



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE**  
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale in**  
**BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA**  
**curriculum in TECNOLOGIE BIOLOGICHE**

**KEFIR DI SOIA FERMENTATO DALL'IMPIEGO DI UN CONSORZIO DI LIEVITI NATIVI E  
*LACTOBACILLUS CASEI SHIROTA*: DINAMISMO MICROBIOLOGICO E CHIMICO FISICO A  
DIVERSI TEMPI DI FERMENTAZIONE.**

**SOY KEFIR FERMENTED USING A CONSORTIUM OF NATIVE YEASTS AND  
*LACTOBACILLUS CASEI SHIROTA*: MICROBIOLOGICAL AND CHEMICAL PHYSICAL  
DYNAMISM AT DIFFERENT FERMENTATION TIMES.**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Giulia Chicarella

Relatore:

Prof.essa Francesca Comitini

Sessione autunnale

Anno accademico 2020-2021

*Alla mia famiglia,*  
*“Pensi di avere un limite,*  
*così provi a toccare questo limite.*  
*Accade qualcosa.*  
*E immediatamente riesci a correre un po' più forte,*  
*grazie al potere della tua mente,*  
*alla tua determinazione,*  
*al tuo istinto e grazie all'esperienza.*  
*Puoi volare molto più in alto”*  
*(Ayrton Senna)*

# INDICE

<b>CAPITOLO 1-INTRODUZIONE .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1-KEFIR: ORIGINE E CARATTERISTICHE.....</b>	<b>6</b>
1.1.1-GRANULI DI KEFIR .....	6
1.1.2-PRODUZIONE DEL KEFIR .....	8
1.1.4-INTERAZIONE TRA LIEVITI E BATTERI NEL KEFIR.....	8
1.1.5-PROPRIETA' TERAPUETICHE DEL KEFIR.....	9
<b>1.2-BEVANDE VEGETALI: LA SOIA.....</b>	<b>11</b>
1.2.1-PREPARAZIONE .....	12
1.2.3-BENEFICI DELLA BEVANDA DI SOIA.....	12
<b>1.3-INTOLLERANZE ALIMENTARI .....</b>	<b>14</b>
<b>1.4-I MICROORGANISMI PROBIOTICI.....</b>	<b>16</b>
1.4.1-MICROBIOTA INTESTINALE.....	17
1.4.2-BATTERI LATTICI E LIEVITI COME PROBIOTICI .....	19
1.4.3-LIEVITI COME PROBIOTICI.....	20
<b>1.5-ALIMENTI PER IL BENESSERE DELL'INDIVIDUO .....</b>	<b>21</b>
<b>CAPITOLO 2-SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>22</b>
<b>CAPITOLO 3-MATERIALI E METODI .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 CEPPI DI LIEVITO E BATTERE USATI.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 ALLESTIMENTO DELLE PROVE DI FERMENTAZIONE .....</b>	<b>25</b>
3.2.1 MATRICE DI FERMENTAZIONE UTILIZZATA .....	25
3.2.2 ALLESTIMENTO DELLE PRE-COLTURE E PREPARAZIONE DELLA BIOMASSA .....	26
3.2.3 ALLESTIMENTO DELLA PROVA DI FERMENTAZIONE.....	28
3.3.1 TERRENI DI COLTURA .....	29
3.3.2 CONTE VITALI.....	31
<b>3.4 ANALISI CHIMICHE .....</b>	<b>33</b>
3.4.1 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE DEL KEFIR DI SOIA.....	33
3.4.2 DETERMINAZIONE DELL'ACIDO LATTICO DEL FERMENTATO.....	34
3.4.3 DETERMINAZIONE DEL PH.....	36

3.4.4 DETERMINAZIONE POLIFENOLI.....	37
3.4.5 DETERMINAZIONE DEGLI ZUCCHERI RIDUCENTI .....	39
3.4.6 DETERMINAZIONE DELL'ACIDO ACETICO .....	40
3.4.7 DETERMINAZIONE DEI PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE .....	42
3.4.8 DETERMINAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI POLINSATURI .....	42
<b>3.5 ANALISI SENSORIALE.....</b>	<b>43</b>
<b>3.6 ANALISI STATISTICA .....</b>	<b>43</b>
<b>CAPITOLO 4-RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>43</b>
4.1 VALUTAZIONE DELLA CINETICA FERMENTATIVA .....	44
4.2 ANALISI CHIMICHE .....	48
4.3 ANALISI DEGLI ACIDI GRASSI.....	52
4.4-PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE.....	49
4.5 ANALISI SENSORIALE.....	58
<b>CAPITOLO 5- CONCLUSIONI.....</b>	<b>54</b>
<b>CAPITOLO 6- RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....</b>	<b>56</b>

## CAPITOLO 1-INTRODUZIONE

Il concetto che gli alimenti fermentati abbiano degli effetti benefici sulla salute dell'uomo risale al 1908 grazie agli studi di scienziati e medici, i quali scoprirono ad esempio che il consumo di prodotti caseari fermentati potevano influire sul benessere intestinale e sulla salute dell'individuo. Da più di cento anni infatti molti popoli consumano alimenti fermentati come lo yogurt, il koumis e il kefir.

La parola "kefir" deriva dal turco "keyif" che significa "**sensazione positiva**" e si tratta di una bevanda fermentata originaria delle regioni montuose caucasiche dal sapore acidulo, leggermente alcolico e frizzante. Viene preparato tradizionalmente con latte di mucca, ma può essere fatto anche con latte di capra o di pecora oppure con "latte vegetale".

Come è noto il kefir si ricava dalla fermentazione di alcune bevande (come il latte), in questo processo si può notare la formazione dei granuli. I grani del kefir, meglio definiti come kefiran sono delle matrici polisaccaridiche, con in parte la presenza di proteine, di colore variabili che va dal bianco a un giallo pallido, all'interno dei quali sono presenti un gran numero di batteri e lieviti che riescono a fermentare le varie matrici. Il kefir, a differenza dello yogurt che contiene due specie batteriche quali *Lactobacillus delbrueckii* e lo *Streptococcus thermophilus*, contiene decine di altri microrganismi come batteri e lieviti che convivono in simbiosi.

In questo studio è stato preparato un kefir a base di soia con lo scopo di ottenere un prodotto in grado di coniugare i benefici del kefir con la sempre più alta richiesta di consumo di bevande vegetali.

## 1.1-KEFIR: ORIGINE E CARATTERISTICHE

Il kefir presenta molte proprietà che possono portare dei benefici alla salute umana. La bevanda kefir è originaria delle montagne del Caucaso, ad oggi è un prodotto tradizionale molto consumato in Europa orientale, Russia e Asia sud-occidentale. Attualmente, è stato segnalato un aumento del consumo di kefir in molti paesi, grazie alle sue proprietà sensoriali uniche e alla lunga storia associata ad effetti benefici sulla salute umana. Il kefir si caratterizza per il suo sapore distinto e un effetto effervescente che si avverte in bocca ( Lopitz-Otsoa *et al.* , 2006 ). Il kefir presenta inoltre diversi prodotti dati dalla fermentazione come acido lattico, l'acido acetico, l'etanolo e l'anidride carbonica che conferiscono alla bevanda delle peculiari caratteristiche quali per esempio viscosità, acidità e una bassa gradazione alcolica. La particolarità di questa bevanda quindi risiede proprio nel fatto che tutti questi metaboliti derivano da attività metaboliche date da molte specie microbiche che convivono in simbiosi e possono conferire queste particolari caratteristiche e proprietà a una bevanda che sta entrando sempre più nel mondo commerciali del consumo alimentare.

### 1.1.1-GRANULI DI KEFIR

Uno degli aspetti peculiari del kefir è la presenza dei cosiddetti granuli di kefir che svolgono un ruolo cruciale nel processo fermentativo. Questi grani sono composti da microrganismi immobilizzati su una matrice polisaccaridica e proteica, dove coesistono diverse specie di batteri e lieviti in associazione simbiotica ( Farnworth e Mainville, 2008 ; Garrote *et al.* , 2010 ). In questo ecosistema c'è una popolazione di microrganismi relativamente stabile, che interagisce e influenza altri membri della comunità. Questa popolazione fornisce la sintesi di metaboliti bioattivi, essenziali per la crescita del grano e l'inibizione dei microrganismi, come agenti patogeni e contaminanti alimentari ( Garrote *et al.* 2010 ). I granuli presentano diverse dimensioni di diverso diametro che può variare da qualche millimetro fino ad arrivare anche a 3,0 cm (Fig 1). Se si osserva la figura si può notare una superficie non del tutto regolare, quasi "spugnosa", il colore di questi vari da un bianco opaco a un giallo molto chiaro. Al tatto risultano viscosi e compatti.



**Figura 1-** Aspetto dei granuli di kefir, diametro e grandezza  
(<https://it.wikipedia.org/wiki/Kefir#/media/File:Kefirpilze.jpg> )

Nel kefir sono presenti specie di batteri lattici che hanno il ruolo di convertire il lattosio presente nel latte in acido lattico che si traduce in una diminuzione del pH. Inoltre sono presenti altri metaboliti di fermentazione come etanolo, questo prodotto deriva dalla fermentazione alcolica dei lieviti e anidride carbonica che conferirà un gusto più acido e una leggera frizzantezza della nostra bevanda. Oltre ai batteri, nel kefir sono presenti anche specie di lievito che partecipano alla fermentazione del prodotto, questi saranno utili per garantire un prodotto che potrà essere di buona qualità e che avrà determinate proprietà benefiche per la salute dell'individuo che lo consuma. Con il progredire della fermentazione la bevanda diventa sempre più viscosa e i grani aumentano di circa il 5-7% in biomassa. Durante la loro crescita le proporzioni dei microrganismi nei grani differiscono da quelle presenti all'inizio della fermentazione e che poi si ritroveranno nel prodotto finale ( Rattray e O'Connell, 2011). Questa differenza è associata alle condizioni del processo di fermentazione come il tempo di fermentazione, la temperatura, il grado di agitazione, il tipo di latte, il rapporto di inoculo grani/latte e la composizione della popolazione microbica nei grani.

### 1.1.2-PRODUZIONE DEL KEFIR

Esistono tre modi principali per produrre kefir (I) il processo artigianale, (II) il processo commerciale con il metodo russo e (III) il processo commerciale utilizzando colture pure ( Farnworth, 2005 ; Otles e Cagindi, 2003 ; Rattray e O' Connel, 2011 ). Possono essere utilizzati anche altri substrati, come latte di altre specie animali, latte di cocco, bevande di soia, succhi di frutta e/o soluzioni di zucchero e melassa ( Magalhães *et al.* , 2010a ; Öner *et al.* , 2010 ; Rattray e O'Connel , 2011 ).

La produzione artigianale tradizionale prevede l'inoculo del latte con una quantità variabile di grani e la fermentazione per un periodo compreso tra 18-24 h a 20-25 °C. Al termine del processo di fermentazione i grani vengono setacciati e separati dal fermentato, essi possono essere utilizzati per una nuova fermentazione o conservati (1-7 giorni) nel latte fresco, mentre la bevanda kefir viene conservata a 4 °C, pronta per il consumo (Beshkova *et al.* , 2002). La concentrazione iniziale dell'inoculo dei grani (proporzione grani/latte) influenza il pH, la viscosità, la concentrazione finale di lattosio e il profilo microbiologico del prodotto finale.

