulare dei microrganismi per analizzare anche il contenuto di acidi grassi intracellulare.

### ***3.6 DETERMINAZIONE DEI PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE***

I campioni sono stati analizzati mediante gascromatografia per valutare i principali prodotti secondari di fermentazione quali acetaldeide, etilacetato, n-propanolo, isobutanolo, acetoino, alcol amilico e alcol isoamilico. Per l'analisi è stata utilizzata la colonna cromatografica "0.25 µm Supelcowax 10, lunghezza 60 m, diametro interno 0.32 mm". Tale analisi è stata condotta in doppio per tutti i campioni, al termine della fermentazione, dopo due settimane di stoccaggio e al termine del periodo di stoccaggio refrigerato. Per la seconda prova, l'analisi al gascromatografo è stata eseguita unicamente al termine dello stoccaggio. Ogni composto si è quantificato mediante microestrazione in fase solida (HS-SPME), come descritto da Dertli et al., 2017, con alcune modificazioni: 5 ml di campione omogeneizzato, 1 g di NaCl e 162 mg/l di 1-pentanololo (standard esterno) sono stati uniti in una vial di vetro

da 20 ml e posta in agitazione, a velocità minima con ancoretta magnetica, per 10 minuti a temperatura ambiente. La vial è stata poi trasferita a 55°C per 50 minuti con la fibra HS-SPME esposta nello spazio di testa, con il fine di far adsorbire gli analiti sulla fibra. Gli analiti sono poi stati desorbiti inserendo la fibra rivestita con divinilbenzene, carbossene, polidimetilsilossano (Sigma – Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) nell'iniettore del gascromatografo Shimadzu. Si ottiene un cromatogramma come quello mostrato in Figura 19; ciascun composto è stato poi quantificato mediante confronto con specifica curva di calibrazione.



**Figura 19.** Esempio cromatogramma analisi dei prodotti secondari di fermentazione tramite gascromatografia.

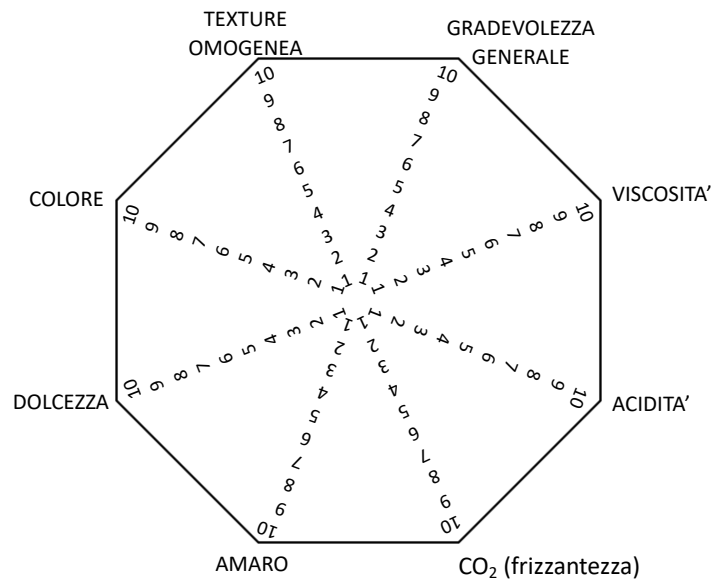
### 3.7 ANALISI SENSORIALE

Le valutazioni sensoriali sono state condotte da ricercatori dell'Università Politecnica delle Marche aventi familiarità con protocolli e test sensoriali. Sono stati sottoposti ad analisi sensoriale i kefir ottenuti dalla prima prova di fermentazione: la prova di degustazione è stata effettuata al termine delle 24 ore di fermentazione e dopo due e quattro settimane di

stoccaggio refrigerato. Mentre i kefir ottenuti dalla seconda prova di fermentazione sono stata analizzati unicamente al termine dello stoccaggio.

Prima di iniziare l'analisi viene servito latte di soia come termine di paragone, mentre i campioni di kefir sono numerati casualmente e serviti in bicchierini trasparenti di forma tale per cui l'analisi non sia minimamente influenzata dalla conoscenza del campione.

A ciascun degustatore è stato chiesto di esprimere un parere per ogni descrittore riportato in Tabella 13, assegnando un punteggio da 1 a 10 (1= minimo; 10 = massimo), secondo lo schema della Figura 20. I dati sensoriali sono riportati utilizzando diagrammi a Radar come descritto da Karçali et al., 2018.



**Figura 20.** Descrittori per l'analisi sensoriale.

DESCRITTORI	CARATTERISTICHE SENSORIALI ATTESE NEL KEFIR
Texture omogenea	Aspetto omogeneo con assenza di particelle
Gradevolezza generale	Parametro soggettivo
Viscosità	Leggermente viscoso
Acidità	Leggera acidità
CO <sub>2</sub> (frizzantezza)	Leggera frizzantezza dovuta alla presenza di CO <sub>2</sub> prodotta con la fermentazione
Amaro	Leggermente amaro
Dolcezza	Presenza di una nota dolce dovuta alla scissione degli oligosaccardi in monosaccaridi
Colore	Bianco giallastro

**Tabella 13.** Caratteristiche sensoriali attese nel Kefir (Karçali et al.,2018).

### **3.8 ANALISI STATISTICA**

I dati sperimentali sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) utilizzando il software statistico “*STATISTICA 7*”. Si sono determinate le differenze significative utilizzando il Ducan’s Test con valori di  $p$ -value < 0.05.

## CAPITOLO 4

### RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 4.1 ATTIVITÀ PROBIOTICA DEL LIEVITO *Metschnikowia* spp.

La Tabella 14 mostra i risultati ottenuti dalle analisi effettuate per valutare il potenziale probiotico del lievito *Metschnikowia* spp. (Mp50). I risultati sono stati confrontati con il ceppo di controllo commerciale *S. cerevisiae* var. *boulardii* (CODEX, Zambon Italia S.r.l., Bresso, Italia), già noto per le sue proprietà probiotiche.

L'attività antiossidante è espressa come percentuale di riduzione del radicale DPPH: si può notare come Mp50 non mostri questa caratteristica, al contrario, il ceppo di controllo ha un'attività antiossidante del 48% circa.

Mp50 è stato testato anche per la capacità di sopravvivere e crescere alla temperatura corporea (~37°C) e in presenza di pH acido e sali biliari, sia dopo 48 ore di incubazione che dopo 120 ore. Il simbolo “+” esprime un aumento della densità ottica e quindi crescita cellulare, il simbolo “±” un debole aumento, mentre il simbolo “-” esprime assenza di crescita. Mp50 ha mostrato una debole crescita cellulare alla temperatura corporea ma non è sopravvissuto in presenza di pH acido e sali biliari. Il risultato è espresso sia come log UFC/ml che come percentuale di sopravvivenza.

L'attività antimicrobica di Mp50 è stata valutata verso cinque patogeni umani, quali *E. coli*, *S. enterica*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *C. albicans*: il simbolo “+” nella tabella esprime la capacità del lievito di inibire la crescita batterica, il “±” una debole inibizione, mentre il “-” assenza di inibizione e quindi crescita del patogeno. Si può vedere come Mp50 ha impedito la crescita di *S. enterica* e *L. monocytogenes*, due importanti agenti eziologici che

causano rispettivamente salmonellosi e listeriosi, comuni infezioni trasmesse con l'assunzione di alimenti contaminati che, se non trattate, possono portare a gravi conseguenze per la salute. Infatti, dai dati emerge che nell' Unione Europea sono riferiti nell'uomo ogni anno oltre 91000 casi di salmonellosi

(<https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/salmonella>). Al contrario, Mp50 non ha ostacolato la crescita di *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*.

L'attività antimicrobica di Mp50 potrebbe essere associata alla secrezione di acido pulcherrimico che, una volta rilasciato nel mezzo, si lega agli ioni ferro formando la pulcherrimina. La mancanza di ferro libero, causata dall'immobilizzazione degli ioni ferrici, inibisce la crescita di molti microrganismi (Oro et al., 2014; Sipiczki, 2020).

Per tali ragioni, considerando la spiccata azione antimicrobica contro due importanti patogeni umani e la capacità di produrre acidi grassi polinsaturi (Canonica et al., 2016), Mp50 è stato impiegato nel presente studio per ampliare il pool di lieviti già messo a punto nella fermentazione della bevanda di soia e precedentemente testato con lo scopo di potenziare ulteriormente l'effetto benefico del prodotto.

ATTITUDINE PROBIOTICA Mp50				
Origine	Codice	Specie	DPPH %	Crescita 37 °C
Vinsanto	Mp50	<i>Metschnikowia</i> spp.	0	±
Ceppo commerciale	CODEX	<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bouardii</i>	48	+

pH 2.5 + 0.3% Sali biliari				
Codice	T48ore		T120ore	
	Log UFC/ml	Sopravvivenza (%)	Log UFC/ml	Sopravvivenza (%)
Mp50	6.15	0	6.25	0
CODEX	6.41	47.8	6.59	45.7

Attività antimicrobica					
Codice	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. albicans</i>
Mp50	-	+	-	+	-
CODEX	-	-	+	+	-

**Tabella 14.** Risultati attitudine probiotica del lievito *Metschnikowia* spp.

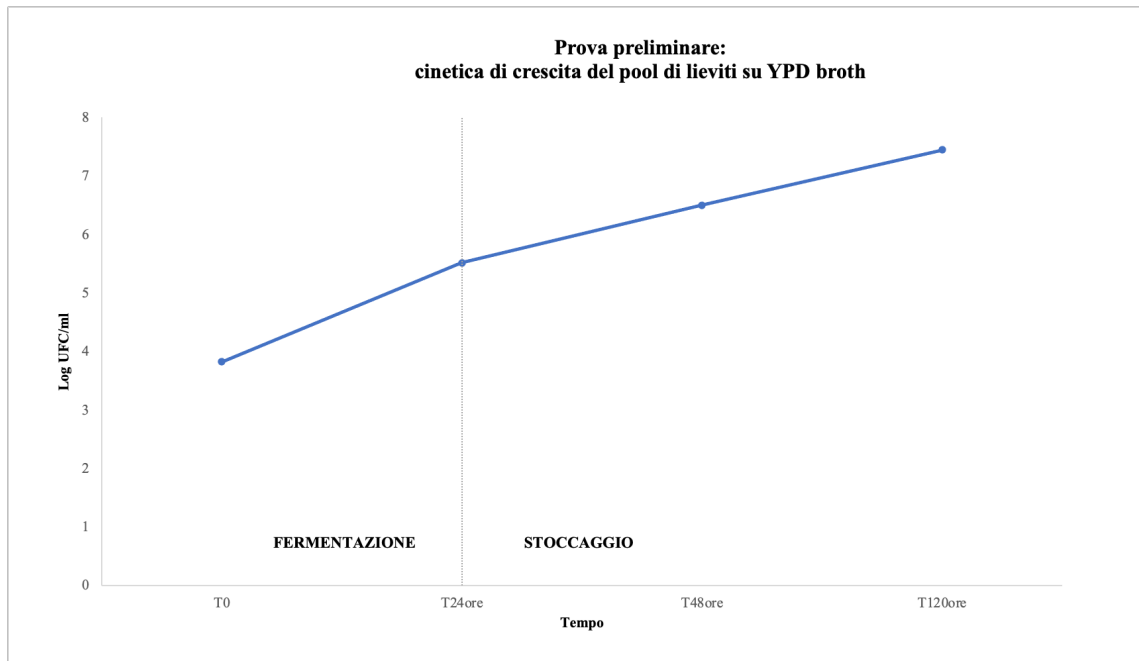


## **4.2 PROVE PRELIMINARI DI FERMENTAZIONE**

Le prove preliminari di fermentazione sono state monitorate attraverso conta vitale su piastra per valutare l'effettiva vitalità dei lieviti impiegati nella produzione di kefir e la loro interazione.

Nella prova allestita su YPD broth le conte sono state effettuate al momento dell'inoculo (tempo  $T_0$ ), a fine fermentazione ( $T_{24ore}$ ) e durante lo stoccaggio a 4°C dopo 48 e 120 ore dall'inoculo ( $T_{48ore}$ ,  $T_{120ore}$ ).

La Figura 23 mostra la cinetica di crescita dei lieviti sul terreno YPD broth. Il pool di lieviti ha rilevato un incremento di crescita di 1.7 ordini di grandezza dopo 24 ore di fermentazione, passando da una concentrazione di 3.82 Log UFC/ml a 5.52 Log UFC/ml. Durante il periodo di stoccaggio a 4°C, dopo ogni tempo monitorato, il numero di lieviti è aumentato di circa un ordine di grandezza, fino a raggiungere una concentrazione di 7.45 UFC/ml al termine dei cinque giorni. Dunque, è possibile affermare che il pool di lieviti è rimasto vitale e ha mantenuto il potenziale probiotico del prodotto.



**Figura 23.** Prova preliminare: cinetica di crescita del pool di lieviti su YPD broth.

T<sub>0</sub> = tempo zero; T<sub>24ore</sub> = tempo 24 ore (fine fermentazione); T<sub>48ore</sub> = tempo 48 ore dall'inoculo (24 ore dall'inizio dello stoccaggio); T<sub>120ore</sub> = tempo 120 ore dall'inoculo (fine stoccaggio).