Il terzo metodo prevede l'uso di colture starter, tipicamente usate in ambito industriale. La bevanda viene inoculata con diverse colture pure isolate dai grani del kefir e da colture commerciali.

Il kefir durante la fase di maturazione deve essere mantenuto ad una temperatura di almeno 4 gradi per consentire la crescita di microorganismi in particolar modo dei lieviti che contribuiranno a conferire le tipiche caratteristiche alla bevanda come il suo sapore tipico. Durante la fase di stoccaggio vi sarà una maggiore produzione di anidride carbonica da parte dei lieviti che conferirà un retrogusto “frizzante” al prodotto.

### 1.1.4-INTERAZIONE TRA LIEVITI E BATTERI NEL KEFIR

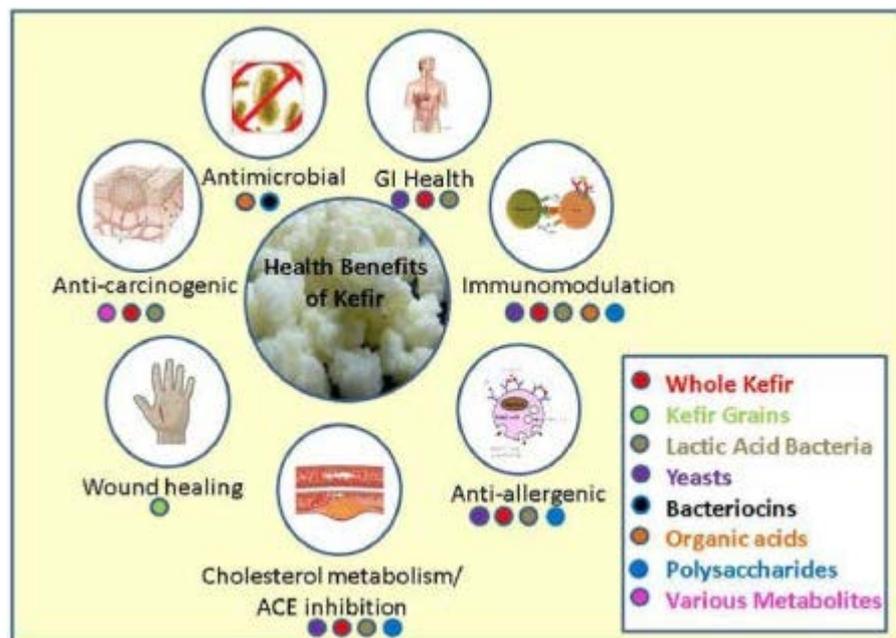
Le interazioni tra lieviti e batteri nel kefir non sono del tutto chiare e sono molto complesse, ma al tempo stesso, si nota una forte interdipendenza tra questi due microorganismi. I lieviti sintetizzano vitamine del gruppo B complesse e idrolizzano le proteine del latte, utilizzando l'ossigeno per produrre CO<sub>2</sub> ed etanolo ( Lopitz-Otsoa *et al.* , 2006). Inoltre, alcune specie di lievito sono lipolitiche e possono produrre acidi grassi o altri prodotti. L' interazione specifica tra lieviti e batteri porta alla crescita di entrambi, soprattutto se usati in co-cultura.. Ad esempio la specie di lievito *Debaryomyces hansenii* assimila l'acido lattico formato dai batteri lattici (LAB), innalzando il pH e stimolando la crescita dei batteri (Lopitz-Otsoa *et al.* , 2006). Il principale marker per valutare la relazione simbiotica tra i diversi microorganismi è l'aumento della biomassa durante la fermentazione ( Garrote *et al.* , 2010 ). Il complesso meccanismo di interazione microbica è quindi

alla base della buona qualità del kefir e delle sue proprietà benefiche, rendendolo una bevanda sempre più consumata e apprezzata.

### 1.1.5-PROPRIETA' TERAPUETICHE DEL KEFIR

Il consumo del kefir nella dieta giornaliera è raccomandato per via delle sue proprietà benefiche per la salute dell'organismo (Fig.2):

- Produzione di composti bioattivi
- Attività antimicrobica
- Attività antinfiammatoria
- Anticancerogeni
- Effetto ipocolesterolemizzante
- Stimolazione del sistema immunitario



**Figura 2-** Proprietà ed effetti benefici del kefir (Bourrie et al. , 2016)

Il consumo di kefir è stato raccomandato per il trattamento di diverse condizioni cliniche come problemi gastrointestinali, ipertensione, allergie e cardiopatia ischemica ( Farnworth Mainville, 2008 ; Rattray e

O'Connel, 2011 ). Diversi studi hanno dimostrato come questo prodotto svolge un ruolo antagonista per la crescita di microrganismi patogeni come *Escherichia.coli* , *L.monocytogenes* , *Salmonella phimurium*, *S. .Enteritidis*, *Shigella flexneri* e *Yersenia. Enterocolitica* (Santos et al. (2003) ). Molto probabilmente l'attività antimicrobica del kefir è associata alla produzione di acidi grassi, anidride carbonica e altri metaboliti che impedirebbero la crescita dei batteri che potrebbero essere dannosi per la salute dell'individuo. Questi composti possono avere effetti benefici non solo nell'inibire lo sviluppo di eventuali patogeni presenti negli alimenti, ma anche nel deterioramento dell'alimento, dovuto a microrganismi alterativi che potrebbero crescere durante le varie fasi di produzione del prodotto fermentato.

Un'altra proprietà associata a questo prodotto fermentato è quella antiinfiammatoria: in alcuni studi si è visto che somministrando a dei topi da laboratori, infettati da *Pseudomonas aeruginosa*, del kefir per sette giorni vi era una diminuzione del danno e dell'infiammazione portando ad una diminuzione del tessuto di granulazione. Il tessuto di granulazione appare come una modifica del tessuto connettivo dovuta ad una infezione o ha un processo di infiammazione acuta che potrebbe cronicizzare. In questo studio si è visto come la somministrazione del kefir aiutasse i topi ad attenuare l'infezione e l'eventuale danno al tessuto connettivo. ( Husseini *et al.* (2012).

Il ruolo dei prodotti caseari fermentati come il kefir nella prevenzione dei tumori sembrerebbe essere attribuita alla capacità di sopprimere i primi stadi della formazione delle masse tumorali andando a interferire con l'attività degli enzimi responsabili della conversione dei pro-cancerogeni in cancerogeni veri e propri, oppure andando a stimolare le difese immunitarie. Studi hanno dimostrato come la somministrazione giornaliera di questa bevanda nei topi che presentavano un tumore, favorisse l'aumento delle immunoglobuline IgA (anticorpi presenti soprattutto nelle secrezioni esterne, come saliva, lacrime, secrezioni genitourinarie, muco intestinale), promuovendo così anche la difesa della mucosa intestinale. ( Liu *et al.* (2002)). Un possibile meccanismo coinvolto nell'effetto di ipocolesterolizzazione vede coinvolti i batteri lattici che sembrerebbero in grado di ridurre l'assorbimento di colesterolo esogeno nell'intestino tenue incorporandolo all'interno delle cellule batteriche. Uno studio condotto da Wang *et al.* ( 2009 ) ha evidenziato come nei topi alimentati con il kefir è stata osservata una significativa riduzione dei livelli sierici di colesterolo totale, lipoproteine a bassa densità (LDL) e trigliceridi, mentre non vi era alcun cambiamento nei livelli di lipoproteine ad alta densità (HDL-C).

## 1.2-BEVANDE VEGETALI: LA SOIA

La soia è un ingrediente alimentare alla base della cucina tradizionale da migliaia di anni. La soia e gli alimenti a base di questa sono soluzioni nutrizionali per i vegetariani e per altri consumatori. Le sue proprietà nutrizionali e le caratteristiche biotecnologiche sono molto studiate e spiegano l'uso diffuso nella produzione di alimenti trasformati, in particolare come analoghi e sostituti della carne destinati a consumatori vegetariani e intolleranti. La minore incidenza di alcune malattie croniche tra le popolazioni che utilizzano tradizionalmente soia e alimenti a base di soia nel mondo ha suggerito il loro ruolo nella prevenzione di alcune patologie. I componenti della soia che ad oggi hanno suscitato maggior interesse sono gli isoflavoni che sono polifenoli con proprietà estrogeniche. Negli ultimi anni l'attenzione dei consumatori si è spostata molto verso gli alimenti di origine vegetale e in particolare la soia, sia perché una dieta ricca di proteine vegetali potrebbe ridurre il rischio di malattie cardiovascolari sia perché potrebbe influire positivamente anche su altri disturbi metabolici. La soia in particolar modo presenta un alto contenuto proteico e un basso contenuto di carboidrati, rendendo questo alimento sempre più richiesto sul mercato, in questo modo una grande varietà di prodotti alimentari a base di soia è diventata sempre più disponibile e sempre più varia e la ragione di tale popolarità può dipendere dalle proprietà nutrizionali della soia stessa. I semi sono usati per la produzione di analoghi e surrogati del latte e della carne. In particolar modo oggi sul mercato sono presenti delle alternative al latte vaccino: le bevande di soia. Le bevande di origine vegetale sono state consumate sin dall'antichità. L'origine della bevanda di soia risale alla Cina dove veniva consumata ogni giorno, in seguito, verso la meta del XX secolo è diventata una bevanda comune anche in Europa e in Nord America, tanto che sono state sviluppate tecniche di produzione e di sviluppo per conferirgli un gusto e una consistenza il più possibile simile al latte. La bevanda di soia è stata utilizzata molto nelle industrie alimentari, soprattutto quelle lattiero-casearie per la produzione di alimenti e prodotti che imitassero il latte vaccino, come lo yogurt di soia, la panna, prodotti analoghi ai formaggi e anche il kefir. Questi prodotti vegetali ad oggi si inseriscono nel trend del modello alimentare della società moderna, questo permette di rispondere alle esigenze di molti individui, soggetti a intolleranze alimentari, oppure coloro che conducono una dieta vegana o vegetariana. Il consumo di bevande di origine vegetale inoltre potrebbe ridurre anche l'impatto ambientale dovuto alla emissione di molte febbria di anidride carbonica.

### 1.2.1-PREPARAZIONE

La bevanda di soia è ottenuta dai semi di soia interi o dalla farina di soia. Questi semi vengono messi a bagno in acqua da tre ore fino a tutta la notte, in questo modo i semi si gonfiano e viene facilitata l'estrazione della parte liquida. I semi, dopo essere stati in acqua per tot ore devono essere scolati e risciacquati con acqua corrente per eliminare gli elementi antinutrizionali come ossalati e fitati. L'acido fitico infatti è tradizionalmente considerato un anti-nutriente, cioè limita l'assorbimento o l'utilizzo dei nutrienti, nel caso specifico l'acido fitico si lega a quest'ultimi formando Sali insolubili, i fitati. Questi Sali sono diffusi soprattutto nei cereali e nei legumi dove si concentrano nelle parti fibrose e nei semi, l'unico modo per inattivare e/o eliminare questi Sali è con il calore, con la fermentazione, o con un processo di "ammollo" prolungato in acqua. Dopo questo passaggio di "ammollo" in acqua occorre versare la soia dentro un mixer con 700 ml di acqua, dunque si otterrà una sorta di frullato di soia. In seguito occorre bollire il tutto per almeno 25 minuti, ottenendo un miscuglio molto liquido formato da una parte di soia liquida e da una parte di soia tritata. Una volta finiti i minuti occorre raccogliere il liquido che si è formato tramite un filtrante, in questo modo la bevanda di soia sarà pronta per la degustazione.

### 1.2.3-BENEFICI DELLA BEVANDA DI SOIA

La bevanda di soia è ricca di proteine, importanti per la struttura muscolare e per quella degli organi. Inoltre è ricca di acidi grassi come gli Omega-3, molto utili per la "salute del cervello". Questi sono grassi "sani" che il corpo non può formare da solo. L'assunzione costante di Omega-3 è correlata ad un ridotto rischio di demenza e morbo di Alzheimer. Inoltre, il "latte di soia" è un'ottima fonte di potassio, profondamente connesso al mantenimento di pressione sanguigna . Studi collegati al consumo regolare della bevanda di soia hanno dimostrato la sua capacità di abbassare i livelli di colesterolo sierico. Questa bevanda è ricca di lectina una importante alleata contro i calcoli renali alla cistifellea, è ricco di vitamine e povero di calorie. Ancora, il suo alto contenuto di isoflavoni, che sono una classe di sostanze chimiche note come " fitoestrogeni ", agendo come simil-estrogeni, possono aiutare a ridurre i sintomi della menopausa, come le vampate di calore. Inoltre la soia e gli alimenti a base di soia sembrano avere delle proprietà antiossidanti, suggerendo un ruolo molto importante nell'eliminazione di radicali liberi e specie reattive all'ossigeno anche se in questo caso devono essere ancora fatti numerosi studi.

Ci sono molti pro per quanto riguarda il consumo di latte di soia quali:

- è una buona fonte di potassio e può contenere, in seguito alla loro aggiunta, anche vitamine come la vitamina A, la B-12 e la vitamina D così come calcio;
- contiene tante proteine come il latte di mucca ma ha meno calorie del latte intero;
- contiene pochissimi grassi saturi.

Composizione chimica	Bevanda di soia
Proteine (g/100)	2,8-4,8
Colesterolo (mg)	0,0
Lattosio (g)	0,0
Grassi totali (g)	1,9-3,0
Grassi saturi (g)	0,2
Fibre (g)	1,3
Folato ( μg)	33.6
Energia (kcal)	32,2-41,0

**Tabella 1-** (USDA, 2015a; Hajirostamloo, 2009). Composizione chimica del latte di soia (100 g).

Recenti studi hanno dimostrato come alimenti a base di soia, come bevande e yogurt, possono essere dei potenziali alleati nella lotta contro il cancro, in particolar modo nella prevenzione del tumore al seno della donna. Il tipo più comune di cancro al seno è estrogeno-dipendente e gli effetti antiestrogenici degli isoflavoni sono noti. Gli isoflavoni hanno delle caratteristiche simili agli ormoni femminili in particolar modo la loro struttura proteica è simile a quella degli estrogeni. Sfruttando questa caratteristica possono legarsi ai recettori degli estrogeni o al contrario possono inibire il legame degli estrogeni con i loro recettori. Inoltre presentano anche la particolarità di avere effetti fisiologici come inibire le tirosin-chinasi o avere effetti antiossidanti. Gli isoflavoni sono presenti nei semi di soia come glicosidi e vengono idrolizzati a agliconi e carboidrati e questi composti vengono poi assorbiti dal tratto gastrointestinale. Nello studio condotto da Akimitsu et al., (2015) sono state seguite diverse donne che assumevano alimenti a base di soia, lo studio ha rivelato che gran parte delle donne che hanno partecipato aveva un cancro positivo al recettori degli

estrogeni. Le analisi condotte hanno dimostrato che l'assunzione di soia può ridurre il rischio di cancro al seno nelle donne e è stato escluso al tempo stesso un eventuale coinvolgimento degli isoflavoni nella promozione del cancro, suggerendo che alimenti contenenti soia possono essere usati anche nelle diete di pazienti o persone con tumori o neoplasie ( Akimitsu Takagi *et al.*, 2015).

### 1.3-INTOLLERANZE ALIMENTARI

Come già accennato, ad oggi tendono ad essere sempre più diffuse le intolleranze al lattosio, per questo è utile avere una valida alternativa al latte animale. Inoltre, il consumo di bevande vegetali ha anche un impatto positivo sull'ambiente poiché non contribuisce all'emissione di anidride carbonica degli allevamenti intensivi. Al livello mondiale circa due terzi della popolazione manifesta questa intolleranza al lattosio e solo un terzo della popolazione riesce ancora a digerirlo fino anche all'età adulta avanzata. Molto probabilmente questa capacità o incapacità di digerire il latte risale a tempi antichissimi. Circa 10000 anni fa l'uomo iniziò il processo di addomesticamento animale e la conseguente produzione e consumazione del latte. Con il passare del tempo quindi essendo il latte un elemento fondamentale per la dieta si pensa che si siano sviluppate delle varianti geniche, un modo cioè per continuare a digerire il latte anche in età adulta, forse derivanti proprio dalla spinta selettiva e dalle poche risorse che vi erano in quel tempo.

Oggi le popolazioni che ancora riescono a digerire il latte hanno una distribuzione geografica ben precisa: sono infatti i popoli del nord europeo e alcune popolazioni dell'Africa Occidentale, in questi due casi specifici la tollerabilità al consumo di latte arriva fino a una percentuale del 90% anche in età adulta. Contrariamente i popoli asiatici e del sud America presentano invece una percentuale di intolleranti al lattosio molto cospicua in età adulta (Ségurel, L., Bon, C. (2017)). La capacità di poter digerire il latte deve essere ricondotta all'attività di un enzima: la lattasi. Dopo l'età dello svezzamento il consumo di latte vaccino risulta dannoso per una progressiva riduzione di questo enzima. La lattasi fa parte delle  $\beta$ -galattosidasi, della classe delle idrolasi, responsabile quindi della digestione del lattosio, lo zucchero più abbondante nel latte. La lattasi essendo un enzima idrolitico, in presenza di acqua, catalizza la scissione dei  $\beta$ -galattosidi nei monomeri che li costituiscono, infatti la lattasi è deputata all'idrolisi enzimatica del lattosio in glucosio e galattosio. Una carenza di questo enzima porta quindi a disturbi intestinali come gonfiore, diarrea e crampi

addominali che impediscono il consumo del latte. Tuttavia si è visto come anche chi non riesce a digerire il latte presenta una soglia di tolleranza: la maggior parte dei soggetti che digeriscono male il lattosio possono tollerare fino a 12 g di lattosio (equivalenti a circa 250 ml di latte vaccino) in una singola dose e fino a 20-24 g distribuiti nella giornata, senza avvertire sintomi gastrointestinali (Szlagyi, A. (2015) ). Chi è intollerante al latte ha valide alternative oltre a vari yogurt e bevande senza lattosio, possono consumare anche il kefir o bevande a base vegetale. Anche il consumo di alimenti contenenti Bifidobatteri sembra ridurre il sintomi di gonfiore e flatulenza, questi batteri riescono a fermentare infatti il lattosio senza produrre idrogeno e allo stesso tempo esercitano un effetto benefico sulla salute dell'intestino (L.Delgado *et al.*, 2017).

Dei validi sostituti al latte quindi si possono reperire da alimenti vegetali come la soia. Anche la soia però come gran parte degli alimenti può generare e scatenare delle intolleranze o nei casi più gravi delle allergie. Tra i fattori più limitanti dell'uso della bevanda a base di soia c'è la presenza di notevoli quantità di oligosaccaridi non digeribili, nonché un odore sgradevole e il sapore che possono essere causati dalla lipossigenasi, l'enzima del chicco di soia. La soia potrebbe essere un allergene sia per adulti che per bambini, (le allergie nei bambini a questo alimento aumentano sempre di più), l'allergia alla soia si manifesta quando il sistema immunitario identifica le proteine della soia come nocive. Quando si entra in contatto con queste proteine il sistema immunitario rilascia le istamine, che ricoprono un ruolo importante nelle risposte infiammatorie e allergiche, questi composti azotati scatenano i vari sintomi come prurito, edemi, nausea, vomito prurito alla bocca ecc...Un ulteriore svantaggio è quello che la soia, data la sua enorme richiesta sul mercato alimentare, viene coltivata in grande quantità, portando quindi a uso di pesticidi o elementi chimici dannosi per la salute.

## 1.4-I MICROORGANISMI PROBIOTICI

Il termine “probiotico” deriva dalla preposizione latina “pro” (a favore di) e dall’ aggettivo greco βιωτικός (biotico), derivante a sua volta dal sostantivo βίος (bios, “vita”). Indica generalmente un qualcosa che porta dei benefici al nostro organismo. Questo termine è associato a dei microorganismi che possono essere aggiunti a prodotti alimentari, come quelli caseari, dediti a portare dei vantaggi alla salute. Anche l’organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e l’organizzazione delle Nazioni Unite per l’Alimentazione e l’agricoltura (FAO) ha descritto come probiotici quei “microorganismi vivi che, se somministrati in quantità adeguate, conferiscono un beneficio alla salute dell’ospite”.

I probiotici sono comunemente definiti come colture mono o miste di microorganismi viventi, che, se utilizzate dall'uomo o dagli animali, hanno effetti benefici sull'ospite, migliorando le proprietà della microflora esistente. I probiotici sono quindi microorganismi buoni in grado di resistere al tratto gastro-intestinale e allo stesso tempo apportare un vantaggio all’organismo. Questi probiotici hanno la capacità di resistere a 37°C, a condizioni sfavorevoli del tratto gastro-intestinale come enzimi digestivi, succhi gastrici e pancreatici e hanno una resistenza anche al pH basso del tratto intestinale. Resistendo a queste condizioni non favorevoli riescono ad aderire alle cellule epiteliali dell’intestino e contrastano allo stesso tempo l’adesione di altri microorganismi che potrebbero essere dei potenziali patogeni. Sembrano giocare anche un ruolo molto importante nel riequilibrare la flora intestinale in pazienti che hanno dovuto assumere antibiotici per lunghi periodi di tempo, questi potrebbero essere un valido aiuto quasi “naturale” per questi pazienti la cui flora intestinale potrebbe essere soggetta ad eventuali attacchi di altri microorganismi o a disbiosi intestinale. I probiotici sembrerebbero migliorare la qualità della flora batterica stessa, influenzando anche in alcuni casi il sistema immunitario. Sono risultati molto utili anche nelle malattie diarroiche (come la diarrea del viaggiatore) ma sembrano essere anche utili in casi di diverticolosi.

I ceppi probiotici più comunemente utilizzati appartengono i generi *Lactobacillus* e *bifidobacterium* (Božanić R. et al., 2011). Il *Lactobacillus casei* (*shirota*) è considerato la specie probiotica più importante e si ritiene che abbia degli enormi benefici sulla salute umana. Questo batterio si può trovare in molti prodotti caseari derivati dal latte vaccino, ma studi recenti hanno dimostrato la validità di alimenti di origine vegetale come la soia, infatti la fermentazione della bevanda di soia con batteri probiotici sembrerebbe migliorare il valore nutritivo di questi prodotti e consente al cibo di apportare giovamento alla salute del consumatore.