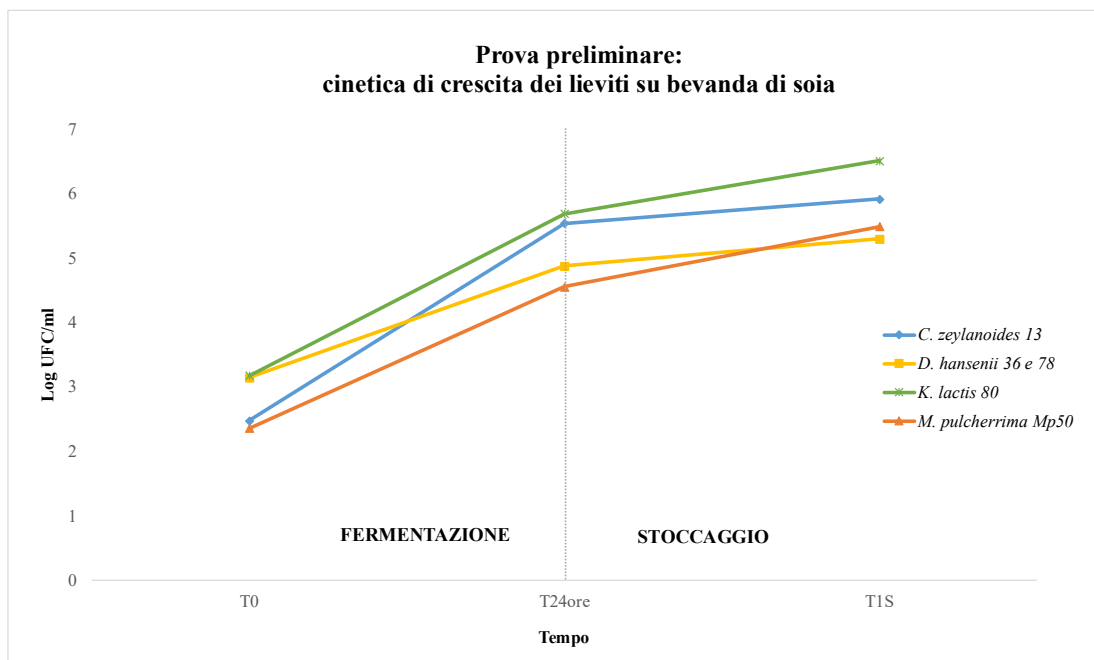
In riferimento alla prova preliminare utilizzando la bevanda di soia, le conte vitali sono state effettuate al momento dell'inoculo (tempo T<sub>0</sub>), a fine fermentazione (T<sub>24ore</sub>) e al termine dello stoccaggio a 4°C (T<sub>1settimana</sub>), come mostrato in Figura 24. In aggiunta è stato monitorato il pH negli stessi tempi (Tabella 15).

L'inoculo del lievito *C. zeylanoides* 13 è di circa un ordine di grandezza inferiore rispetto a *D. hansenii* 36 e 78, Mp50 e *K. lactis* 80.

Al termine della fermentazione (T<sub>24ore</sub>), *C. zeylanoides* 13 ha mostrato un maggiore incremento di crescita, aumentando di tre ordini di grandezza, rispetto agli altri lieviti il cui incremento è stato di circa 2.5 ordini di grandezza per *K. lactis* 80 e Mp50 e di 1.7 ordini di grandezza per *D. hansenii* 36 e 78. Questi dati spiegano il motivo delle differenze di concentrazione iniziale di inoculo per ciascun lievito: inferiore per *C. zeylanoides* 13 poiché da prove precedenti aveva mostrato una maggiore capacità di crescita rispetto agli altri; al

contrario si era optato per una maggiore concentrazione di inoculo iniziale per i ceppi di *D. hansenii* poiché in prove precedenti rivelavano una crescita rallentata rispetto agli altri ceppi. Invece, *C. zeylanoides* 13 ha mostrato un minor incremento durante il periodo di stoccaggio rispetto agli altri lieviti. Riguardo il ceppo Mp50 è risultato essere il ceppo di lievito con maggior incremento di crescita, passando da una concentrazione di 4.56 Log UFC/ml a 5.49 Log UFC/ml. In ogni modo, tutti i lieviti sono cresciuti fino al termine della settimana a 4 °C, raggiungendo concentrazioni comprese tra 5.30 e 6.5 Log UFC/ml.

Nonostante la bevanda di soia, rispetto al terreno YPD broth, sia una matrice meno ricca di nutrienti, la cinetica microbica ha comunque evidenziato un andamento crescente e ceppo specifico. Questo significa che i microrganismi possono utilizzare i carboidrati presenti nella bevanda di soia per la crescita, che sono principalmente saccarosio, raffinosisio e stachiosio (da Silvia et al., 2017). Tutti i lieviti sono rimasti vivi e vitali fino al termine dello stoccaggio, coesistendo senza influenzarsi negativamente a vicenda.



**Figura 24.** Prova preliminare: cinetica di crescita dei lieviti su bevanda di soia. T<sub>0</sub> = tempo zero; T<sub>24ore</sub> = tempo 24 ore (fine fermentazione); T<sub>1S</sub> = 1 settimana (fine stoccaggio).

Il pH non ha mostrato variazioni considerevoli nei differenti tempi di monitoraggio, evidenziando una completa assenza di acidificazione sia durante la fermentazione che durante il periodo di stoccaggio a 4°C.

<b>Prova preliminare su bevanda di soia: monitoraggio del pH</b>		
<b>T<sub>0</sub></b>	<b>T<sub>24ore</sub></b>	<b>T<sub>1s</sub></b>
6.85 ± 0.05	7.1 ± 0.06	6.87 ± 0.051

**Tabella 15.** Prova preliminare su latte di soia: monitoraggio del pH.

### **4.3 PROVA DI FERMENTAZIONE SU BEVANDA DI SOIA**

Dopo aver comprovato, attraverso le prove preliminari, la coesistenza positiva del pool di lieviti rimodulato e la loro crescita sulla matrice soia, è stata allestita la prova di fermentazione con i lieviti in co-coltura con il battere *L. casei Shiota*.

Per monitorare l'evoluzione del kefir di soia durante la fermentazione e il periodo di stoccaggio, sono state effettuate analisi microbiologiche e chimiche, analisi dei prodotti secondari di fermentazione e del profilo sensoriale.

#### **4.3.1 EVOLUZIONE DELLA POPOLAZIONE MICROBICA**

La Figura 25a mostra la cinetica di crescita del battere *L. casei Shiota* e dei lieviti *D. hansenii* 36 e Mp50, mentre la Figura 25b presenta la cinetica di crescita del pool di lieviti. Il monitoraggio è stato effettuato al momento dell'inoculo (T<sub>0</sub>), al termine della

fermentazione ( $T_{24ore}$ ), dopo due settimane di stoccaggio a  $4^{\circ}\text{C}$  ( $T_{2settimane}$ ) e al termine dello stoccaggio ( $T_{4settimane}$ ).

*L. casei Shirota*, durante la fermentazione, è cresciuto di circa un ordine di grandezza, per poi mantenersi invariato fino al termine dello stoccaggio. Riguardo la cinetica del solo battere, nelle varie tesi non si notano differenze sostanziali, specialmente tra il controllo  $C^+$ , in cui è stato inoculato unicamente il battere, e le tesi che presentano anche i lieviti. Dunque, *L. casei Shirota* coesiste con i lieviti senza subire un effetto negativo dovuto alla loro presenza.

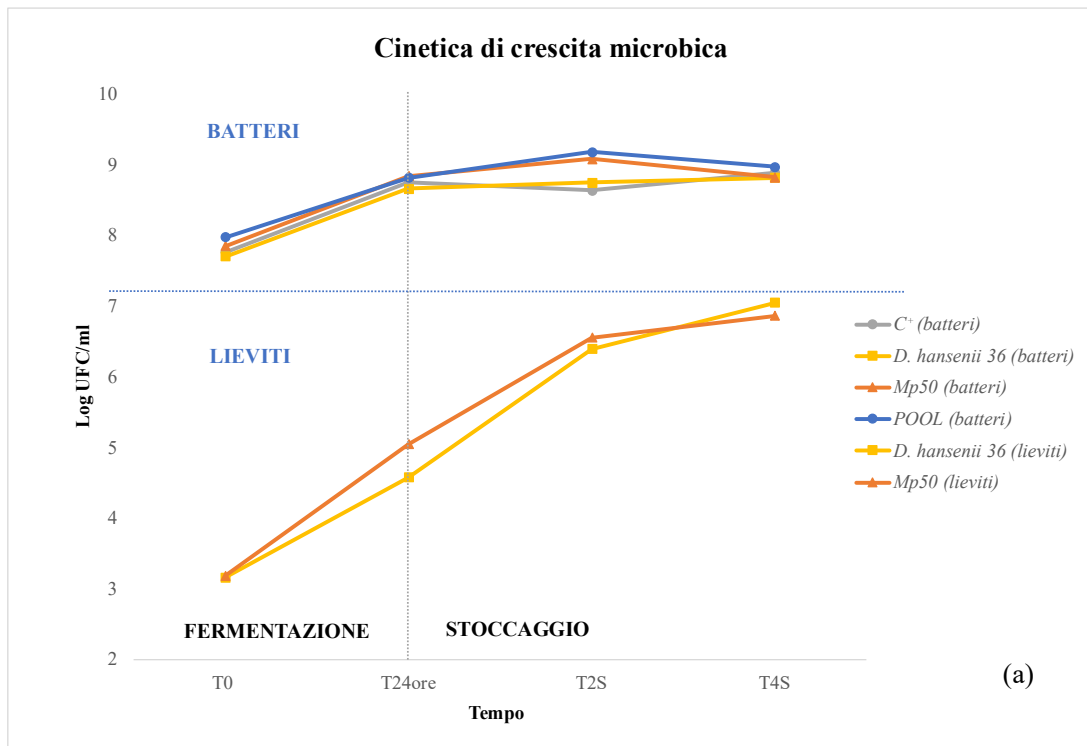
*D. hansenii* 36 e Mp50 in co-coltura con il battere crescono di circa due ordini di grandezza durante la fermentazione, crescita che continua ad aumentare in maniera esponenziale nelle due settimane di stoccaggio, raggiungendo una concentrazione di 6.4 – 6.5 Log UFC/ml, nonostante la temperatura di refrigerazione. Nelle ultime due settimane si nota, invece, una crescita rallentata, raggiungendo comunque una concentrazione finale di circa 7 Log UFC/ml.

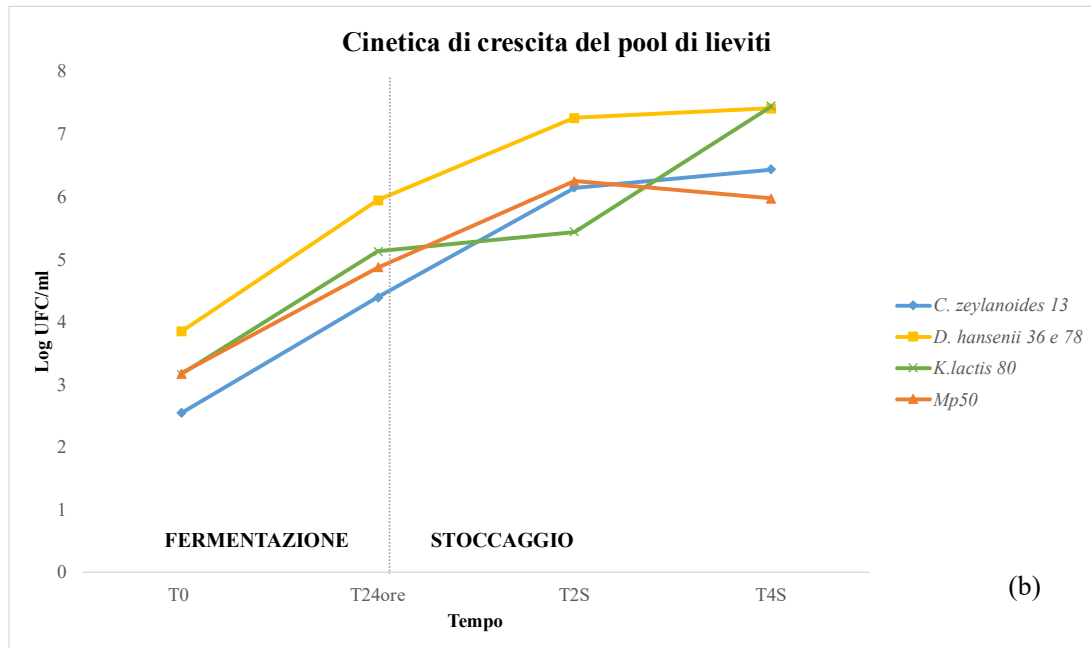
Questa cinetica di crescita si ritrova anche nella prova condotta dal pool di lieviti (Figura 25 b): *C. zeylanoides*, *D. hansenii* e Mp50 mostrano una crescita simile, mentre il *K. lactis* sembra avere una crescita inizialmente più rallentata, aumentando di un solo ordine di grandezza durante la fermentazione, ma successivamente incrementa di due ordini di grandezza nelle ultime due settimane di stoccaggio, raggiungendo una concentrazione di 7.45 Log UFC/ml, simile a quella del lievito *D. hansenii*.

Si osserva per i lieviti una crescita complessiva di circa 4 ordini di grandezza, dunque si può affermare che anche lo sviluppo dei lieviti non è influenzato dal battere.

La cinetica di crescita dei microrganismi durante il periodo di stoccaggio è confermata anche dal lavoro di Arslan (2015), che non evidenzia differenze nel numero di batteri ma un aumento della concentrazione dei lieviti.

In ogni caso, tutti i microrganismi rimangono vitali o si accrescono, mantenendo le loro proprietà benefiche fino al termine dello stoccaggio, che simula la *shelf-life* del prodotto.





**Figura 25.** Cinetica di crescita del battere *L. casei Shirota*, dei lieviti *D. hansenii* 36 e Mp50 (a) e del pool di lieviti (b).

T<sub>0</sub> = tempo zero; T<sub>24ore</sub> = tempo 24 ore (fine fermentazione); T<sub>2S</sub> = 2 settimane; T<sub>4S</sub> = 4 settimane (fine stoccaggio).