Per essere definiti probiotici i microrganismi devono avere determinate caratteristiche:

- appartenere al gruppo designato come GRAS (generalmente considerati sicuri);
- devono essere vivi e vitali nell'ambiente intestinale e resistere quando sono sottoposti alle secrezioni biliari e pancreatiche;
- devono avere delle capacità antimicrobiche;
- devono aderire alle cellule epiteliali intestinali;
- devono poter produrre biofilm;
- avere una capacità antiossidante

### **1.4.1-MICROBIOTA INTESTINALE**

Il termine microbiota comprende una comunità microbica presente nel tratto intestinale, questa enorme comunità è costituita da batteri, lieviti, parassiti e virus, questi microrganismi transitano e risiedono nel tratto digerente. L'origine di questa grande comunità avviene nei primi mesi di vita, infatti il feto inizialmente ha ancora un intestino sterile. La colonizzazione del neonato, da parte di batteri sia "buoni" che "cattivi" inizia quando, quest'ultimo passa attraverso il canale del parto materno che è inevitabilmente colonizzato da numerosi microrganismi. Sembra anche che l'allattamento al seno materno favorisca una proliferazione di questa comunità microbica che si completerà poi nel corso dei primi anni di vita, generalmente la popolazione microbica si completa intorno al terzo anno di vita. Il microbiota intestinale deve svolgere delle funzioni essenziali per garantire il corretto funzionamento ed equilibrio intestinale. Importante è quindi mantenere una eubiosi, uno stato di equilibrio intestinale fisiologico che porta alla salute stessa dell'organismo. Questo equilibrio fisiologico si deve instaurare tra i microrganismi che coabitano e convivono nella mucosa intestinale. Un disequilibrio di questa popolazione potrebbe portare all'insorgenza di malattie e problematiche gastro-intestinali. Il microbiota intestinale è influenzato dallo stile di vita, dalle abitudini alimentari ma anche da eventuali terapie mediche che sono state prescritte all'individuo, dall'esposizione ambientale ma anche in piccola parte il background genetico. Tra i fattori non dietetici, anche l'età, il sesso, lo stress (Hawrelak JA et al., 2004), i disturbi gastrointestinali, gli eventi infettivi possono svolgere un ruolo importante nella composizione del microbiota (Schipa s. et al., 2014). Le abitudini alimentari non salutari hanno un impatto negativo sulla composizione del microbiota intestinale e potrebbero agire come un fattore scatenante di malattie con effetti sulle vie metaboliche.

Come accennato prima per ripristinare l'equilibrio intestinale o rafforzare le sue funzioni fisiologiche sono molto importanti e utili i probiotici che sono in grado di modulare l'equilibrio intestinale per portarne dei benefici.

Alcune tra le funzioni del microbiota:

- ha una funzione protettiva, agisce infatti come una barriera contro la proliferazione dei batteri patogeni, grazie alla presenza dei microrganismi del microbiota, questi evitano la colonizzazione di altri microrganismi.
- Svolge un ruolo importante nella regolazione del nostro sistema immunitario, stimolando la risposta immune del tratto intestinale, allo stesso tempo i microrganismi sono tollerati dalle difese immunitarie.
- Permette la produzione di alcune fra le vitamine fondamentali per il nostro organismo, come acido folico, vitamina K, vitamine del gruppo B, che avviene a livello intestinale;
- regola la motilità intestinale o peristalsi, determinata anche dal tipo di dieta. La flora batterica stimola infatti le cellule nervose intestinali agevolando il naturale meccanismo di contrazione e rilassamento del colon durante la fase di digestione.

## 1.4.2-BATTERI LATTICI E LIEVITI COME PROBIOTICI

### I BATTERI LATTICI

I batteri lattici (LAB) appartengono al phylum *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordine *Lactobacillus*, famiglia *Lactobacillaceae*. Contano circa cinque generi tra cui: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* ed *Enterococcus*. I batteri lattici sono così chiamati in quanto la maggior parte di questi converte il lattosio e altri zuccheri in acido lattico mediante la fermentazione lattica. I batteri lattici sia che siano naturali, che aggiunti agli alimenti come colture starter, trovano un grande impiego nella produzione di alimenti fermentati come i derivati del latte, della carne, ma anche alimenti di origine vegetale contribuendo in vari modi a determinare le loro caratteristiche di stabilità. Le loro attività metaboliche essenziali sono:

- fermentazione dei carboidrati
- hanno un'azione sulle proteine
- producono sostanze aromatiche
- producono sostanze antimicrobiche

I microorganismi utilizzati per le loro proprietà di promuovere la salute umana appartengono a diversi generi di batteri e di lieviti come vedremo. Il genere *Lactobacillus* comprende oltre cento specie, è un batterio Gram-positivo, anaerobio facoltativo di forma tipicamente bastoncellare. Ha delle caratteristiche che lo associa ai Gram-positivi come il fatto di essere catalasi negativo. Solitamente crescono in ambiente anaerobio e non hanno citocromi. Possono crescere in diversi ambienti che devono essere ricchi di nutrienti (poiché sono organismi abbastanza esigenti) come il tratto gastrointestinale, le vie uro-genitali, il cavo orale e la pelle. Svolgono inoltre importanti attività chimiche come acidificazione, attività peptidolitica, sono degli antagonisti contro numerose specie di patogeni e conferiscono delle proprietà aromatizzanti.

Sono classificati in tre gruppi:

- Gruppo I: lattobacilli omofermentanti (*es. Lb. delbrueckii subsp. Delbrueckii*) in cui l'unico prodotto della fermentazione è l'acido lattico.
- Gruppo II: lattobacilli eterofermentanti facoltativi. (*Lb. casei*; *Lb. Paracasei*), sono molto simili al primo gruppo ma questi in particolari condizioni oltre all'acido lattico possono produrre anche acido acetico, etanolo e possono fermentare i pentosi
- Gruppo III: Gruppo III: lattobacilli eterofermentanti obbligati. (*Lb. brevis*; *Lb. fermentum*; *Lb. Kefir*), quest'ultimi producono oltre ad acido lattico anche anidride carbonica, etanolo e acido acetico.

Sono anche definiti acido-resistenti per via dell'elevata quantità di acido lattico che producono durante la fermentazione e responsabile dell'abbassamento del pH nella matrice, inoltre grazie alle loro straordinarie capacità fermentative riescono ad aumentare la shelf-life del prodotto (Bottazzi, 199; Khalid 2011; Farris et al., 2012).

Il largo impiego dei LAB oggi si nota soprattutto nei prodotti alimentari a base di latte dove svolgono un ruolo importante e centrale in molti processi di fermentazione conferendo a questi prodotti delle tipiche caratteristiche aromatiche e olfattive, ma anche proprietà benefiche per la salute dell'individuo che consuma il prodotto. Hanno un ruolo fondamentale nell'asse alimenti-microbioma intestinale, garantendone un equilibrio e un corretto funzionamento.

#### 1.4.3-LIEVITI COME PROBIOTICI

I lieviti sono parte della microflora di vari alimenti e bevande fermentate, si trovano in moltissimi alimenti sia di origine vegetale sia di origine animale. Negli ultimi decenni l'interesse verso questi organismi è cresciuto molto, proprio perché alcune specie possedevano delle caratteristiche che li rendevano dei probiotici. Inoltre i lieviti raramente sono associati a problemi quali allergie ed epidemie e potrebbero sempre più trovare una strada verso l'industria alimentare, ma anche bio-medica. Molte specie di lieviti sono riconosciute come sicure anche dall'Autorità europea per la sicurezza Alimentare (EFSA). (Folignè et al., 2010).

Data la grande complessità di questi organismi eucarioti molto spesso l'attenzione è rivolta verso i batteri, ma in recenti studi si è visto come i lieviti *S.cerevisiae* var. *boulardii* poteva essere utilizzato anche nel trattamento di malattie gastro-intestinali come le diarrea del viaggiatore, il morbo di Crohn, l'IBS (sindrome dell'intestino irritabile o inflammatory bowel disease). Inoltre, i lieviti probiotici sono stati utilizzati per ridurre gli effetti collaterali dei trattamenti contro *l' Helicobacter pylori* .

Ad oggi i lieviti suscitano sempre più interesse e si cercano sempre di più ceppi che potrebbe essere dei potenziali probiotici in modo da contribuire come o con i batteri alla salute dell'organismo. Molti studi hanno visto come alcuni lieviti erano in grado di aiutare la digestione del latte come i LAB. I lieviti se sfruttati al meglio possono cooperare o sostituire i batteri che ormai sono sovra-utilizzati, questo uso e diffusione dei batteri potrebbe portare all'insorgenza delle antibiotico- resistenze che sono un enorme problema sanitario, infatti consumando cibi, bevande trattate con antibiotici i batteri possono acquisire delle resistenze contro questi farmaci. I lieviti rappresentano quindi una soluzione che darebbe giovamento all'industria alimentare, questi organismi sono immuni a molti antibiotici e andrebbero quindi a ridurre la problematica dell'antibiotico resistenza. Per queste ragioni l'attività è sempre più focalizzata sulla ricerca di specie probiotiche (Agarbaty et al., 2020).

## 1.5-ALIMENTI PER IL BENESSERE DELL'INDIVIDUO

Sin dall'antichità l'uomo ha rivolto particolare attenzione all'alimentazione attribuendone proprietà salutistiche e medicamentose. Un documento dell'antico Egitto, Il Papiro di Ebres (Regno di Amenhotep I 1534 a.C.), fa riferimento alla pianta dell'aglio, la quale veniva impiegata per curare disturbi cardio-circolatori parassitosi ed infezioni, proprietà confermate dalla scienza moderna che ne riconduce gli effetti benefici al solfuro di allile, un potente antiossidante e battericida. Gli Egizi utilizzavano una bevanda a base di cicoria tostata simile al caffè per sanare disturbi gastrointestinali. Per molto tempo fino ad oggi molti alimenti sono stati considerati utili per la salute dell'uomo. Solo negli anni 80' il Giappone propose il termine "alimento funzionale" attribuendo a molti alimenti gli effetti benefici sulla salute dell'individuo. Nell'alimentazione giapponese si hanno piatti ricchi di pesce e una dieta ricca quindi di Omega-3, col tempo si è visto un radicale cambiamento nei confronti di nuovi generi alimentari e forse un'attenzione in più verso quelle che sono delle diete e dei pasti equilibrati che possano apportare i nutrienti essenziali per la salute umana. L'alimento funzionale deve però dare degli effetti e dei benefici sulla salute umana ma anche mantenere l'organismo in uno stato di eubiosi intestinale. Ormai grazie a diversi studi si è visto come molte proprietà funzionale e benefiche siano già contenute naturalmente in molti alimenti sia vegetali che animali. Il consumo quotidiano di questi alimenti può, oltre a soddisfare le normali funzioni nutrizionali ed avere degli effetti fisiologici, ridurre il rischio di malattie croniche. Tra questi functional foods ritroviamo alimenti non solo con caratteristiche probiotiche ma anche molti alimenti vegetali, nell'elenco rientra anche il kefir che nell'industria alimentare sta prendendo sempre più piede. La soia, per esempio, rientra tra gli alimenti funzionali, alle sue proteine è associata la capacità di ridurre il rischio di patologie coronariche, il tè verde per il contenuto di catechine, l'aglio per le sostanze idro e lipo-solubili che gli conferiscono proprietà anticancerogene, l'olio d'oliva per i tocoferoli. (Jones 2002, Cocchi 2007; Hrelia et al., 2009).