#### 4.3.2 ANALISI CHIMICHE

I kefir di soia ottenuti sono stati analizzati per il pH, per l'attività antiossidante e per il contenuto di acido lattico, acido acetico, zuccheri riducenti e polifenoli. Le analisi sono state effettuate al termine della fermentazione (T<sub>24ore</sub>), dopo due settimane a 4°C (T<sub>2settimane</sub>) e al termine dello stoccaggio (T<sub>4settimane</sub>). I risultati sono riportati nella Tabella 16.

	pH			ACIDO LATTICO (g/l)			ACIDO ACETICO (g/l)		
	T <sub>24ore</sub>	T <sub>2S</sub>	T <sub>4S</sub>	T <sub>24ore</sub>	T <sub>2S</sub>	T <sub>4S</sub>	T <sub>24ore</sub>	T <sub>2S</sub>	T <sub>4S</sub>
C <sup>+</sup>	6.6 ± 0.07 <sup>b</sup>	6.43 ± 0.04 <sup>a</sup>	6.37 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.21 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.26 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.38 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.43 ± 0.00 <sup>d</sup>
SH + 36	6.72 ± 0.01 <sup>a</sup>	6.38 ± 0.02 <sup>a</sup>	4.55 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.16 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.52 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.70 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.55 ± 0.00 <sup>c</sup>
SH + Mp50	6.52 ± 0.00 <sup>b</sup>	4.95 ± 0.04 <sup>b</sup>	4.3 ± 0.14 <sup>c</sup>	0.21 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.80 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.41 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.55 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.74 ± 0.00 <sup>b</sup>
SH + POOL	6.09 ± 0.01 <sup>c</sup>	4.64 ± 0.10 <sup>c</sup>	4.2 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.23 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.63 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.97 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.60 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.43 ± 0.00 <sup>b</sup>	1.10 ± 0.00 <sup>a</sup>

	ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE (%)			ZUCCHERI RIDUCENTI (g/l)			POLIFENOLI (g/l)		
	T <sub>24ore</sub>	T <sub>2S</sub>	T <sub>4S</sub>	T <sub>24ore</sub>	T <sub>2S</sub>	T <sub>4S</sub>	T <sub>24ore</sub>	T <sub>2S</sub>	T <sub>4S</sub>
C <sup>+</sup>	28.66 ± 1.80 <sup>a</sup>	30.89 ± 0.45 <sup>c</sup>	29.62 ± 2.25 <sup>b</sup>	16.31 ± 1.04 <sup>a</sup>	17.94 ± 0.93 <sup>b</sup>	18.76 ± 0.30 <sup>d</sup>	0.78 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.98 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.04 <sup>a</sup>
SH + 36	29.30 ± 1.80 <sup>a</sup>	43.31 ± 1.80 <sup>b</sup>	40.45 ± 0.45 <sup>a</sup>	15.88 ± 0.51 <sup>a</sup>	16.12 ± 1.04 <sup>bc</sup>	20.56 ± 0.42 <sup>c</sup>	0.77 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.82 ± 0.05 <sup>b</sup>
SH + Mp50	38.54 ± 1.35 <sup>a</sup>	44.90 ± 0.45 <sup>ab</sup>	38.22 ± 0.90 <sup>ab</sup>	16.28 ± 1.45 <sup>a</sup>	14.14 ± 0.37 <sup>c</sup>	34.64 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.43 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.68 ± 0.01 <sup>c</sup>
SH + POOL	28.34 ± 6.76 <sup>a</sup>	46.49 ± 0.90 <sup>a</sup>	34.08 ± 5.86 <sup>ab</sup>	12.60 ± 0.02 <sup>b</sup>	45.15 ± 0.07 <sup>a</sup>	31.16 ± 1.04 <sup>b</sup>	0.27 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.53 ± 0.05 <sup>bc</sup>	0.88 ± 0.02 <sup>b</sup>

**Tabella 16.** Analisi chimiche, a differenti tempi di monitoraggio, dei kefir di soia.

T<sub>24ore</sub> = tempo 24 ore (fine fermentazione); T<sub>2S</sub> = 2 settimane; T<sub>4S</sub> = 4 settimane (fine stoccaggio). I dati sono riportati come valori medi ± deviazione standard. I valori che mostrano, in apice, lettere differenti all'interno di ciascuna colonna sono significativamente differenti (Duncan test;  $p < 0.05$ ).

L'analisi del pH, dopo le 24 ore di fermentazione, mostra una maggiore acidificazione del mezzo nella tesi con il pool di lieviti, raggiungendo un valore di 6.09, rispetto agli altri campioni che presentano valori compresi tra 6.52 e 6.72. Dopo due settimane, differenze significative di acidificazione si hanno anche nel campione con Mp50, oltre che nel pool di lieviti. Infine, al termine delle quattro settimane, si evidenzia un'acidificazione del mezzo anche nella tesi con *D. hansenii* 36. Nelle bevande fermentate, il pH è rilevante per la stabilità microbiologica, per evitare lo sviluppo di patogeni di origine alimentare e microrganismi sensibili all'acido, e può essere direttamente correlato al gusto del prodotto (da Silva et al., 2017).



Si può notare come il campione che presenta unicamente il battere, mostri una minore acidificazione, mantenendo il pH intorno a 6.00 fino al termine dello stoccaggio, in confronto alle tesi in cui sono stati inoculati i lieviti. Questi risultati evidenziano una maggiore capacità acidificante dei lieviti rispetto al battere, probabilmente dovuta ad una maggiore capacità da parte dei lieviti di produrre metaboliti secondari di fermentazione.

In generale, i valori di pH ottenuti in questa prova sono più elevati rispetto a quelli riportati in altri studi, i quali riportano valori compresi fra 4.4 – 4.6 (da Silva et al., 2017; Karaçali et al., 2018). Questo risultato è giustificabile considerando che alcuni fattori possono modificare il valore del pH dei prodotti fermentati, come l'uso di diverse colture starter, la composizione della matrice di partenza, le condizioni di lavorazione e la temperatura di conservazione (da Silva et al., 2017).

I valori di pH rilevati nelle diverse prove, riflettono quello della produzione di acido lattico, specialmente a due settimane di stoccaggio, dove concentrazioni maggiori si riscontrano nelle tesi Mp50 (0.46 g/l) e nel pool (0.63 g/l), e a quattro settimane in cui si evidenzia una maggiore produzione di acido lattico anche nel campione con *D. hansenii* 36 (0.52 g/l).

Dalle analisi sul contenuto di acido acetico nel kefir è emerso che nel campione di controllo (solo *L. casei* Shirota) ne è presente la minore concentrazione, mentre la produzione di questo acido aumenta in maniera significativa nel pool, soprattutto a quattro settimane, dove raggiunge un valore di 1.10 g/l. Questi risultati sono coerenti con il più basso valore di pH ed il maggior contenuto di acido lattico e acido acetico nel pool, rispetto alle altre tesi.

Emerge dunque che i lieviti esercitano un'importante azione acidificante del mezzo rispetto al solo batterio.

L'attività antiossidante dei kefir è stata determinata rispetto alla bevanda di soia per evidenziare le differenze tra il prodotto fermentato, contenente microrganismi

potenzialmente probiotici, e la matrice di partenza che già presenta un'attività antiossidante di base, dovuta soprattutto al contenuto in isoflavoni.

Al termine delle 24 ore di fermentazione non si notano differenze statisticamente significative tra le tesi pur mostrando tutte una considerevole attività antiossidante rispetto alla bevanda non fermentata: la percentuale di riduzione del DPPH è compresa tra 28.34 e 38.54%, con un valore più elevato nel campione con il ceppo Mp50. Quest'ultimo dato sembra contrastare con quanto asserito sul ceppo Mp50 durante le prove di attitudini probiotiche (paragrafo 4.1). Infatti, sebbene esso non abbia mostrato attività antiossidante come lievito, probabilmente durante la fermentazione è in grado di produrre e rilasciare nel mezzo circostante metaboliti secondari in grado di aumentare la capacità antiossidante del prodotto finale.

Dopo due settimane di stoccaggio l'attività antiossidante aumenta in tutte tesi, anche se quella con il solo battere è quella che ha mostrato la minor entità di aumento (30.89%). Questo trend si mantiene anche a quattro settimane, dove però la percentuale di attività antiossidante si riduce rispetto alle due settimane. Questo potrebbe essere dovuto poiché si è in prossimità del termine della *shelf-life*.

In generale, il prodotto fermentato ha mostrato un incremento dell'attività antiossidante, rispetto alla matrice di partenza, compreso tra il 28 e il 46%, con valori più elevati nei campioni contenenti i lieviti, marcandone la loro attitudine probiotica.

Il monitoraggio degli zuccheri riducenti, dopo le 24 ore di fermentazione, evidenzia valori inferiori per il pool di lieviti (12.60 g/l) rispetto alle altre tesi, probabilmente causato dalla presenza di un maggior numero di microrganismi che utilizzano più nutrienti. Durante lo stoccaggio, rispetto ai risultati delle 24 ore, si nota in tutte le tesi un incremento della concentrazione degli zuccheri riducenti, variabile tra i campioni. Plausibilmente questo

aumento è dovuto al metabolismo microbico, attraverso il quale gli zuccheri complessi della matrice (stachiosio, raffinosio e saccarosio) vengono scissi in zuccheri più semplici (monosaccaridi come fruttosio, glucosio, galattosio) che possono essere utilizzati dai microrganismi per accrescersi durante il periodo a 4°C. Il maggior incremento si osserva nel pool di lieviti a due settimane, in cui si raggiunge una concentrazione di 45.15 g/l. In questo caso, essendo presenti più microrganismi, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo, probabilmente vengono scissi più zuccheri, poiché si ha una maggiore necessità di nutrienti disponibili per essere assimilati.

Questa ipotesi è correlata alla cinetica microbica, attraverso la quale si è visto che anche durante lo stoccaggio a 4°C i microrganismi non solo sopravvivono ma aumentano numericamente anche di 2 ordini di grandezza.

Ugualmente, la concentrazione di polifenoli aumenta durante lo stoccaggio rispetto al termine della fermentazione. Questo incremento risulta essere maggiore nelle prove condotte con il solo battere e minore nella prova con Mp50.

ACIDI GRASSI T4settimane (g/100g)					
	<i>Bevanda di Soia</i>	<i>C+</i>	<i>D. hansenii 36</i>	<i>Mp50</i>	<i>POOL</i>
Acido miristico (14:0)	0,00148 ± 0,00071	0,00120 ± 0,00068	0,00135 ± 0,00070	0,00128 ± 0,00069	0,00162 ± 0,00072
Acido palmitico (16:0)	0,164 ± 0,035	0,157 ± 0,033	0,157 ± 0,033	0,142 ± 0,030	0,182 ± 0,039
Acido esadecenoico (16:1)					0,00100 ± 0,00067
Acido margarico (17:0)	0,00149 ± 0,00071	0,00146 ± 0,00071	0,00133 ± 0,00069	0,00109 ± 0,00068	0,00165 ± 0,00072
Acido stearico (18:0)	0,075 ± 0,016	0,069 ± 0,015	0,072 ± 0,015	0,064 ± 0,014	0,085 ± 0,018
Acido Octadecenoico (18:1)	0,329 ± 0,051	0,311 ± 0,050	0,324 ± 0,051	0,285 ± 0,048	0,377 ± 0,055
Acido Octadecadienoico (18:2)	0,786 ± 0,098	0,740 ± 0,093	0,745 ± 0,093	0,657 ± 0,084	0,87 ± 0,11
Acido Arachidico (20:0)	0,0060 ± 0,0014	0,0055 ± 0,0014	0,0058 ± 0,0014	0,0049 ± 0,0012	0,0069 ± 0,0016
Acido octadecatrienoico (18:3)	0,104 ± 0,022	0,098 ± 0,021	0,097 ± 0,021	0,085 ± 0,018	0,114 ± 0,024
Acido eicosenoico (20:1)	0,00247 ± 0,00082	0,00221 ± 0,00079	0,00242 ± 0,00081	0,00161 ± 0,00072	0,00288 ± 0,00088
Acido beenico (22:0)	0,0054 ± 0,0013	0,0048 ± 0,0012	0,0054 ± 0,0013	0,0043 ± 0,0011	0,0059 ± 0,0014
Acido lignocetrico (24:0)	0,00161 ± 0,00072	0,00140 ± 0,00070	0,00159 ± 0,00072	0,00119 ± 0,00068	0,00190 ± 0,00075
Acidi grassi saturi	0,255 ± 0,039 <sup>b</sup>	0,240 ± 0,037 <sup>d</sup>	0,244 ± 0,037 <sup>c</sup>	0,219 ± 0,033 <sup>c</sup>	0,285 ± 0,043 <sup>a</sup>
Acidi grassi monoinsaturi	0,332 ± 0,051 <sup>a</sup>	0,313 ± 0,050 <sup>c</sup>	0,326 ± 0,051 <sup>b</sup>	0,287 ± 0,048 <sup>c</sup>	0,380 ± 0,055 <sup>d</sup>
Acidi grassi polinsaturi	0,89 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,838 ± 0,095 <sup>d</sup>	0,842 ± 0,095 <sup>c</sup>	0,742 ± 0,086 <sup>c</sup>	0,98 ± 0,12 <sup>a</sup>
Rapporto acidi grassi polinsaturi / acidi grassi monoinsaturi	2,68 ± 0,51 <sup>a</sup>	2,68 ± 0,53 <sup>a</sup>	2,58 ± 0,50 <sup>b</sup>	2,59 ± 0,53 <sup>b</sup>	2,58 ± 0,49 <sup>b</sup>
Rapporto acidi grassi polinsaturi / acidi grassi saturi	3,49 ± 0,66 <sup>a</sup>	3,49 ± 0,67 <sup>a</sup>	3,45 ± 0,65 <sup>b</sup>	3,39 ± 0,65 <sup>c</sup>	3,44 ± 0,67 <sup>b</sup>

**Tabella 17.** Contenuto degli acidi grassi nei kefir al termine del periodo di stoccaggio.

I dati sono riportati come valori medi ± deviazione standard. Solamente la somma degli acidi grassi saturi, monoinsaturi, polinsaturi e i loro rapporti sono stati sottoposti ad analisi statistica: i valori che mostrano, in apice, lettere differenti all'interno di ciascuna riga sono significativamente differenti (Duncan test;  $p < 0.05$ ).