L'obiettivo di questi functional foods e la possibilità di essere introdotti nella dieta sono:

- Migliorare l'equilibrio della microflora
- Attivare la risposta immunitaria
- Migliorare la motilità e il transito intestinale
- Possono avere anche delle proprietà di antiossidanti catturando i radicali liberi
- Modulare alcune vie metaboliche
- Nello sviluppo neonatale hanno un ruolo importante gli omega-3, acido folico e colina.

## CAPITOLO 2-SCOPO DELLA TESI

Nel mondo moderno le industrie alimentari stanno focalizzando sempre di più l'attenzione su cibi o bevande che possano "stimolare" il consumatore al loro acquisto anche per la loro capacità di apportare dei benefici all'organismo. Una maggiore consapevolezza da parte dei consumatori ha fatto sì che essi prediligano cibi sani nella scelta alimentare. Tutto questo ha portato le industrie alimentari a proporre nuovi prodotti in grado di soddisfare le richieste dei consumatori, come alimenti funzionali probiotici o fortificati che al tempo stesso siano accettabili in termini di gradevolezza, sapore e odore.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di produrre un alimento fermentato "tipo kefir" che avesse le stesse caratteristiche del kefir normale ma utilizzando una matrice alimentare alternativa rispetto al latte vaccino o ad altri tipi di latte di origine animale. La matrice alimentare utilizzata è stata la soia, in particolar modo è stata scelta la bevanda di soia, consumata in molte diete, non solo vegetali, ma anche da individui che presentano intolleranze alimentari, rappresentando quindi una valida sostituzione al latte vaccino. La matrice bevanda di soia è stata fermentata utilizzando 5 ceppi di lievito di tipo non-*Saccharomyces* e non commerciali appartenenti a 4 specie diverse, a formare un pool fermentativo unico, selezionati per le loro capacità probiotiche. Il pool microbico è stato quindi utilizzato come starter per la fermentazione del latte di soia, considerando tre tempi di fermentazione: 24, 48 e 72 ore, con lo scopo di simulare tempi di fermentazione che possano mimare quelli di una produzione artigianale di kefir. Con lo scopo di simulare la fermentazione del kefir, il pool di lieviti è stato co-inoculato in fermentazione mista con una specie di batterio lattico commerciale quale *Lactobacillus casei shirota*. Sono state condotte analisi chimico-fisiche dei fermentati al termine di ciascuna fermentazione e al termine della shelf-life, mentre l'analisi sensoriale è stata condotta solo al termine della shelf-life del prodotto.

L'obiettivo è stato quello di analizzare le proprietà fermentative del pool microbico nella matrice latte vegetale da un lato e dall'altro analizzare le differenze chimico-fisiche e sensoriali del fermentato sottoposto a differenti tempi di fermentazione con lo scopo di proporre una bevanda vegetale fermentata che possieda i requisiti di cibo funzionale e apprezzabile dal punto di vista organolettico in grado di "stimolare" la curiosità dei consumatori finali.

## CAPITOLO 3-MATERIALI E METODI

### 3.1 CEPPI DI LIEVITO E BATTERE USATI

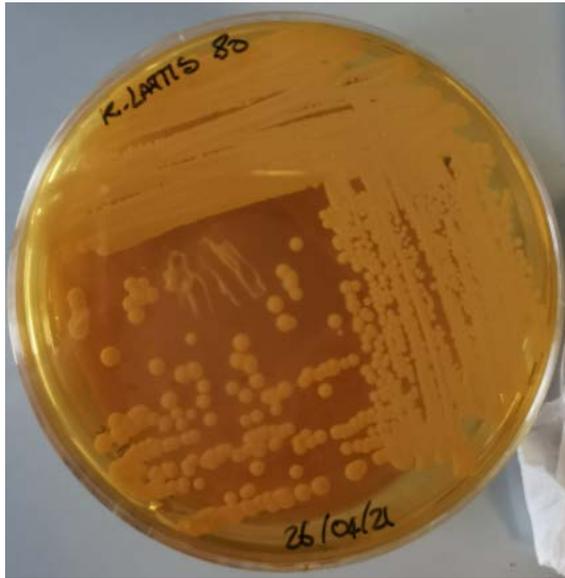
Sono stati utilizzati ceppi di lievito di tipo non-*Saccaromyces* isolati da caseifici di zone territoriali limitrofe alla città di Ancona, nelle Marche. Questi lieviti non sono degli starter commerciali ma bensì sono dei ceppi di tipo wild che si sono adattati e selezionati all'ambiente. Tali ceppi sono stati analizzati per le principali proprietà probiotiche e dei 100 ceppi oggetto di studio (Agarbati et al., 2021) ne sono stati selezionati 4 appartenenti alle seguenti specie: *Candida zeylanoides* ceppo 13, *Debaryomyces hansenii* ceppi 36 e 78, e *Kluyveromyces lactis* ceppo 80.

A questi è stato aggiunto il ceppo non commerciale *Metschnikowia* 50, isolato dal vinsanto e utilizzato per la sua capacità di produrre acidi grassi polinsaturi (Canonico et al., 2016). Inoltre, con lo scopo di mimare la diversità microbica del kefir di tipo artigianale, insieme ai lieviti è stato utilizzato anche il battere *Lactobacillus casei* Shirota, un ceppo commerciale isolato dallo Yakult (Yakult Honsha Co., Ltd.).

I ceppi di lievito sono stati coltivati a 25°C e poi mantenuti per breve periodo a 4°C su terreno di crescita YPD agar (1% estratto di lievito, 2% peptone, 2% D-glucosio e 1,8% di Agar) (Fig. 3), mentre il battere è stato coltivato a 37°C e in condizione di anaerobiosi e poi mantenuto a 4°C su terreno MRS agar.



**Figura 3-** Dettaglio di alcune specie di lieviti utilizzati per la prova in dettaglio si possono notare *D.hansenii* 36 e 78, *K. lactis*.80, *C. Zeylanoides* 13.



**Figura 3.1-** Esempio di lievito coltivato su terreno YPD agar

## 3.2 ALLESTIMENTO DELLE PROVE DI FERMENTAZIONE

### 3.2.1 MATRICE DI FERMENTAZIONE UTILIZZATA

Il kefir vegetale è stato prodotto utilizzando come matrice di fermentazione la bevanda di soia commerciale della marca Alpro® “original” 100% vegetale le cui caratteristiche nutrizionali sono riportate in tabella:

Valori nutrizionali medi per 100ml di bevanda	
Energia	40 kcal
Grassi	0.8 g
Grassi saturi	1.3 g
Carboidrati	2.8 g
Zuccheri	2.8 g
Fibre	0.4 g
Proteine	3.0 g
Sale	0.09 g
Vitamine:	
• D	0.75 µg
• Riboflavina (B2)	0.21 mg
• B12	0.38 µg
Sali minerali (calcio)	160 mg

**Tabella 2-** Valori nutrizionali per 100ml di prodotto della marca Alpro®

### 3.2.2 ALLESTIMENTO DELLE PRE-COLTURE E PREPARAZIONE DELLA BIOMASSA

Le pre-colture di ciascun lievito sono state allestite prelevando con un'ansa sterile una colonia del microorganismo puro coltivato in YPD agar, stemperata in 50 ml di YPD liquido e lasciate ad incubare a 25 °C overnight. La pre-cultura di *Lb. casei* Shirota è stata allestita con la stessa modalità dei lieviti ma utilizzando MRS broth (150 ml) come mezzo di crescita e fatto crescere a 37 gradi per 48 ore.

Per la raccolta della biomassa le pre-colture di ciascun microorganismo sono state trasferite in falcon sterili e centrifugate. I lieviti sono stati centrifugati 5 minuti a 40 rpm. La biomassa è stata lavata con NaCl 0.9% per rimuovere eventuali residui di terreno e risospesa in 5ml di acqua sterile.

Il battere, avendo una dimensione di circa 10 volte più piccola rispetto ai lieviti, è stato centrifugato per 20 minuti a 40 rpm. Anche in questo caso la biomassa è stata lavata con NaCl 0.9% e risospesa utilizzando 5ml di acqua sterile.

Una volta ottenuta la biomassa di ciascun microorganismo, ne è stata determinata la concentrazione utilizzando la camera conta globuli di Thoma-Zeiss (Fig.4).



**Figura 4-** Camera di Thoma-Zeiss

Conoscere la concentrazione iniziale della biomassa di ciascun microorganismo è necessario per calcolare il volume di biomassa da inoculare nella prova di fermentazione, previa decisione della concentrazione finale di ciascun microorganismo. Per fare il calcolo del volume iniziale di biomassa da inoculare si è sfruttata la seguente formula:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

dove

- ❖ Ci: concentrazione iniziale della biomassa ottenuta attraverso la conta con la camera contaglobuli di Thoma-Zeiss
- ❖ Vi: volume di inoculo della biomassa (corrisponde all'incognita da calcolare)
- ❖ Cf: concentrazione finale di ciascun microorganismo
- ❖ Vf: volume finale della prova di fermentazione

In particolare, ciascun microorganismo è stato inoculato ad una concentrazione finale di:

- *Lb. casei* Shirota--  $1 \times 10^8$  cell/ml
- *D. hansenii* (D.H). 78 e 36--- $5 \times 10^3$  cell/ml
- *C. zeylanoides* (C.Z.) 13--- $5 \times 10^2$  cell/ml
- *K. lactis* (K.l) 80— $1 \times 10^3$  cell/ml
- *M. pulcherrima* (M.p) 50--- $1 \times 10^3$  cell/ml

### 3.2.3 ALLESTIMENTO DELLA PROVA DI FERMENTAZIONE

Per l'allestimento della prova sono stati aliquotati 150 ml di bevanda di soia in barattoli di vetro sterilizzati, ciascuno è stato inoculato con i microrganismi seguendo lo schema sottostante, chiuso con un tappo a vite sterile e messi ad incubare a 25 °C per avviare il processo fermentativo.

Nome prova:	Microorganismi inoculati:	Concentrazione di inoculo:
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Controllo (C+)</b></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Lactobacillus casei</i> Shirota</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <math>1 \times 10^8</math> cell/ml</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Pool</b></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Lactobacillus casei</i> Shirota</li><li>• <i>D. hansenii</i> (D.H) 78 e 36</li><li>• <i>C. zeylanoides</i> (C.Z.) 13</li><li>• <i>K. lactis</i> (K.l) 80</li><li>• <i>M. pulcherrima</i> (M.p) 50</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <math>1 \times 10^8</math> cell/ml</li><li>• <math>5 \times 10^3</math> cell/ml</li><li>• <math>5 \times 10^2</math> cell/ml</li><li>• <math>1 \times 10^3</math> cell/ml</li><li>• <math>1 \times 10^3</math> cell/ml</li></ul>

**Tabella 3**-Tabella riassuntiva

Tutte le prove sono state allestite in quadruplicato.

In particolare, sono stati preparati diversi set, ognuno corrispondente ad un diverso tempo di fermentazione, quale 24, 48e 72 ore (Fig.5) con lo scopo di simulare tempi di fermentazione simili a quelli del kefir artigianale e al tempo stesso poterne monitorare i cambiamenti dal punto di vista microbiologico, chimico/fisico e organolettico/gustativo. Terminata ciascuna fermentazione, i barattolini sono stati conservati in cella fredda alla temperatura di 4 °C.