Inseguito alla determinazione degli acidi grassi (Tabella 17) nei kefir dopo quattro settimane di stoccaggio e della bevanda di soia non fermentata, i risultati hanno mostrato differenze significative di entità variabile, tra i kefir e rispetto alla matrice di partenza. La concentrazione degli acidi grassi saturi varia tra 0.219 a 0.285 g/100g, mentre quella degli acidi grassi monoinsaturi varia tra 0.287 a 0.332 g/100g.

Risulta interessante evidenziare che l'acido esadecenoico (o acido palmitoleico (16:1)) è presente unicamente nel pool di lieviti, seppur con una concentrazione bassa. Questo acido grasso monoinsaturo è considerato una lipochina poiché viene rilasciato dal tessuto adiposo ed esercita le sue azioni su organi distanti. Alcune evidenze scientifiche hanno dimostrato effetti sul sistema cardiovascolare, correlazioni con l'obesità e l'epatosteatosi, influenza su alcune malattie metaboliche e miglioramento o prevenzione della resistenza all'insulina e del diabete (Frigolet e Gutiérrez-Aguilar, 2017). Un altro acido grasso monoinsaturo,

maggiormente presente nel pool di lieviti, rispetto alle altre tesi, è l'acido octadecenoico o acido oleico (18:1). L'acido oleico è noto per i suoi effetti benefici a carico del sistema cardiovascolare: in particolare sembrerebbe sortire effetti antiossidanti e sembrerebbe essere in grado di mantenere nella norma i livelli di colesterolo nel sangue (in particolare i livelli di colesterolo LDL) e di ridurre i valori della pressione arteriosa

(<https://www.humanitas.it/enciclopedia/integratori-alimentari/acido-oleico/>).

La concentrazione degli acidi grassi polinsaturi risulta più elevata rispetto agli altri, si aggira intorno a 0.742–0.980 g/100g; il più abbondante è l'acido octadecadienoico o acido linoleico (18:2) con valori compresi tra 0.660 e 0.870 g/100g. L'acido linoleico appartiene al gruppo degli acidi grassi essenziali omega-6 ed è un precursore di alcuni bioregolatori endogeni come le prostaglandine, implicate nei processi infiammatori, e i trombociti coinvolti nella coagulazione del sangue. Secondo le indicazioni dell'EFSA, l'Autorità europea per la sicurezza alimentare, l'acido linoleico contribuisce al mantenimento di livelli normali di colesterolo nel sangue (<https://www.humanitas-care.it/enciclopedia/integratori-alimentari/acido-linoleico/>).

Inoltre, il rapporto tra acidi grassi polinsaturi e monoinsaturi è compreso tra 2.58 e 2.68 g/100g e il rapporto tra acidi grassi polinsaturi e saturi è compreso tra 3.39 e 3.49 g/100g.

Nel complesso, i dati ottenuti dalle analisi chimiche mostrano un interessante contributo dei microrganismi sulle caratteristiche del prodotto finale rispetto alla matrice di partenza, con differenze significative tra le tesi.

### 4.3.3 PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE

Al termine della fermentazione ( $T_{24ore}$ ), dopo due settimane a 4°C ( $T_{2settimane}$ ) e al termine dello stoccaggio ( $T_{4settimane}$ ) sono stati determinati i principali prodotti secondari di fermentazione (acetaldeide, etilacetato, n-propanolo, isobutanolo, alcol amilico e isoamilico e acetoino) tramite gascromatografia. I risultati sono mostrati nella Tabella 18 ed espressi in ppm (mg/l).

PRINCIPALI PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE							
CAMPIONI	$T_{24ore}$						
	ACETALDEIDE	ETILACETATO	n-PROPANOLO	ISOBUTANOLO	ALCOL AMILICO	ALCOL ISOAMILICO	ACETOINO
$C^+$	nd*	24.10 ± 2.67 <sup>ab</sup>	29.42 ± 1.18 <sup>b</sup>	nd	0.12 ± 0.00 <sup>b</sup>	4.85 ± 0.15 <sup>a</sup>	nd
SH + 36	nd	26.50 ± 0.25 <sup>a</sup>	41.53 ± 1.43 <sup>a</sup>	nd	0.20 ± 0.10 <sup>b</sup>	3.14 ± 0.02 <sup>a</sup>	nd
SH + Mp50	1.47 ± 2.08	19.73 ± 1.91 <sup>b</sup>	24.87 ± 0.48 <sup>c</sup>	nd	1.02 ± 0.52 <sup>a</sup>	4.72 ± 0.59 <sup>a</sup>	nd
SH + POOL	3.82 ± 3.05	12.91 ± 0.88 <sup>c</sup>	22.50 ± 1.50 <sup>c</sup>	nd	0.27 ± 0.04 <sup>b</sup>	4.19 ± 1.08 <sup>a</sup>	nd

T2settimane							
CAMPIONI	ACETALDEIDE	ETILACETATO	n-PROPANOLO	ISOBUTANOLO	ALCOL AMILICO	ALCOL ISOAMILICO	ACETOINO
C <sup>+</sup>	nd	23.53 ± 0.14 <sup>b</sup>	16.48 ± 1.69 <sup>b</sup>	nd	0.10 ± 0.08 <sup>c</sup>	3.48 ± 0.26 <sup>b</sup>	nd
SH + 36	nd	20.09 ± 6.28 <sup>b</sup>	18.87 ± 0.00 <sup>b</sup>	nd	0.34 ± 0.06 <sup>bc</sup>	5.87 ± 1.17 <sup>a</sup>	nd
SH + Mp50	nd	15.63 ± 0.04 <sup>b</sup>	18.84 ± 0.05 <sup>b</sup>	nd	0.43 ± 0.20 <sup>ab</sup>	5.07 ± 0.82 <sup>ab</sup>	nd
SH + POOL	11.81 ± 0.17	81.45 ± 0.69 <sup>a</sup>	251.61 ± 31.33 <sup>a</sup>	nd	0.72 ± 0.01 <sup>a</sup>	6.57 ± 0.28 <sup>a</sup>	nd

T4settimane							
CAMPIONI	ACETALDEIDE	ETILACETATO	n-PROPANOLO	ISOBUTANOLO	ALCOL AMILICO	ALCOL ISOAMILICO	ACETOINO
C <sup>+</sup>	nd	19.02 ± 0.13 <sup>c</sup>	14.34 ± 0.33 <sup>b</sup>	nd	0.16 ± 0.00 <sup>b</sup>	3.26 ± 0.25 <sup>c</sup>	nd
SH + 36	nd	48.89 ± 0.88 <sup>bc</sup>	15.78 ± 0.52 <sup>b</sup>	nd	0.06 ± 0.08 <sup>b</sup>	9.82 ± 0.74 <sup>a</sup>	nd
SH + Mp50	29.81 ± 0.47 <sup>b</sup>	84.31 ± 0.75 <sup>b</sup>	14.66 ± 0.12 <sup>b</sup>	nd	19.29 ± 0.98 <sup>a</sup>	4.43 ± 0.41 <sup>bc</sup>	nd
SH + POOL	48.27 ± 0.56 <sup>a</sup>	254.41 ± 45.47 <sup>a</sup>	17.38 ± 0.91 <sup>a</sup>	7.28 ± 1.01	19.79 ± 2.20 <sup>a</sup>	4.85 ± 0.34 <sup>b</sup>	nd

\*nd = non determinato

**Tabella 18.** Principali prodotti secondari di fermentazione nel kefir di soia; i dati sono espressi in ppm (mg/l) e riportati come valori medi ± deviazione standard. I valori che mostrano, in apice, lettere differenti all'interno di ciascuna colonna sono significativamente differenti (Duncan test;  $p < 0.05$ ).

L'acetaldeide (aroma di mela verde, erba tagliata) è stata rilevata nel pool di lieviti, con concentrazioni che aumentano dal termine della fermentazione (3.82 ppm), a due settimane (11.81 ppm) e a quattro settimane (48.27 ppm). Inoltre, è presente, seppur in quantità minore, anche nel campione con Mp50 a 24 ore (1.47 ppm) e a quattro settimane (29.81 ppm). Questo risultato è coerente con quanto riportato da Tangyu et al. (2019) dove viene confermata la maggior produzione di questo composto nei prodotti con due o più culture; mentre l'aumento di acetaldeide durante lo stoccaggio è confermato anche da quanto riportato da Arslan (2015).

La concentrazione di etilacetato (aroma di ananas) aumenta notevolmente nel pool a due settimane (81.45 ppm) e in tutti i campioni contenenti i lieviti a quattro settimane, specialmente nel pool.

L'n-propanolo (alcol, nota di durezza) dopo le 24 ore di fermentazione è maggiormente presente in *D. hansenii* 36, invece, dopo due settimane di stoccaggio ha una concentrazione molto elevata nel pool (251.61 ppm), per poi diminuire alle quattro settimane.

L'isobutanolo (nota alcolica, solvente) è stato rilevato unicamente nel pool a quattro settimane, con una concentrazione di 7.28 ppm.

Nel complesso, l'alcol amilico e isoamilico (nota fruttata) sono presenti in tutti i campioni ma a concentrazioni molto basse. L'alcol amilico aumenta a due settimane (soprattutto nel pool), per poi diminuire a quattro settimane (solo nel controllo aumenta di poco). Per l'alcol isoamilico non si nota nessuna differenza statisticamente significativa tra le tesi a 24 ore, dopo due settimane la concentrazione aumenta tranne che nel controllo, mentre diminuisce a quattro settimane ad eccezione di *D. hansenii* 36.

L'acetoino (odore burroso) non è stato rilevato in nessun campione.



In generale tutti i campioni hanno mostrato una varietà considerevole nella presenza di metaboliti secondari di fermentazione che probabilmente si riflette in una spiccata complessità aromatica, più accentuata nel pool di lieviti a partire dalle due settimane.

Inoltre, la considerevole variabilità nella concentrazione di ciascun composto nei differenti tempi di monitoraggio, evidenzia il grande dinamismo microbico, responsabile appunto della produzione dei metaboliti secondari di fermentazione, anche durante le fasi refrigerate.

#### 4.3.4 ANALISI SENSORIALE

L'analisi sensoriale dei kefir è stata condotta al termine della fermentazione ( $T_{24\text{ore}}$ ), dopo due settimane di stoccaggio a  $4^{\circ}\text{C}$  ( $T_{2\text{settimane}}$ ) e al termine dello stoccaggio ( $T_{4\text{settimane}}$ ). Ciascun degustatore ha assegnato un punteggio da 0 a 9 (0 = minimo; 9 = massimo) per ogni descrittore proposto e i risultati ottenuti sono mostrati nella Figura 26.

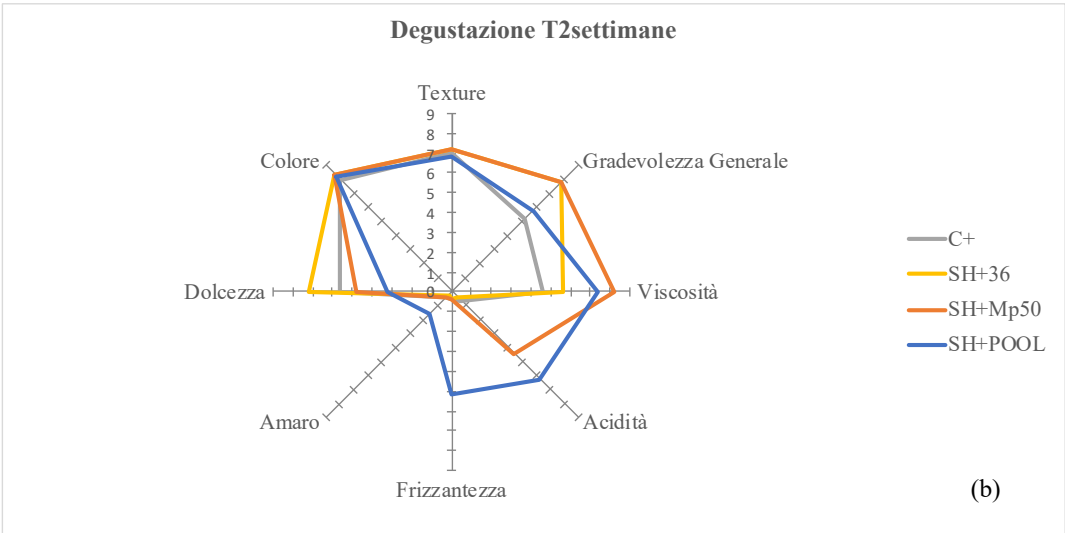
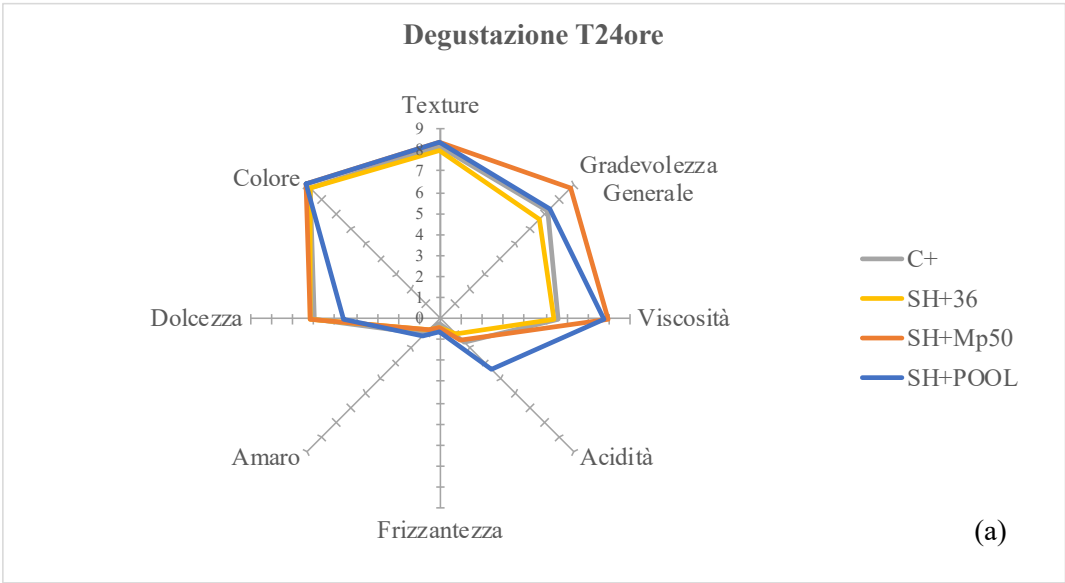
Dopo 24 ore di fermentazione (Figura 26 a) i kefir ottenuti con Mp50 e il pool di lieviti hanno evidenziato maggiore viscosità. In aggiunta il pool mostra maggiore acidità (a conferma di quanto rilevato dalle analisi chimiche) e minore dolcezza. In termini di colore e texture, tutte le tesi hanno ottenuto risultati confrontabili; in particolare Mp50 è stato valutato come il più gradevole (punteggio medio 8.8). In ogni caso tutti i campioni hanno raggiunto un punteggio maggiore della sufficienza (punteggio medio maggiore di 6).

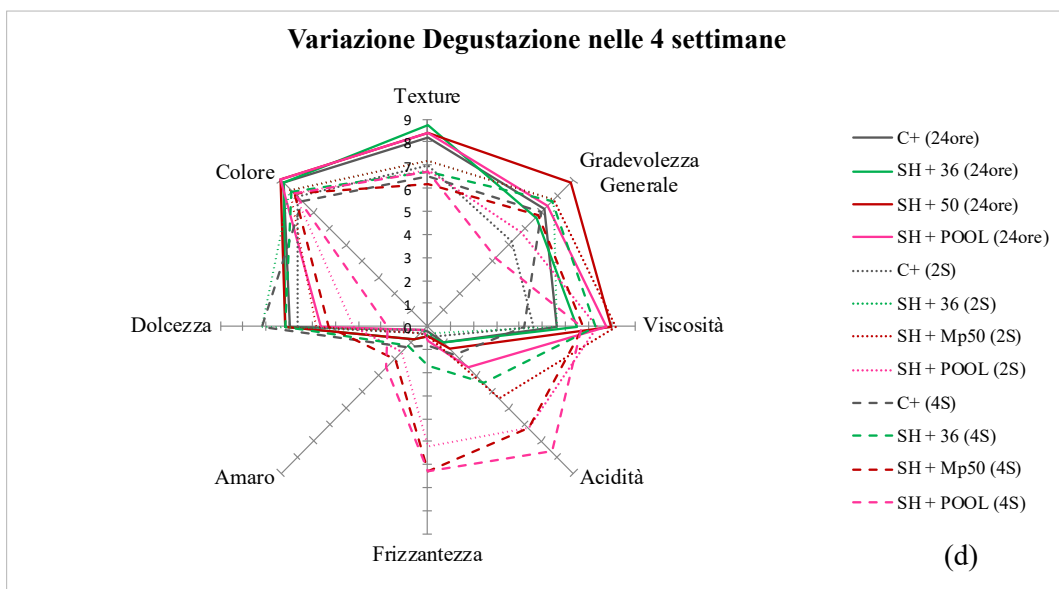
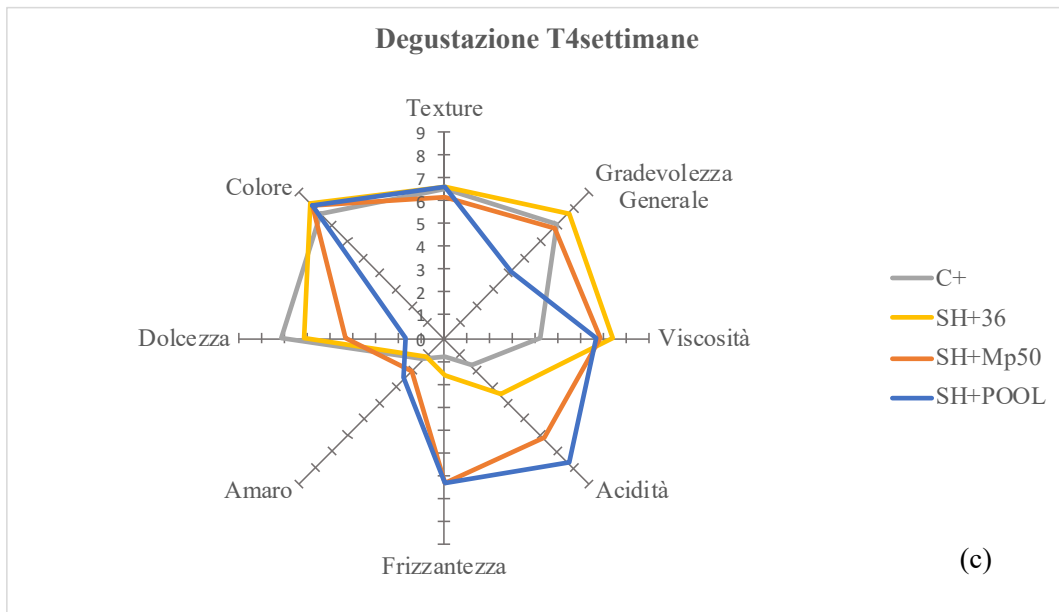
A due settimane di stoccaggio a  $4^{\circ}\text{C}$  (Figura 26 b) Mp50 e pool mantengono la maggiore viscosità e il pool conferma essere la tesi più acida e meno dolce. Mentre il campione con il lievito *D. hansenii* 36 ha mostrato un maggior grado di dolcezza, che si riflette sul maggior punteggio di gradevolezza generale insieme a Mp50 (punteggio medio intorno a 8). Al

contrario, il campione di controllo con solo *L. case Shirota*, ha ottenuto un punteggio di gradevolezza generale più basso (punteggio medio 5).

Al termine dello stoccaggio (Figura 26 c) le tesi con *D. hansenii* 36, Mp50 e il pool mostrano maggiore viscosità e il pool conferma la spiccata acidità e frizzantezza. Il punteggio relativo alla gradevolezza generale si abbassa, specialmente nel pool, probabilmente dovuto ad uno spiccato sentore di acidità che risulta essere meno gradito al palato dei degustatori.

La Figura 26 d mostra una visione d'insieme su come si sono modulati i vari parametri nel corso delle quattro settimane di stoccaggio, rispetto al prodotto appena ottenuto (fine fermentazione). Si possono notare delle differenze considerevoli tra le tesi ma anche tra i tempi di monitoraggio, infatti, il kefir è un prodotto vivo e dinamico, contenente microrganismi che si accrescono durante la *shelf-life* e rilasciano composti nella bevanda che, di conseguenza, mostra un profilo organolettico variabile. In generale si può affermare che durante il periodo di stoccaggio, in confronto al termine della fermentazione, aumenta l'acidificazione e il sentore di frizzantezza, si riduce il punteggio assegnato alla texture e compare il sentore amaro. Dunque, le analisi sensoriali rispecchiano le analisi chimiche e confermano l'ipotesi che l'aumento dell'acidità, soprattutto quella dovuta all'acido acetico, diminuisce la gradevolezza del prodotto (da Silva et al., 2017), anche se questo aspetto è molto soggettivo. L'indice di gradevolezza generale rimane comunque elevato, specialmente nelle prime due settimane; questo risultato potrebbe essere attribuito al ruolo dei ceppi probiotici nella degradazione dei composti aromatici volatili indesiderati presenti nella bevanda soia (Karaçali et al., 2018).





**Figura 26.** Profilo sensoriale dei kefir di soia dopo 24 ore di fermentazione (a), due settimane di stoccaggio (b) e al termine dello stoccaggio (c). La figura (d) confronta i risultati ottenuti nei tre tempi di analisi.

Alcuni degustatori, oltre ad assegnare un punteggio per ogni descrittore, hanno inserito delle note aromatiche per ciascun kefir assaggiato, riassunte nella Tabella 19.

NOTE DEGUSTAZIONE			
CAMPIONI	T24ore	T2settimane	T4settimane
C <sup>+</sup>	nota citrica dal punto di vista olfattivo ma non al gusto; vanigliato.	più simile alla matrice di partenza.	neutro; simile alla bevanda di soia; liquido.
SH + 36	sapore vanigliato molto gradevole; più neutro dal punto di vista olfattivo; più acido dal punto di vista olfattivo.	agrumato; vanigliato; dolce dal punto di vista olfattivo.	dolce; acidità citrica; sentore leggero di agrumato; aroma vaniglia/agrumato.
SH + Mp50	sapore vanigliato; agrumato.	agrumato in ingresso; fresco.	sensazione frizzante in bocca; acido dal punto di vista olfattivo; ricottoso.
SH + POOL	nota agrumata (arancia); fruttato; vaniglia/agrumato leggero limone; più acido rispetto agli altri.	formaggioso; acido; più aspro.	frizzante in bocca; molto acido; etilacetato; ricottoso.

**Tabella 19.** Note aromatiche percepite durante la degustazione dei kefir.

In generale, dopo le 24 ore di fermentazione, i campioni sembrano risultare più omogenei tra di loro dal punto di vista de gustativo. Invece, al termine delle due settimane a 4°C, i campioni sembrano essere maggiormente diversificati gli uni rispetto agli altri: il controllo è risultato il più simile alla matrice di partenza, le tesi con *D. hansenii* 36 e Mp50 ricevono commenti paragonabili, mentre il pool risulta essere il più diversificato con maggiore acidità e asprezza, probabilmente dovuto al maggior contenuto in etilacetato e n-propanolo.

Dopo 4 settimane, concluso il periodo di stoccaggio, i campioni continuano a ricevere considerazioni positive. Il controllo continua ad essere il più neutro e simile alla matrice bevanda di soia, *D. hansenii* 36 e Mp50 si diversificano maggiormente l'uno rispetto all'altro: il kefir ottenuto dall'impiego di *D. hansenii* 36 è risultato il più agrumato e vanigliato, mentre quello ottenuto dall'impiego di Mp50 si è differenziato per la comparsa di frizzantezza, acidità e sentore di ricotta. Il campione con maggiore complessità aromatica

rimane il kefir ottenuto con il pool di lieviti. In particolar modo, la percezione aromatica di etilacetato al gusto (note aromatiche di ananas) nel pool di lieviti rispecchia fortemente l'analisi dei prodotti secondari di fermentazione dove la concentrazione di etilacetato molto elevata, pari a 254.41 ppm.

#### ***4.4 SECONDA PROVA DI FERMENTAZIONE: RIMODULAZIONE DEL TEMPO DI FERMENTAZIONE***

Dopo aver esaminato i risultati ottenuti nella prima prova di fermentazione, nella seconda parte del lavoro di tesi è stata allestita una nuova prova rimodulando il tempo di fermentazione. Alcuni campioni sono stati fatti fermentare per 24 ore, con lo scopo di confermare i dati ottenuti precedentemente, mentre altri campioni sono stati fatti fermentare per 120 ore e successivamente stoccati per quattro settimane. L'obiettivo era quello di valutare come variano i parametri chimici, i prodotti secondari di fermentazione, la concentrazione degli acidi grassi e il profilo organolettico, in funzione del tempo di fermentazione.