**Figura 5-** Set di barattolini sottoposti a vari tempi di fermentazione

### 3.3.1 TERRENI DI COLTURA

I terreni di coltura utilizzati per le analisi microbiologiche sono stati:

☒ YPD Agar (Yeast extract – Peptone – Dextrose) è un terreno ricco e generalmente molto usato per la crescita dei lieviti. I lieviti sono microrganismi unicellulari eucarioti ed eterotrofi: per crescere necessitano di una fonte di carbonio (rappresentata in questo terreno dal D- glucosio o destrosio) e di alcuni amminoacidi che vengono forniti dalla presenza, nella formulazione, sia del peptone che dell'estratto di lievito (quest'ultimo assicura tra l'altro anche la presenza d'importanti precursori nucleotidici per la divisione cellulare e non solo).

Questo terreno presenta la seguente composizione:

- estratto di lievito 1%
- peptone 2%
- D-glucosio 2%
- Agar 1.8%
- La forma liquida non prevede l'aggiunta di agar.

☒ MRS Agar (Man – Ragosa – Shape) è un terreno selettivo usato per l'isolamento e la coltivazione di *Lactobacillus* sp. da campioni clinici, da alimenti e prodotti lattiero caseari. MRS è un terreno selettivo idoneo per la crescita e l'isolamento dei batteri lattici, comprese le specie difficilmente coltivabili su altri terreni (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*) ed è così formulato:

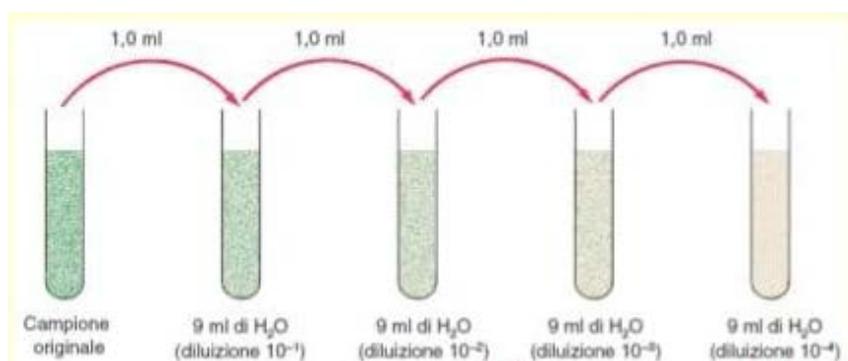
- Glucosio 20,0 g/l
- Agar 15,0 g/l
- Peptospecial 10,0 g/l
- Estratto di carne 10,0 g/l
- Acetato di sodio 5,0 g/l
- Idrogeno fosfato di potassio 2,0 g/l
- Ammonio citrato 2,0 g/l
- Magnesio solfato 0,2 g/l
- Manganese solfato 0,05 g/l

☒ WL Nutrient Agar (Wallerstein Laboratory) Nutrient Medium è il terreno raccomandato dal Wallertstein Laboratory per l'analisi lievitifforme dei prodotti delle fermentazioni. Il terreno è preparato secondo la formula originale di Gray e Green per lo studio dei microrganismi coinvolti nelle fermentazioni della birra e del pane. WL Nutrient Medium permette una ottima crescita dei lieviti (e spesso anche la loro distinzione) e anche di alcuni batteri, se nel campione il loro numero è ridotto. L'aggiunta al terreno di Cloroamfenicolo inibisce completamente la crescita dei batteri. Questo terreno è così formulato:

- Destrosio 50,0 g/l
- Agar 20,0 g/l
- Triptone 5,0 g/l
- Estratto di lievito 4,0 g/l
- Potassio fosfato monobasico 0,55 g/l
- Cloruro di potassio 0,425 g/l
- Solfato di magnesio 0,125 g/l
- Cloruro di calcio 0,125 g/l
- Verde di bromocresolo 0,022 g/l
- Cloruro di ferro 0,0025 g/l
- Solfato di manganese 0,0025 g/l

### 3.3.2 CONTE VITALI

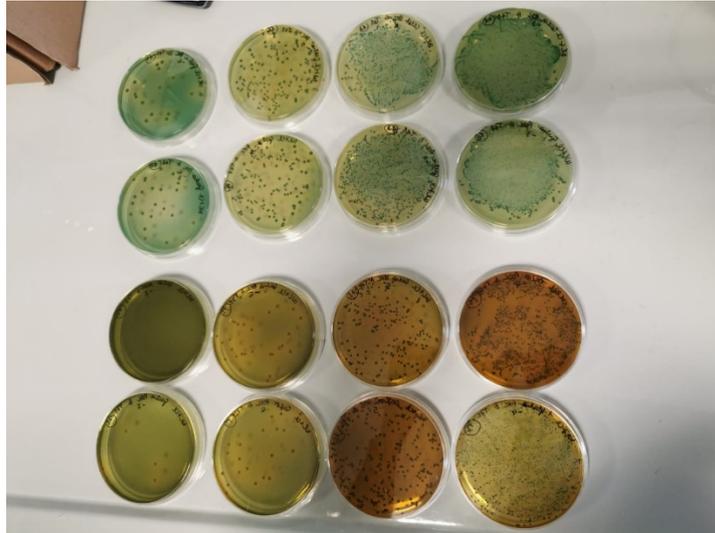
Ciascuna tesi e per ogni set di fermentazione (24, 48 e 72 ore), sono state eseguite analisi microbiologiche con lo scopo di monitorare la cinetica di crescita di ciascun lievito nel pool, e del battere (in coltura pura e non) sia al termine della fermentazione che al termine del periodo di stoccaggio a 4°C. La cinetica di crescita dei microorganismi è stata monitorata attraverso conte vitali su piastra. Per effettuare le conte vitali sono state eseguite opportune diluizioni seriali, come si vede nella figura sottostante (Fig. 6):



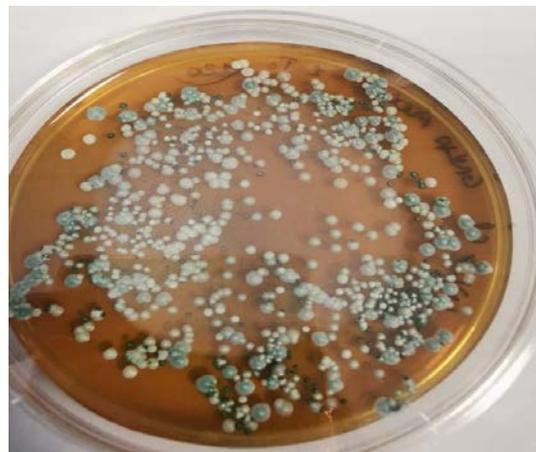
**Figura 6-** Diluizioni seriali

In particolare, è stato prelevato 1 ml dal campione originale ed è stato inserito in una provetta contenente 9 ml di acqua sterile ottenendo così una prima diluizione di 1:10 ( $10^{-1}$ ), dopo aver passato sul vortex la provetta, da questa è stato prelevato sempre 1 ml di soluzione ed è stato inserito in una seconda provetta sempre contenente 9ml di acqua sterile. Si è proceduto in questo modo fino ad ottenere le diluizione appropriate. Il campione opportunamente diluito è stato poi piastrato con l'ausilio di un'ansa di vetro a forma di "L", che dopo essere stata immersa in alcol e, fatta passare sulla fiamma, è stata raffreddata sul bordo della piastra ed, è stato effettuato lo spatolamento per diffusione cellulare. In particolare, è stato utilizzato il terreno WL Nutrient Agar per la differenziazione delle diverse specie di lievito. A questo terreno è stato aggiunto lo 0.05% di cloramfenicolo per inibire la crescita del battere. Invece è stato utilizzato il terreno MRS agar per la crescita di *Lb. casei* Shirota, a questo terreno è stato aggiunto lo 0.02% di cicloeximide per impedire lo sviluppo dei lieviti.

Le piastre di WL Nutrient Agar poi sono state messe ad incubare a 25 °C in aerobiosi per 3 giorni per permettere la crescita dei lieviti (Fig. 7 e 8), mentre per i batteri l'incubazione e la crescita è stata fatta a 37 °C per 5 giorni in condizione di anaerobiosi utilizzando apposite giare.



**Figura 7-**Piastre di WL Nutrient Agar prove di fermentazione al tempo 72 ore



**Figura 8-** Piastra contenete il pool di lieviti

### 3.4 ANALISI CHIMICHE

#### 3.4.1 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE DEL KEFIR DI SOIA

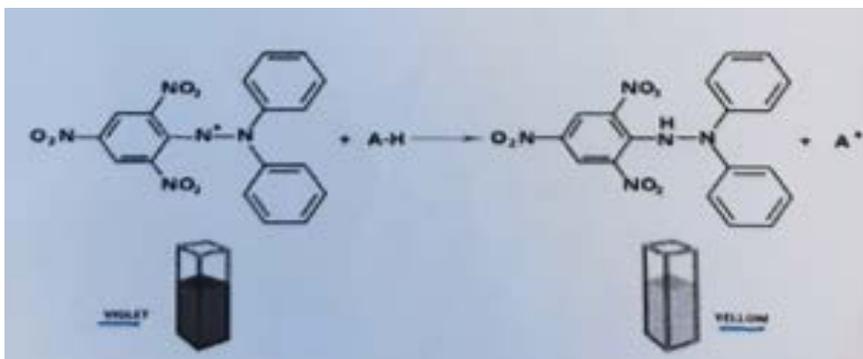
In questo caso viene utilizzato il radicale DPPH. Nella bevanda di soia ci sono composti ad attività anti-ossidante che riducono il DPPH a DPPH-H e questo è tanto maggiore quanto maggiore sarà la proprietà antiossidante del campione.

Il DPPH in soluzione si presenta di colore viola e diventa DPPH-H virando ad un giallo pallido. Composti antiossidanti (AOH) che sono capaci di trasferire un atomo di idrogeno al radicale, causano una decolorazione della soluzione. La quantità di DPPH-H formata dipende dalla concentrazione dell'antiossidante (Fig. 9).

Per la determinazione è stata usata la metodica descritta da Chen et al.(2010) con alcune modificazioni:

- Prelevare 800 µl di campione e aggiungere 1 ml di radicale DPPH (0,2 ml in metanolo) e vortexare.
- Preparare la soluzione del bianco con 1ml di DPPH e 800 µl di bevanda di soia.
- Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente e al buio
- Centrifugare a 12000 rpm per 5 minuti
- Prelevare 1 ml di surnatante e misurarne l'assorbanza a 517 nm con uno spettrofotometro.
- La percentuale di riduzione del DPPH, e quindi dell'attività antiossidante del campione, è stata calcolata come segue:

$$[1 - A_{4517}(\text{campione})/A_{517}(\text{bianco})] \times 100$$



**Figura 9-** Riduzione del radicale DPPH a DPPH-H

L'analisi è stata effettuata per tutti i campioni alla fine dei differenti tempi di fermentazione e alla fine del periodo di stoccaggio a 4 °C.

### 3.4.2 DETERMINAZIONE DELL'ACIDO LATTICO DEL FERMENTATO

L'acido lattico si forma con la fermentazione lattica, l'acido lattico o lattato è un sottoprodotto del metabolismo anaerobico lattacido. Si tratta di un composto tossico per le cellule. Durante la fermentazione omolattica, il piruvato ottenuto nel processo di glicolisi viene convertito in lattato (o acido lattico). La fermentazione lattica è un processo metabolico attivato da alcuni batteri presenti nelle cellule animali in assenza di ossigeno. Dal punto di vista chimico, questa trasformazione interessa una molecola di glucosio e termina con la produzione dell'acido piruvico e dell'acido lattico. Grazie quindi a degli zuccheri dalla fermentazione lattica si ottiene acido lattico che di solito aumenta all'aumentare del tempo di fermentazione.