##### ***4.4.1 EVOLUZIONE DELLA POPOLAZIONE MICROBICA***

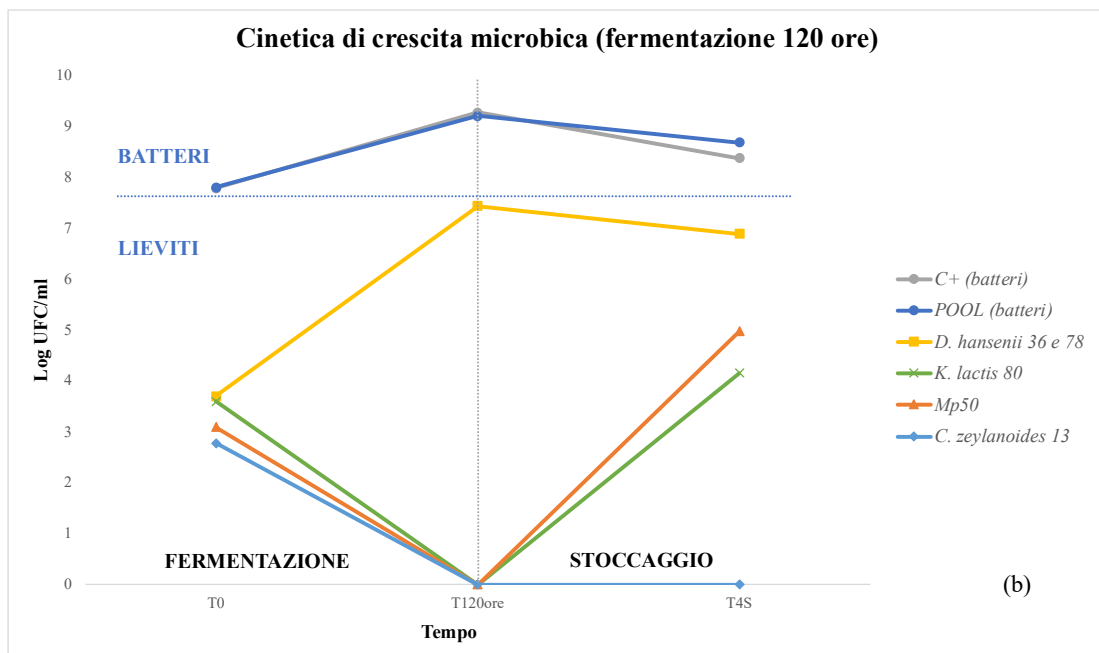
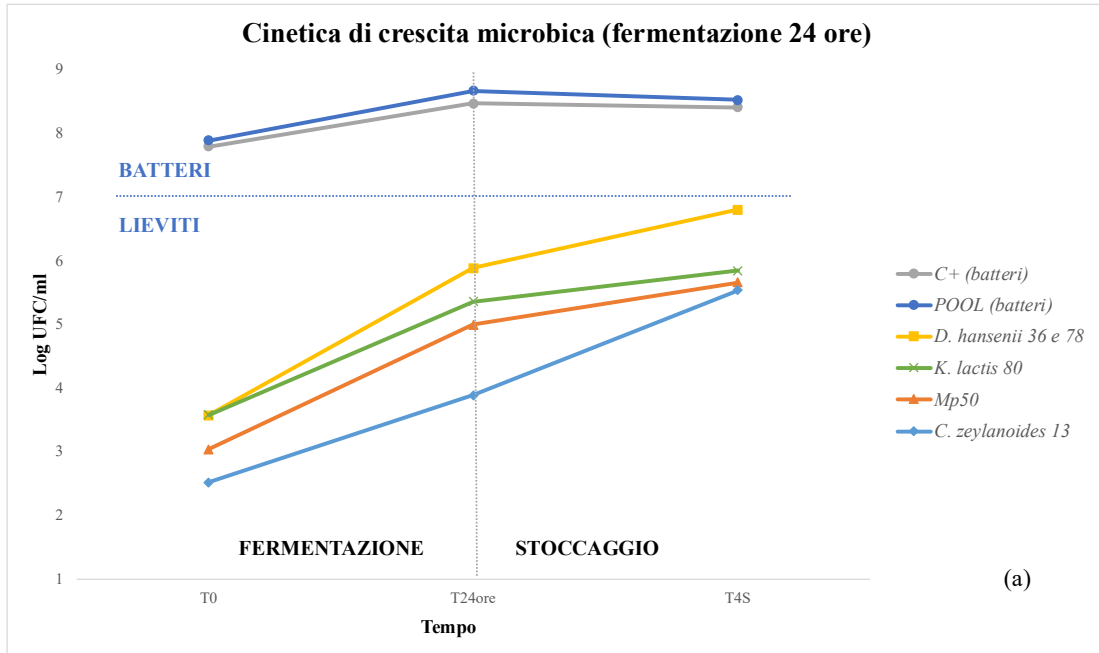
La Figura 27 mostra la cinetica di crescita del battere *L. casei Shirota* e del pool di lieviti nei campioni con tempo di fermentazione 24 ore (Figura 27 a) e 120 ore (Figura 27 b). I dati sono stati esaminati al momento dell'inoculo ( $T_0$ ), al termine della fermentazione ( $T_{24\text{ore}}$  /  $T_{120\text{ore}}$ ) e al termine dello stoccaggio a 4°C ( $T_{4\text{settimane}}$ ).

La crescita di *L. casei Shirota*, dopo 24 ore di fermentazione, conferma i risultati precedenti: il battere è cresciuto di circa un ordine di grandezza durante la fermentazione, per poi mantenersi invariato fino allo scadere delle quattro settimane. Dopo 120 ore di

fermentazione, l'incremento è stato di circa 1.5 ordini di grandezza però, durante lo stoccaggio, il numero di cellule vitali è diminuito, raggiungendo una concentrazione di 8.38 Log UFC/ml nel controllo e 8.68 Log UFC/ml nella tesi con il pool di lieviti. Seppur al termine delle 120 ore si è verificato un maggior aumento di cellule vitali, dovuto al tempo di fermentazione prolungato, alla fine dello stoccaggio le concentrazioni si equivalgono.

In riferimento al pool di lieviti, dopo 24 ore di fermentazione, la cinetica di crescita di *D. hansenii* 36 e 78 e Mp50 è confrontabile alla prova precedente. Mentre *C. zeylanoides* e *K. lactis* mostrano una crescita più rallentata, raggiungendo una concentrazione finale rispettivamente di 5.54 Log UFC/ml e 5.85 Log UFC/ml, che risulta essere inferiore di circa un ordine di grandezza per *C. zeylanoides* e 1.6 ordini di grandezza per *K. lactis*, rispetto alla prova antecedente. Questi dati evidenziano la dinamicità del prodotto.

Al termine delle 120 ore di fermentazione, si ottiene un risultato piuttosto differente rispetto alle 24 ore di fermentazione: gli unici ceppi di lievito che sembrano esser rimasti vitali sono *D. hansenii*, aumentando di 3.7 ordini di grandezza. Tuttavia, concluso lo stoccaggio, *K. lactis* e Mp50 vengono rilevati nuovamente, mentre non è presente traccia di *C. zeylanoides*. Questi risultati potrebbero esser correlati a degli errori sperimentali piuttosto che all'interazione negativa con il battere o tra lieviti, poiché si è notato un netto sopravvento di *D. hansenii* che non ha permesso il conteggio e la distinzione delle altre specie di lievito presenti a concentrazioni molto inferiori.



**Figura 27.** Cinetica di crescita del battere *L. casei Shirota* e del pool di lieviti in campioni con tempo di fermentazione 24 ore (a) e 120 ore (b).  
 $T_0$  = tempo zero (inoculo);  $T_{24ore}$  = tempo 24 ore;  $T_{120ore}$  = tempo 120 ore;  $T_{4S}$  = 4 settimane (fine stoccaggio).



#### 4.4.2 ANALISI CHIMICHE

Le Tabelle 20 (a) e 20 (b) mostrano i risultati delle analisi chimiche che sono state condotte al termine della fermentazione ( $T_{24\text{ore}} / T_{120\text{ore}}$ ) e al termine dello stoccaggio a  $4^{\circ}\text{C}$  ( $T_{4\text{settimane}}$ ). Per le tesi con 24 ore di fermentazione si ottengono, nel complesso, valori confrontabili alla prova precedente, con delle eccezioni:

- la percentuale di riduzione del DPPH, nel campione di controllo ( $C^+$ ) la percentuale di riduzione del DPPH è del 37.26% e si riduce notevolmente al termine dello stoccaggio, fino al 16.56%. Analogamente, nel pool di lieviti la percentuale di riduzione del DPPH a 24 ore di fermentazione è più elevata (39.49%) e si riduce dopo quattro settimane di stoccaggio (26.75%);
- la concentrazione degli zuccheri riducenti, nel pool di lieviti è pari a 20.86 g/l (24 ore) e 15.57 (4 settimane): in questo caso si nota un andamento di concentrazione decrescente piuttosto che un aumento come invece era stato rilevato della prova precedente;
- i polifenoli, nel pool di lieviti, al termine delle 24 ore di fermentazione hanno un valore di 0.89 g/l che poi si riduce considerevolmente a quattro settimane (0.43 g/l). In questo caso l'andamento del contenuto in polifenoli è esattamente contrario rispetto alla prova precedente.

Queste discrepanze nei dati ottenuti tra la prima e la seconda prova di fermentazione possono esser attribuite a caratteristiche intrinseche del prodotto stesso quali la forte dinamicità del prodotto che presenta microorganismi vivi in continua evoluzione.

Dalle analisi dei campioni con tempo di fermentazione prolungato (120 ore), si evidenzia una maggiore acidificazione al termine della fermentazione, rispetto alle 24 ore, con valori di pH di 4.36 nel controllo e 4.00 nel pool di lieviti. Dopo le quattro settimane di stoccaggio, il pH diminuisce, ma non in maniera significativa. Anche in questo caso, l'acidificazione è maggiore dove sono stati inoculati i lieviti, rispetto al solo battere, a conferma dei dati ottenuti con le prove precedenti.

I bassi valori di pH si riflettono in concentrazioni maggiori di acido lattico in entrambe le tesi sin dal termine della fermentazione, acidificazione che aumenta durante lo stoccaggio di pari passo con la diminuzione del pH. In particolar modo, al termine delle quattro settimane, il solo battere ed il pool raggiungono 1.00 e 2.09 g/l di acido lattico, rispettivamente.

Riguardo l'attività antiossidante, non ci sono sostanziali differenze se confrontati i dati ottenuti dopo 24 ore di fermentazione con quelli a 120 ore di fermentazione. Attività che risulta essere maggiore nel pool di lieviti rispetto al battere, come osservato anche precedentemente, anche se questa poi tende a diminuire al termine dello stoccaggio a 4°C.

In generale, gli zuccheri riducenti risultano minori a fine fermentazione (120 ore) rispetto a quelli rilevati a fine 24 ore di fermentazione. Mostrano un andamento decrescente nel corso delle settimane, riduzione che risulta più marcata nella prova pool rispetto al C<sup>+</sup>. Riguardo al contenuto in polifenoli, le tesi fermentate per 24 ore mostrano concentrazioni pressoché doppie rispetto a quelle fermentate 120 ore, senza differenze significative tra il pool di lieviti ed il controllo. Al termine delle 4 settimane di stoccaggio, la concentrazione di polifenoli è statisticamente inferiore nel C<sup>+</sup> rispetto al pool di lievito nei kefir fermentati 120 ore.

Fermentazione 24ore	pH		ACIDO LATTICO (g/l)		ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE (%)		ZUCCHERI RIDUCENTI (g/l)		POLIFENOLI (g/l)	
	T <sub>24ore</sub>	T <sub>4settimane</sub>	T <sub>24ore</sub>	T <sub>4settimane</sub>	T <sub>24ore</sub>	T <sub>4settimane</sub>	T <sub>24ore</sub>	T <sub>4settimane</sub>	T <sub>24ore</sub>	T <sub>4settimane</sub>
C <sup>+</sup>	6.59 ± 0.02 <sup>a</sup>	6.48 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.03 <sup>b</sup>	37.26 ± 1.35 <sup>a</sup>	16.56 ± 0.00 <sup>b</sup>	20.99 ± 0.89 <sup>a</sup>	19.96 ± 0.29 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.97 ± 0.00 <sup>a</sup>
SH + POOL	6.23 ± 0.06 <sup>b</sup>	4.25 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.19 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.90 ± 0.03 <sup>a</sup>	39.49 ± 0.90 <sup>a</sup>	26.75 ± 0.90 <sup>a</sup>	20.86 ± 0.67 <sup>a</sup>	15.57 ± 0.27 <sup>b</sup>	0.89 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.43 ± 0.05 <sup>b</sup>

**Tabella 20a.** Analisi chimiche dei campioni con tempo di fermentazione 24 ore.

T<sub>24ore</sub> = tempo 24 ore (fine fermentazione); T<sub>4S</sub> = 4 settimane (fine stoccaggio).

I dati sono riportati come valori medi ± deviazione standard. I valori che mostrano, in apice, lettere differenti all' interno di ciascuna colonna sono significativamente differenti (Duncan test;  $p < 0.05$ ).

Fermentazione 120ore	pH		ACIDO LATTICO (g/l)		ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE (%)		ZUCCHERI RIDUCENTI (g/l)		POLIFENOLI (g/l)	
	T <sub>120ore</sub>	T <sub>4settimane</sub>	T <sub>120ore</sub>	T <sub>4settimane</sub>	T <sub>120ore</sub>	T <sub>4settimane</sub>	T <sub>120ore</sub>	T <sub>4settimane</sub>	T <sub>120ore</sub>	T <sub>4settimane</sub>
C <sup>+</sup>	4.36 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.27 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.74 ± 0.00 <sup>b</sup>	1.00 ± 0.01 <sup>b</sup>	36.94 ± 3.60 <sup>a</sup>	39.17 ± 1.35 <sup>a</sup>	15.76 ± 0.34 <sup>b</sup>	11.85 ± 0.51 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.01 <sup>b</sup>
SH + POOL	4.00 ± 0.04 <sup>b</sup>	3.71 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.27 ± 0.01 <sup>a</sup>	2.09 ± 0.10 <sup>a</sup>	41.08 ± 6.76 <sup>a</sup>	34.71 ± 0.45 <sup>b</sup>	22.93 ± 1.28 <sup>a</sup>	11.30 ± 0.54 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.00 <sup>a</sup>

**Tabella 20b.** Analisi chimiche dei campioni con tempo di fermentazione 120 ore.

T<sub>120ore</sub> = tempo 120 ore (fine fermentazione); T<sub>4S</sub> = 4 settimane (fine stoccaggio).

I dati sono riportati come valori medi ± deviazione standard. I valori che mostrano, in apice, lettere differenti all' interno di ciascuna colonna sono significativamente differenti (Duncan test;  $p < 0.05$ ).

La Tabella 21 riporta i risultati ottenuti dall'analisi degli acidi grassi. Per le tesi di controllo e pool di lieviti con tempo di fermentazione 24 ore, non si notano differenze rispetto all'analisi precedente, l'unica discrepanza si riscontra per l'acido esadecenoico, assente nel campione con il solo battere (prova precedente) e presente in questa prova, seppur in basse quantità (0.00108 g/100g).

In generale, nella tesi con il pool di lieviti che ha fermentato per 120 ore, sono presenti gli stessi acidi grassi, seppur in concentrazioni lievemente inferiori. L'acido octadecadienoico (0.720 g/100g) e l'acido octadecenoico (0.285 g/100g) rimangono gli acidi grassi maggiormente rappresentati. Analogamente, nei rapporti acidi grassi polinsaturi/acidi grassi monoinsaturi e acidi grassi polinsaturi/acidi grassi saturi, non si riscontrano differenze statisticamente significative con il pool di lieviti che ha fermentato per 24 ore.