L'acido lattico presente nel campione viene titolato con NaOH 0.1 mole per litro seguendo la procedura descritta di seguito:

- Pesare 5 grammi di campione e diluire con
- 45 ml di acqua deionizzata.
- Aggiungere al campione diluito 6 gocce di fenolftaleina come indicatore di viraggio e mescolare la soluzione.
- Iniziare la titolazione aggiungendo la soluzione di NaOH 0.1 N goccia a goccia (Fig. 10) finché la
- soluzione diventa rosa persistente.
- Annotare il volume in ml di NaOH 0.1 N utilizzati per raggiungere il viraggio dell'indicatore e calcolare la concentrazione dell'acido lattico come segue:

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

Dove

- 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

L'analisi è stata effettuata per tutti i campioni alla fine dei differenti tempi di fermentazione e alla fine del periodo di stoccaggio a 4 °C.



**Figura 10-** Soluzione di NaOH 01 N. Si può notare il tipico colore rosa che viene assunto dalla bevanda aggiungendo al punto di viraggio dell'indicatore

### 3.4.3 DETERMINAZIONE DEL PH

IL pH si misura con lo strumento pH-metro (Fig. 11) seguendo i passaggi descritti di seguito:

- Per prima cosa si tara la sonda di misurazione del pH immergendola in una soluzione tampone a pH 4 e poi a pH 7
- Terminata la taratura, bisogna lavare la sonda accuratamente con acqua deionizzata
- Si procede con la misurazione del pH dei campioni inserendo la sonda nel campione stesso e si attende che il valore indicato sul monitor dello strumento sia stabile.



**Figura 11**-Dispositivo per misurare il pH

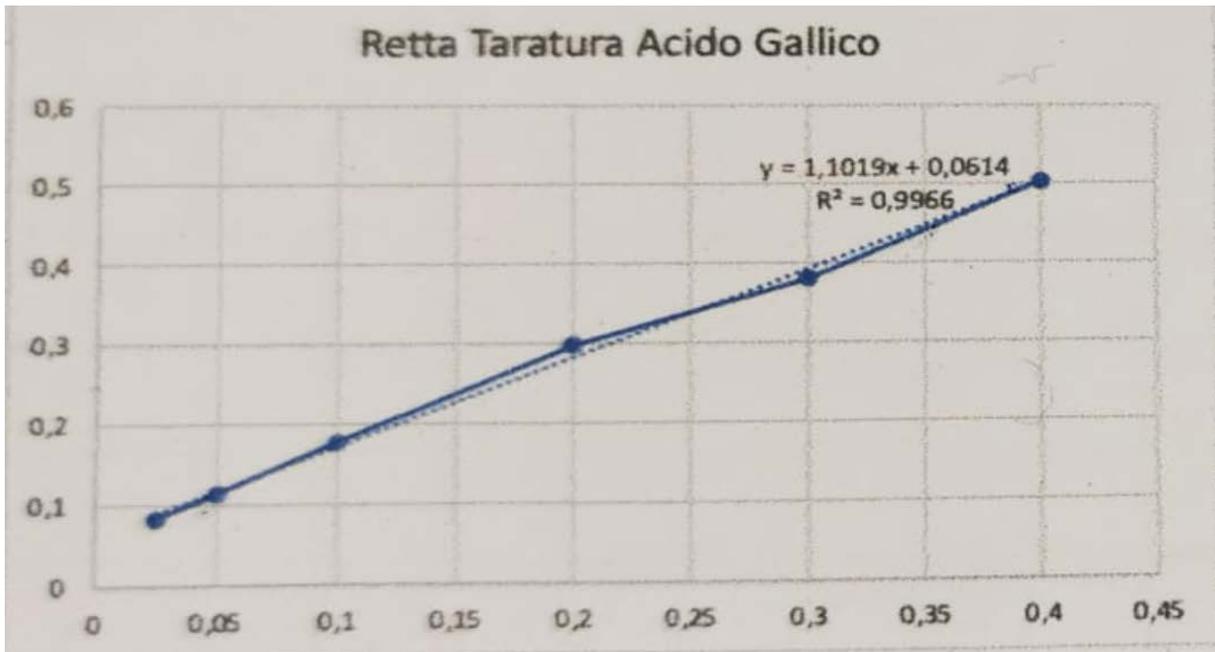
### 3.4.4 DETERMINAZIONE POLIFENOLI

I polifenoli, anche noti come vitamine P sono sostanze presenti in natura, questi infatti derivano dal metabolismo secondario delle piante, nelle quali giocano un ruolo importante sia per la difesa della pianta per la produzione di fitoalessine, sia come barriera contro una invasione da eventuali patogeni. Come molte altre sostanze hanno delle proprietà benefiche per la salute: sono degli antiinfiammatori e antiossidanti, proteggono le cellule dallo stress ossidativo, ma hanno anche capacità antimicrobiche e possono tenere sotto controllo i livelli di colesterolo. . (<https://www.my-personaltrainer.it/integratori/polifenoli.html>)

- In un matraccio da 50 ml, aggiungere 50 ml di campione
- Aggiungere 25 ml di h2o deionizzata, 2,5 ml di reattivo di Folin e 10 ml di carbonato di sodio anidro Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20%
- Portare a volume di 50 ml aggiungendo acqua deionizzata
- Lasciare i matracci a temperatura ambiente per 30 minuti (Fig. 12)
- Omogenizzare il campione
- Trasferite 1 ml di campione in cuvette per lettura allo spettrofotometro
- Leggere l'assorbanza del campione a 760nm
- Una volta annotato il valore di assorbanza del campione, si calcola la concentrazione dei polifenoli presenti nel campione usando una retta di taratura preparata a diverse concentrazioni note di acido gallico (Fig. 13)



**Figura 12-** reazione dei polifenoli dopo aggiunta di carbonato di sodio al 20% anidro Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>



**Figura 13-**Retta di taratura per il calcolo della concentrazione dei polifenoli

### 3.4.5 DETERMINAZIONE DEGLI ZUCCHERI RIDUCENTI

In natura esistono molti esempi di zuccheri riducenti a partire dal glucosio, al fruttosio ma anche alcuni saccaridi come il lattosio. Questi zuccheri hanno la particolarità di possedere un gruppo aldeidico o chetonico che conferisce loro la caratteristica di agire come agenti riducenti. Quest'ultimi sono usati in molti processi di fermentazione, come quella lattica, da cui riescono ad ottenere acido lattico e altri prodotti. .

Procedura per la determinazione degli zuccheri riducenti (Fig. 14):

- Mettere 1 ml di campione + 2 ml di DNS (acido 3,5 dinitrosalicinico) in uno sterilin
- Portare il campione ad ebollizione e bollire per 5 minuti
- Raffreddare il campione a temperatura ambiente
- Trasferire 1 ml di campione in cuvette spettrofotometriche e misurare l'assorbanza del campione a 540nm
- Una volta annotato il valore di assorbanza del campione, calcolare la concentrazione di zuccheri riducenti presenti nel campione usando una retta di taratura preparata a diverse concentrazioni note di glucosio



**Figura 14-** Preparazione della prova degli zuccheri riducenti

### 3.4.6 DETERMINAZIONE DELL'ACIDO ACETICO

Per saggiare la quantità di acido acetico prodotto dalla fermentazione è stato utilizzato il kit Megazyme (Megazyme Ltd., Sydney, Australia) . Il campione è stato preparato seguendo il protocollo sottostante:

- Si pesano 5 grammi di campione all'interno di un matraccio da 100 ml
- Aggiungere al matraccio 50 ml di acqua distillata
- I matracci devono essere riscaldati a 50-60°C in un bagnetto termostatico per 20 minuti agitandoli di tanto in tanto.
- Lasciare raffreddare fino a temperatura ambiente
- Portare a volume di 100 ml con acqua deionizzata e mettere i matracci a 4 °C per 30 minuti
- Filtrare la soluzione con carta filtro
- Il campione ora è pronto per essere analizzato

Nel kit è presente:

1. Bottiglia 1: Buffer (30 ml, pH 8,4) più acido ò-malico e sodio azide (0,02% p/v ) soluzione 1
2. Bottiglia 2: NAD più ATP, PVP e CoA (disciolti in 5,5 ml di acqua distillata soluzione 2
3. Bottiglia 3: L-malato deidrogenasi più citrato sintasi (1,1 ml) soluzione 3
4. Bottiglia 4: acetil-coenzima A sintetasi (1,1 ml) soluzione 4
5. Bottiglia 5: soluzione standard di acido acetico (5ml, 0,10 g/ml) soluzione 5

L'analisi del campione è stata eseguita seguendo il protocollo riportato nella tabella sottostante.

In cuvetta	Bianco	Campione	Controllo
● <b>Acqua distillata</b>	● 1.05 ml	● 1.00 ml	● 1.00 ml
● <b>Soluzione 5</b>	● /	● /	● 0.05 ml
● <b>Campione</b>	● /	● 0.05 ml	● /
● <b>Soluzione 1</b>	● 0.25 ml	● 0.25 ml	● 0.25 ml
● <b>Soluzione 2</b>	● 0.10 ml	● 0.10 ml	● 0.10 ml
Mixare e leggere l'assorbanza A0 a 340 nm approssimativamente dopo 3 minuti e far partire la reazione aggiungendo:			
● <b>Soluzione 3</b>	● 0.01 ml	● 0.01 ml	● 0.01 ml
Mixare e leggere l'assorbanza A1 a 340 nm approssimativamente dopo 4 minuti e far partire di nuovo la reazione con aggiunte di:			
● <b>Soluzione 4</b>	● 0.01 ml	● 0.01 ml	● 0.01 ml
Mixare e leggere l'assorbanza A2 a 340 nm approssimativamente dopo 12 minuti. Se la reazione non si ferma leggere di nuovo l'assorbanza ad intervalli di 4 minuti fino ad un massimo di 20 minuti			

**Tabella 4-** protocollo per la determinazione dell'acido acetico

L'acetil-coenzima A sintetasi (ACS) in presenza di adenosina- 5'- trifosfato (ATP) e del CoA converte l'acido acetico in acetil-CoA con la formazione di adenosina- 5'-monofosfato (AMP) e pirofosfato. L'enzima citrato sintasi in presenza di acetil-CoA converte l'ossoalacetato in citrato. L'ossoalacetato richiesto nella reazione è formato a partire da L-malato e nicotinammide – adenina dinucleotide in presenza di diL- malato deidrogenasi (L-MDH).

In questa reazione il NAD è ridotto a NADH. Si misura l'assorbanza a 340 nm del NADH prodotto.