<b>ACIDI GRASSI T4settimane (g/100g)</b>			
	<b><i>C+ (ferm. 24ore)</i></b>	<b><i>SH + POOL (ferm. 24ore)</i></b>	<b><i>SH + POOL (ferm. 120ore)</i></b>
Acido miristico (14:0)	0,00134 ± 0,00070	0,00191 ± 0,00075	0,00144 ± 0,00071
Acido palmitico (16:0)	0,170 ± 0,036	0,221 ± 0,044	0,158 ± 0,033
Acido esadecenoico (16:1)	0,00108 ± 0,00068	0,00163 ± 0,00072	0,00111 ± 0,00068
Acido margarico (17:0)	0,00152 ± 0,00071	0,00199 ± 0,00076	0,00127 ± 0,00069
Acido stearico (18:0)	0,068 ± 0,015	0,088 ± 0,019	0,063 ± 0,014
Acido Octadecenoico (18:1)	0,306 ± 0,049	0,395 ± 0,057	0,285 ± 0,048
Acido Octadecadienoico (18:2)	0,768 ± 0,0936	1,00 ± 0,12	0,720 ± 0,091
Acido Arachidico (20:0)	0,0057 ± 0,0014	0,0070 ± 0,0016	0,0052 ± 0,0013
Acido octadecatrienoico (18:3)	0,116 ± 0,025	0,155 ± 0,033	0,112 ± 0,024
Acido eicosenoico (20:1)	0,00208 ± 0,00077	0,00270 ± 0,00085	0,00197 ± 0,00076
Acido beenico (22:0)	0,0060 ± 0,0014	0,0079 ± 0,0018	0,0058 ± 0,0014
Acido lignocetrico (24:0)	0,00158 ± 0,00072	0,00207 ± 0,00077	0,00141 ± 0,00070
Acidi grassi saturi	0,254 ± 0,039 <sup>a</sup>	0,330 ± 0,048 <sup>a</sup>	0,236 ± 0,036 <sup>a</sup>
Acidi grassi monoinsaturi	0,309 ± 0,049 <sup>b</sup>	0,399 ± 0,057 <sup>a</sup>	0,288 ± 0,048 <sup>c</sup>
Acidi grassi polinsaturi	0,884 ± 0,099 <sup>b</sup>	1,16 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,832 ± 0,094 <sup>c</sup>
Rapporto acidi grassi polinsaturi / acidi grassi monoinsaturi	2,86 ± 0,56 <sup>b</sup>	2,91 ± 0,53 <sup>a</sup>	2,89 ± 0,58 <sup>a</sup>
Rapporto acidi grassi polinsaturi / acidi grassi saturi	3,48 ± 0,66 <sup>b</sup>	3,52 ± 0,65 <sup>a</sup>	3,52 ± 0,65 <sup>a</sup>

**Tabella 21.** Determinazione degli acidi grassi polinsaturi: campioni con differenti tempi di fermentazione.

I dati sono riportati come valori medi ± deviazione standard. Solamente la somma degli acidi grassi saturi, monoinsaturi, polinsaturi e i loro rapporti sono stati sottoposti ad analisi statistica: i valori che mostrano, in apice, lettere differenti all'interno di ciascuna riga sono significativamente differenti (Duncan test;  $p < 0.05$ ).

In conclusione, dalle analisi chimiche, emerge che le tesi che hanno fermentato per maggior tempo presentano valori più bassi di pH e maggiori di acido lattico, un'attività antiossidante più spiccata ma un minor contenuto di zuccheri riducenti e polifenoli.

#### *4.4.3 PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE*

I prodotti secondari di fermentazione sono stati determinati unicamente al termine dello stoccaggio ( $T_{4\text{settimane}}$ ) e sono riportati nella Tabella 22.

In riferimento ai campioni che hanno fermentato per 24 ore, viene confermata la presenza di acetaldeide (aroma di mela verde, erba tagliata) e isobutanolo (nota alcolica, solvente) solamente nelle tesi con il pool di lieviti, seppur le concentrazioni sono differenti: 9.80 mg/l di acetaldeide (rispetto a 48.27 mg/l della prova precedente) e 10.20 mg/l di isobutanolo (rispetto a 7.28 mg/l). L'alcol amilico risulta assente in questa prova ma presente in quella precedente. Anche in questo caso l'etilacetato (aroma di ananas) è ampiamente rappresentato, raggiungendo una concentrazione di 128.74 mg/l, tuttavia l'n-propanolo (alcol, nota di durezza) emerge come composto maggiormente presente con una concentrazione di 783.27 mg/l (rispetto a 17.38 mg/l della prova precedente).

I campioni con fermentazione di 120 ore mantengono l'elevata concentrazione di etilacetato (53.02 mg/l nel controllo e 1109.32 mg/l nel pool), aumenta la concentrazione dell'acetaldeide nel pool (49.27 mg/l) mentre diminuisce quella dell'n-propanolo sempre nel pool (12.66 mg/l).

La tesi con il pool di lieviti in co-coltura con il battere, anche modulando il tempo di fermentazione, emerge come campione più complesso dal punto di vista dei principali sottoprodotti di fermentazione, con concentrazioni molto elevate di alcuni prodotti secondari.

PRINCIPALI PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE							
Fermentazione 24ore	T <sub>4settimane</sub>						
CAMPIONI	ACETALDEIDE	ETILACETATO	n-PROPANOLO	ISOBUTANOLO	ALCOLAMILICO	ALCOL ISOAMILICO	ACETOINO
C <sup>+</sup> (24ore)	nd*	12.11 ± 0.08 <sup>b</sup>	24.04 ± 0.77 <sup>b</sup>	nd	nd	3.03 ± 0.09 <sup>a</sup>	nd
SH + POOL (24ore)	9.80 ± 0.17	128.74 ± 44.91 <sup>a</sup>	783.27 ± 82.81 <sup>a</sup>	10.20 ± 2.14	16.17 ± 5.66	3.05 ± 0.08 <sup>a</sup>	nd

PRINCIPALI PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE							
Fermentazione 120ore	T <sub>4settimane</sub>						
CAMPIONI	ACETALDEIDE	ETILACETATO	n-PROPANOLO	ISOBUTANOLO	ALCOLAMILICO	ALCOL ISOAMILICO	ACETOINO
C <sup>+</sup> (120ore)	nd	53.02 ± 0.87 <sup>b</sup>	17.91 ± 3.80 <sup>a</sup>	nd	nd	2.90 ± 0.18 <sup>b</sup>	nd
SH + POOL (120ore)	49.27 ± 0.14	1109.32 ± 117.79 <sup>a</sup>	12.66 ± 1.36 <sup>a</sup>	9.65 ± 0.73	10.71 ± 0.70	4.55 ± 0.35 <sup>a</sup>	nd

\*nd = non determinato

**Tabella 22.** Principali prodotti secondari di fermentazione nel kefir di soia: campioni con differenti tempi di fermentazione; i dati sono espressi in ppm (mg/l) e riportati come valori medi ± deviazione standard. I valori che mostrano, in apice, lettere differenti all'interno di ciascuna colonna sono significativamente differenti (Duncan test;  $p < 0.05$ ).

#### 4.4.4 ANALISI SENSORIALE

L'analisi sensoriale, riportata in Figura 28, è stata condotta al termine dello stoccaggio a 4°C ( $T_{4\text{settimane}}$ ).

La tesi con il pool di lieviti 24 ore di fermentazione risulta più acida, viscosa e con una maggior nota di frizzantezza, rispetto al controllo, mantenendo comunque la maggiore gradevolezza generale.

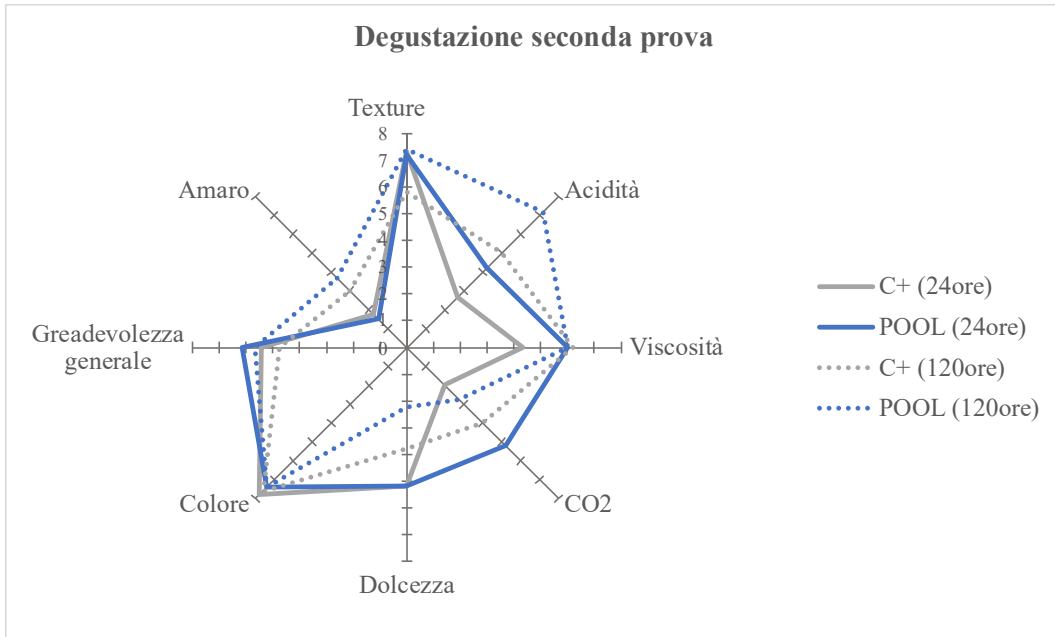
Al contrario i campioni che sono stati sottoposti a 120 ore di fermentazione, rispetto alle tesi con 24 ore di fermentazione, si mostrano più amari e acidi (soprattutto il pool) e meno dolci.

La frizzantezza, espressa in termini di CO<sub>2</sub> prodotta, è maggiore nel controllo e minore nel pool, in confronto alla prova precedente.

L'analisi del profilo organolettico è coerente con i risultati ottenuti nelle analisi chimiche: infatti i campioni che hanno fermentato 120 ore presentano pH acidi, alte concentrazioni di acido lattico e basse concentrazioni di zuccheri riducenti che si riflettono nella maggiore acidità e minore dolcezza.

La texture ha ottenuto un punteggio più elevato nel pool piuttosto che nel controllo, mentre la viscosità è analoga; il punteggio relativo al colore rimane elevato in tutti i campioni.

Per ultimo, la gradevolezza generale si riduce nei campioni con 120 ore di fermentazione rispetto alle 24 ore, probabilmente a causa della maggiore acidità, maggiore percezione amara e minore dolcezza.



**Figura 28.** Analisi sensoriale dei kefir di soia dopo 24 ore e 120 ore di fermentazione.



## CAPITOLO 5

### CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di tesi è stato prodotto, su scala di laboratorio, kefir di soia basandosi sul metodo industriale, e ne è stata analizzata la cinetica microbica, le caratteristiche chimico-fisiche, i principali sottoprodotti di fermentazione e la componente de gustativa, dalla fase fermentativa fino al termine della *shelf-life*. Si sono impiegati cinque ceppi di lievito “non convenzionali” di tipo non-*Saccharomyces* in co-coltura con il battere commerciale *L. casei Shirota*. L’obiettivo era ottenere un consorzio microbico ideale, da poter utilizzare come starter di fermentazione.

Tutti i ceppi di lievito utilizzati, ad eccezione di *Metschnikowia* spp. (Mp50), sono stati precedentemente testati per verificare la loro attitudine probiotica (Agarbaty et al., 2020).

L’attitudine probiotica di Mp50 è stata valutata nel presente lavoro di tesi ed impiegata nella produzione di kefir di soia per il suo potenziale tecnologico, dovuto alla produzione di acidi grassi polinsaturi (Canonica et al., 2016) e all’attività antimicrobica contro due importanti patogeni umani (come descritto nel paragrafo 4.1). I meccanismi alla base dell’azione antagonista non sono associati alla produzione di composti tossici, Mp50 può dunque essere utilizzato come agente bioprotettivo per frenare l’invasione da parte di microrganismi patogeni e putrefattivi (saprofiti) e/o additivi nelle tecnologie alimentari (Sipiczki, 2020).

Dalle analisi microbiologiche dei campioni che hanno fermentato a 25°C per 24 ore e successivamente stoccati a 4°C per quattro settimane, è emerso che tutti i microrganismi sono cresciuti e hanno mantenuto la loro vitalità fino al termine dello stoccaggio, coesistendo senza instaurare interazioni negative reciproche. Nello specifico, il battere *L. casei Shirota*

durante la fermentazione ha mostrato un incremento di circa un ordine di grandezza, per poi mantenersi invariato fino al termine dello stoccaggio. Mentre la cinetica del pool di lieviti è ceppo-specifica, tutti i ceppi durante lo stoccaggio sono numericamente aumentati, raggiungendo valori di circa  $5 \times 10^9$  cellule vive/125 g di kefir, corrispondente alla quantità media di un vasetto di yogurt.

La cinetica di crescita risulta differente se viene prolungato il tempo di fermentazione fino a 120 ore, in particolar modo per i lieviti: infatti, al termine dello stoccaggio non si è rilevata la presenza di *C. zeylanoides* e le concentrazioni finali degli altri ceppi di lievito risultano inferiori.

Le analisi chimiche denotano un interessante contributo dei lieviti (rispetto al campione di controllo in cui è stato inoculato unicamente il battere) sulle caratteristiche del kefir. I campioni mostrano, infatti, una maggiore concentrazione di acido lattico, acido acetico, zuccheri riducenti e una maggiore attività antiossidante.

In particolar modo il pool di lieviti, in confronto alle tesi in coltura singola, evidenzia una maggiore produzione di acido lattico, acido acetico e polifenoli.

Analogamente, le tesi con il pool di lieviti hanno mostrato maggiore complessità aromatica, con elevate concentrazioni di acetaldeide, etilacetato e n-propanolo; in aggiunta hanno ottenuto ottimi punteggi dall'analisi sensoriale, confermando l'ipotesi che la fermentazione, condotta in particolare modo dal pool di lieviti, migliori il profilo organolettico della bevanda di soia.

Il kefir di soia potrebbe dunque ben adattarsi al palato della popolazione occidentale, grazie al suo gusto molto gradevole.

Riguardo la presenza degli acidi grassi, non sono state riscontrate molte differenze, sia tra le tesi che rispetto alla matrice di partenza; da evidenziare la presenza dell'acido grasso

esadecenoico nel solo campione con il pool di lieviti. Nonostante i risultati ottenuti, la capacità di produrre acidi grassi polinsaturi, specialmente da parte di lieviti appartenenti al genere *Metschnikowia*, è stata riportata da numerosi studi (Canonica et al., 2016): risulta quindi necessario ottimizzarne la produzione da parte dei lieviti; un possibile approccio sperimentale potrebbe consistere nel pre-adattare i ceppi nella matrice soia prima dell'inoculo.

Nel complesso, dalle analisi chimiche, sensoriali e dei prodotti secondari, è emerso che la fermentazione in colture miste possiede un alto potenziale per migliorare le proprietà nutrizionali, funzionali e il profilo sensoriale della bevanda di soia.

Questi risultati sembrano incoraggianti e superano le criticità attribuite al kefir industriale, considerato di qualità inferiore poiché vengono inoculati pochi ceppi microbici che non simulano la complessità delle interazioni del kefir tradizionale (Leite et al., 2013).

Nonostante i risultati incoraggianti del presente studio, rimane comunque complicato raggiungere la standardizzazione del processo, tenendo presente la complessità delle interazioni microbiche interne al microbiota del kefir (Farag et al., 2020) e le numerose variabili che influenzano il risultato finale, quali: ceppi impiegati, vitalità dei microrganismi, concentrazione di inoculo, tempo e temperatura di fermentazione, condizioni di stoccaggio, matrice di partenza (bevande di soia differenti possono avere una differente composizione nutrizionale).

Sono quindi necessari studi più approfonditi sui processi molecolari e fisiologici sottostanti la fermentazione mista, al fine di ottimizzare il processo di produzione e prevedere la loro influenza sul prodotto finito (Tangyu et al., 2019).

In aggiunta al profilo organolettico, standardizzare la fermentazione è funzionale anche per definire le proprietà terapeutiche del kefir. Gli effetti benefici vanno dalla stimolazione del

sistema immunitario, all'impatto sul sistema gastrointestinale, effetto ipocolesterolemico, azione anticancerogena e all'azione antinfiammatoria e antimicrobica.

La funzionalità del kefir è attribuita soprattutto alla relazione simbiotica tra lieviti e batteri, necessaria per produrre composti bioattivi. Tuttavia, la maggior parte degli studi che hanno dimostrato l'azione positiva sulla salute dell'uomo sono basati su saggi biochimici o di laboratorio, e devono essere comprovati da studi sugli animali e sugli esseri umani per essere più conclusivi.

Il monitoraggio dei cambiamenti nel microbiota intestinale umano, dopo aver consumato il kefir per un periodo continuativo e nelle dosi opportune, può fornire una migliore comprensione dei suoi numerosi benefici per la salute (Farag et al., 2020; Leite et al., 2013).

Un ulteriore sviluppo futuro del presente lavoro potrebbe essere centrato sulla fermentazione di nuove tipologie di bevande vegetali: infatti, il mercato delle alternative di latte a base vegetale è in rapido aumento (Tangyu et al., 2019), di pari passo con l'espansione dell'applicazione dei probiotici nell'industria alimentare (Leite et al., 2013).

Alcuni esempi sono: il latte di riso (ricco di fitosteroli), il latte di avena (che contiene  $\beta$ -glucani), il latte di mandorla (ricco di  $\alpha$ -tocoferolo e arabinosio) o il latte di cocco contenente acido laurico e vitamina E (Sethi et al., 2016).

In conclusione, i risultati ottenuti su scala di laboratorio incoraggiano l'utilizzo del consorzio microbico proposto, contenente cinque ceppi di lievito di tipo non-*Saccharomyces* (*C. zeylanoides*, due ceppi di *D. hansenii*, *K. lactis* e *Metschnikowia* spp.) e un battere lattico (*L. casei* Shirota) per la produzione di kefir su scala industriale e quindi ripetibile.

Infatti, si tratta di un prodotto altamente funzionale dovuto alla presenza di microrganismi probiotici, da poter essere considerato equivalente al kefir tradizionale, con maggiore

biodisponibilità, funzionalità e con un profilo organolettico gradevole che amplierebbe la gamma di alimenti funzionali e superfood proposti attualmente sul mercato.

## CAPITOLO 6

### RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Agarbati, A., Canonico, L., Marini, E., Zannini, E., Ciani, M., Comitini, F. (2020). Potential probiotic yeasts sourced from natural environmental and spontaneous processed foods. *Foods*, 9(3):287. doi:10.3390/foods9030287.
- Agarbati, A., Marini, E., Galli, E., Canonico, L., Ciani, M., Comitini, F. (2020). Characterization of wild yeasts isolated from artisan dairies in the Marche region, Italy, for selection of promising functional starters. *LWT*, 110531.
- Arslan, S. (2015). A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. *CyTA - Journal of Food*, 13:3, 340-345.  
doi: 10.1080/19476337.2014.981588.
- Canonico, L., Ashoor, S., Taccari, M., Comitini, F., Antonucci, M., Truzzi, C., Scarponi, G., Ciani, M. (2016). Conversion of raw glycerol to microbial lipids by new *Metschnikowia* and *Yarrowia lipolytica* strains. *Ann Microbiol* 66, 1409–1418.  
doi:10.1007/s13213-016-1228-0.
- Chen, L.-S., Ma, Y., Maubois, J.-L., Chen, L.-J., Liu, Q.-H., Guo, J.-P. (2010). Identification of yeasts from raw milk and selection for some specific antioxidant properties. *International Journal of Dairy Technology*, 63(1), 47–54.  
doi:10.1111/j.1471-0307.2009.00548.x.
- Cozzani, I., Dainese, E. (2006). *Biochimica degli alimenti e della nutrizione*. Piccin. EAN: 9788829918256.
- Da Silva, C.F.G., Santos, F.L., De Santana, L.R.R., Silva, M.V.L., Conceição, T.D.A. (2018). Development and characterization of a soymilk Kefir-based

- functional beverage. *Food Science and Technology*, 38(3), 543–550.  
doi:10.1590/1678-457x.10617.
- Dehò, G., Galli E. (2014). *Biologia dei Microrganismi*. Casa Editrice Ambrosiana. ISBN: 8808186865.
  - Dertli, E., Çon, A.H. (2017). Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. *LWT - Food Science and Technology*, 85, 151-157.  
doi:10.1016/j.lwt.2017.07.017.
  - Diplock, A.T. et al. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus Document. *British Journal of Nutrition*, 81(1):1-27.  
doi:10.1017/S0007114599000471.
  - Farag, M.A., Jomaa, S.A., El-Wahed, A.A., El-Seedi, A.HR. (2020). The many faces of Kefir fermented dairy products: quality characteristics, flavour chemistry, nutritional value, health benefits, and safety. *Nutrients*, 28;12(2):346.  
doi:10.3390/nu12020346.
  - Farris, G.A., Gobbetti, M., Neviani, E., Vincenzini, M. (2012). *Microbiologia dei prodotti alimentari*. Casa Editrice Ambrosiana. ISBN: 9788808182463.
  - Frigolet, M. E., Gutiérrez-Aguilar, R. (2017). The role of the novel lipokine palmitoleic acid in health and disease. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 8(1), 173S–181S. doi:10.3945/an.115.011130.
  - Gibson, G. R. (1999). Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *The Journal of Nutrition*, 129(7), 1438S–1441S.  
doi:10.1093/jn/129.7.1438s.

- Gil-Rodríguez, A.M., Carrascosa, A.V., Requena, T. (2015). Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. *Food Science and Technology*, Volume 64, Issue 2, Pages 1156-1162. doi:10.1016/j.lwt.2015.07.042.
- Gobbetti, M., Corsetti, A. (2010). *Biotechnologia dei prodotti lievitati da forno*. Casa Editrice Ambrosiana. EAN: 9788808181213.
- Gut, A.M., Vasiljevic, T., Yeager, T., Donkor, O. (2019). Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties. *Journal of Functional Foods*, 58. pp. 56-66. doi:10.1016/j.jff.2019.04.046.
- Jain, A., Jain, R., Jain, S. (2020). Quantitative analysis of reducing sugars by 3, 5-Dinitrosalicylic Acid (DNSA Method). In: *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology*. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY. doi:10.1007/978-1-4939-9861-6\_43.
- Karaçali, R., Özdemir, N., H Çon, A. (2018). Aromatic and functional aspects of kefir produced using soya milk and *Bifidobacterium* species. *International Journal of Dairy Technology*. doi:10.1111/1471-0307.12537.
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutrition*, 481651. doi:10.5402/2013/481651.
- Leite, A.M. de O., Miguel, M.A. L., Peixoto, R.S., Rosado, A.S., Silva, J.T., Paschoalin, V.M.F. (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 341–349. doi:10.1590/s1517-83822013000200001.
- Lunn, J. (2006). Superfoods. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*, 31, 171–172. doi:10.1111/j.1467-3010.2006.00578.x.



- Merten, C., Schoonjans, R., Di Gioia, D., Peláez, C., Sanz, Y., Maurici, D., Robinson, T. (2020). Editorial: Exploring the need to include microbiomes into EFSA's scientific assessments. *EFSA Journal*, 18(6).  
doi:10.2903/j.efsa.2020.e18061.
- Oro, L., Ciani, M., Comitini, F. (2014). Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 116(5), 1209–1217.  
doi:10.1111/jam.12446.
- Proestos, C. (2018). Superfoods: recent data on their role in the prevention of diseases. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 6, 576-593.  
doi:10.12944/CRNFSJ.6.3.02.
- Rizzo, G., Baroni, L. (2018). Soy, soy foods and their role in vegetarian diets. *Nutrients*, 10, 43. doi: 10.3390/nu10010043.
- Sethi, S., Tyagi, S.K., Anurag, R.K. (2016). Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 3408–3423. doi:10.1007/s13197-016-2328-3.
- Sipiczki, M. (2020). *Metschnikowia pulcherrima* and related pulcherrimin-producing yeasts: fuzzy species boundaries and complex antimicrobial antagonism. *Microorganisms*, 8(7), 1029. doi:10.3390/microorganisms8071029.
- Tacer-Caba, Z. (2019). The concept of superfoods in diet. *The Role of Alternative and Innovative Food Ingredients and Products in Consumer Wellness*, 73–101.  
doi:10.1016/b978-0-12-816453-2.00003-6.
- Tangyu, M., Muller, J., Bolten, C.J., Wittmann, C. (2019). Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(23-24):9263-9275. doi: 10.1007/s00253-019-10175-9.

- Tur, J.A., Bibiloni, M.M. (2016). Functional Foods. Encyclopedia of Food and Health, 157–161. doi:10.1016/b978-0-12-384947-2.00340-8.
- Ubaldi, E., Callegari, M.L. (2019). I probiotici nella pratica clinica: proprietà, caratteristiche e prove di efficacia del *Lactobacillus casei Shirota*. Rivista Società Italiana di Medicina Generale n. 4, vol.26.
- Wang, Y.-C., Yu, R. C., Yang, H.-Y., Chou, C.-C. (2003). Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobacteria. Food Microbiology, 20, 333-338.  
doi:10.1016/S0740-0020(02)00125-9.
- Zhu, Y.-Y., Thakur, K., Feng, J.-Y., Cai, J.-S., Zhang, J.-G., Hu, F., Wei, Z.-J. (2020). B-vitamin enriched fermented soymilk: A novel strategy for soy-based functional foods development. Trends in Food Science & Technology, Volume 105, Pages 43-55. doi:10.1016/j.tifs.2020.08.019.

## SITOGRAFIA

- <https://www.alimentinutrizione.it/tabelle-nutrizionali/509010>
- <https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/salmonella>
- <http://www.fao.org/faostat/en/#home>
- <https://www.fishersci.it>
- <https://www.humanitas.it/enciclopedia/integratori-alimentari/isoflavoni/>
- <https://www.humanitasalute.it/alimentazione/93511-i-benefici-della-soia/>
- <https://www.humanitas-care.it/enciclopedia/integratori-alimentari/acido-linoleico/>
- <https://www.humanitas.it/enciclopedia/integratori-alimentari/acido-oleico/>
- <https://ilfattoalimentare.it/kefir-segreti-spisni.html>
- [http://www.liofilchem.net/login/pd/ifu/163712\\_IFU.pdf](http://www.liofilchem.net/login/pd/ifu/163712_IFU.pdf)
- [http://www.liofilchem.net/login/pd/ts/620024\\_TS.pdf](http://www.liofilchem.net/login/pd/ts/620024_TS.pdf)
- <https://royalsociety.org/topics-policy/projects/gm-plants/what-gm-crops-are-currently-being-grown-and-where/>
- [https://www.salute.gov.it/portale/temi/p2\\_6.jsp?lingua=italiano&id=1426&area=Alimenti%20particolari%20e%20integratori&menu=integratori](https://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=1426&area=Alimenti%20particolari%20e%20integratori&menu=integratori)
- [https://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_1016\\_allegato.pdf](https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1016_allegato.pdf)
- <https://yakult.it>