In seguito occorre eseguire dei calcoli con la formula riportata di seguito:

$$\Delta A_{\text{acetic acid}} = \left[ (A_2 - A_0)_{\text{sample}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{sample}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{sample}}} \right] - \left[ (A_2 - A_0)_{\text{blank}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{blank}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{blank}}} \right]$$

**Concentrazione di acido acetico espressa in g/l =  $\Delta A_{\text{acido acetico}} \times 0,2707 \times F.D.$**

**$\Delta A_{\text{acido acetico}} \times 0,2707 \times F.D.$**

Con F.D. = fattore di diluizione

### 3.4.7 DETERMINAZIONE DEI PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE

Al termine del periodo di stoccaggio sono stati analizzati i prodotti secondari di fermentazione quali acetaldeide, etilacetato, n-propanolo, isobutolo, acetoino, alcol amilico e alcol isoamilico. Ogni composto è stato quantificato attraverso la microestrazione in fase solida (HS-SPME) seguendo la procedura descritta da Dertili et al., (2017) con alcune modifiche. In dettaglio, 5 ml di kefir omogenizzato, 1 g di NaCl e 162 mg/l di 1-pentanololo (usato come standard) sono stati posti in una vial di vetro da 20 ml e poi sigillata. Il campione è stato miscelato a 120 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente, poi la vial è stata posta a 55 °C con la fibra HS-SMPE esposta allo spazio di testa per 50 minuti.

I composti sono stati desorbiti inserendo la fibra in divinilbenzene/carbossene/polidimetilsilossano (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) nell'iniettore del gascromatografo (GC-2014, Shimadzu, Kjoto, Giappone).

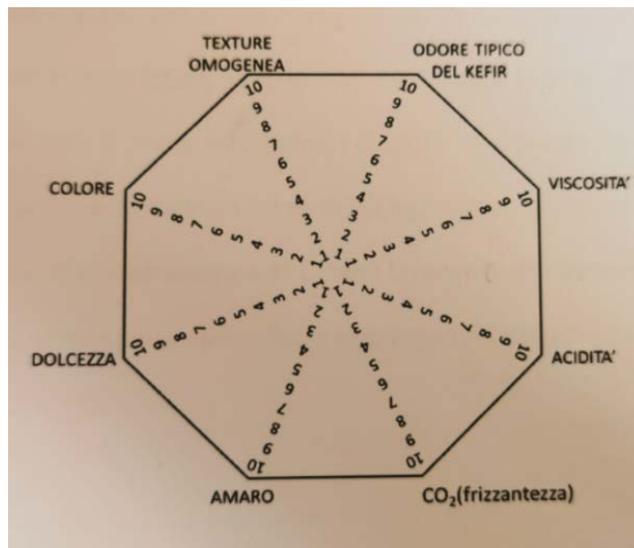
La colonna utilizzata era: 0,25 µm Supelcowax 10, lunghezza 60 m, diametro interno 0,32 mm. Ciascun composto è stato quantificato mediante confronto con una curva di calibrazione esterna.

### 3.4.8 DETERMINAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI POLINSATURI

I campioni di kefir, a fine del periodo di stoccaggio a 4 °C, sono stati sottoposti ad analisi qualitativa e quantitativa per il contenuto di acidi grassi. In particolare, i campioni sono stati sottoposti a trattamento di rottura della membrana cellulare dei microrganismi contenuti nel campione per analizzare il contenuto di acidi grassi totale (intracellulare e non) del campione stesso. Dopodiché, i campioni sono stati sottoposti a transesterificazione con metossido di sodio in soluzione poi neutralizzati ed estratti con esano. La fase organica ottenuta è stata analizzata mediante gascromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC/FID). Il limite di quantificazione per gli acidi grassi 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 sono stati espressi in g/100 g (sul campione tal quale) e in % sul grasso.

### 3.5 ANALISI SENSORIALE

Al termine delle 4 settimane di stoccaggio, tutti i kefir, sottoposti ai differenti tempi di fermentazione (24,48 e 72 ore), sono stati sottoposti ad analisi sensoriale. Sono stati presi in considerazione i principali descrittori riguardanti l'aspetto visivo (ossia il colore la viscosità), le note aromatiche gusto-olfattive come odore (il kefir ha un odore tipico), dolcezza, acidità, amaro e la frizzantezza ed infine è stata valutata anche la gradevolezza complessiva del fermentato (Fig.13). Per la prova sono stati "arruolati" un gruppo eterogeneo di assaggiatori, esperti e non e di età compresa fra i 65 e 25 anni, chiamato ad esprimere un giudizio per ciascun descrittore con un punteggio da 1 (minimo) a 10 (massimo) (Fig. 15).



**Figura 15-** Principali caratteristiche dell'analisi sensoriale.

### 3.6 ANALISI STATISTICA

I dati sperimentali sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) utilizzando il pacchetto software statistico JMP® 11. Le differenze significative sono state determinate utilizzando i Duncan's test con associati valori di  $p$ -value <0,05.

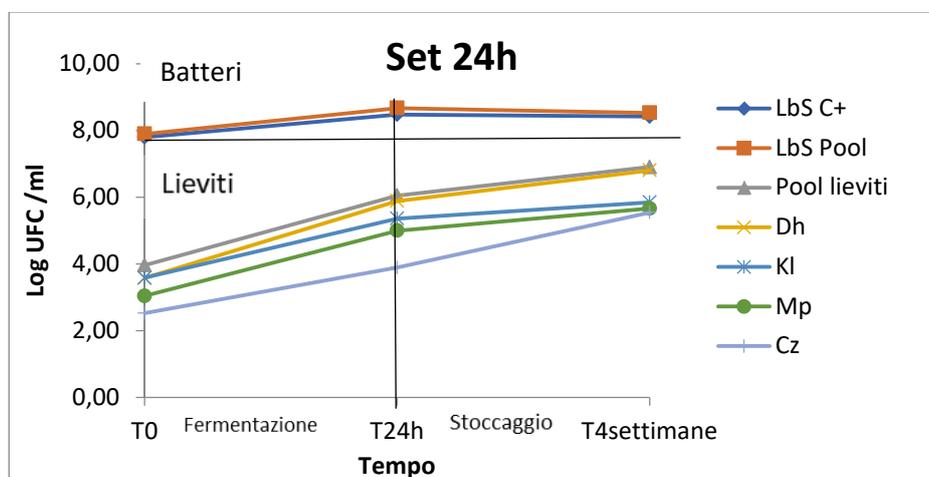
## CAPITOLO 4-RISULTATI E DISCUSSIONE

## 4.1 VALUTAZIONE DELLA CINETICA FERMENTATIVA

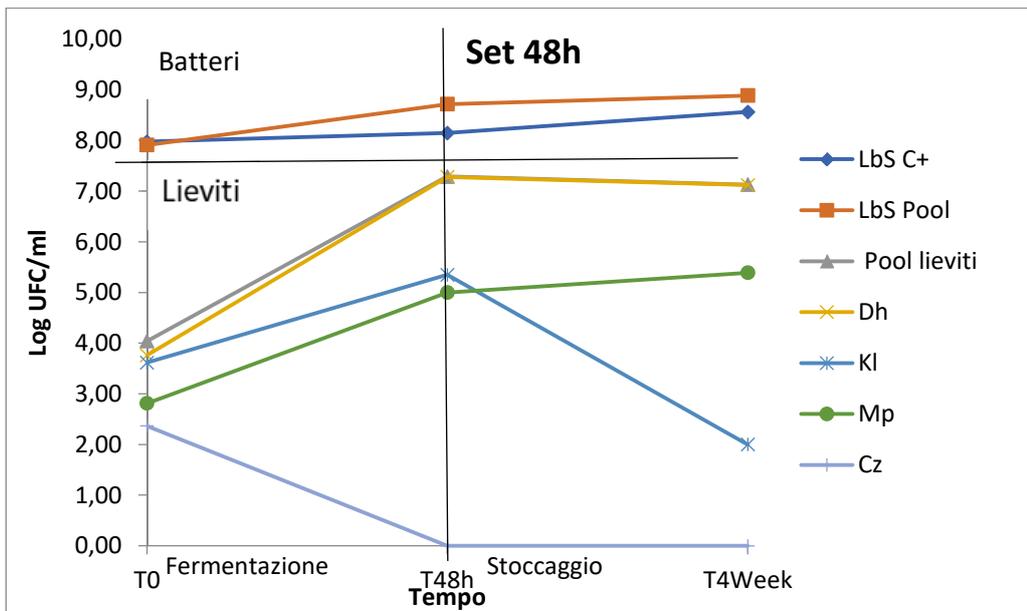
Tutte le prove sono state sottoposte a conta vitale su piastra per valutare la cinetica fermentativa dei lieviti e del battere, la loro interazione e la loro vitalità/concentrazione fino alla fine del periodo di stoccaggio, corrispondente alla shelf-life del prodotto stesso.

Per tutte le prove, le conte sono state effettuate al termine del processo fermentativo (24, 48 e 72 ore) e dopo il periodo di stoccaggio di 4 settimane (Fig. 14, 15, 16). Riguardo le prove lasciate fermentare per 24 h, i risultati della cinetica microbica sono riportati in Figura 14. In particolare, il battere, sia in coltura pura che in co-fermentazione con il pool di lieviti, ha mostrato un incremento della concentrazione iniziale di circa mezzo ordine di grandezza, passando da circa 7.80 Log UFC/ml al tempo T0 a circa 8.50 Log UFC/ml dopo 24 ore di fermentazione, valore che si è mantenuto pressoché costante fino la fine dello stoccaggio. Tale risultato evidenzia come la cinetica microbica del battere non sia stata influenzata dalla presenza dei lieviti, inoltre essi rimangono vivi e vitali ad una concentrazione di circa  $10^8$  UFC/ml fino al termine della shelf-life del prodotto, rafforzando la valenza probiotica del prodotto stesso.

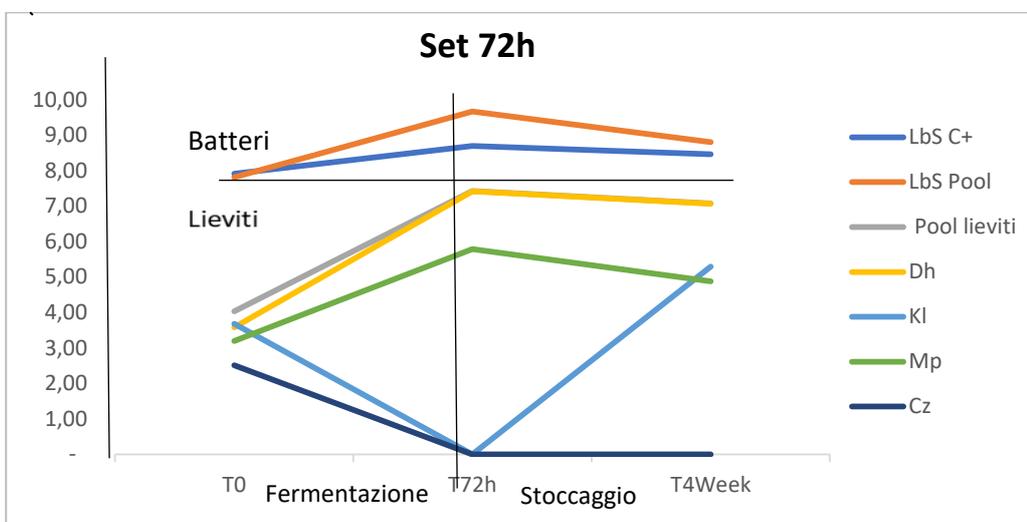
La cinetica fermentativa di *L. casei* Shirota nelle prove fermentate per 48 h e 72 h sono riportate in fig. 15 e 16, rispettivamente. In particolare, per entrambi i set di fermentazione, l'andamento del battere in coltura pura è pressoché simile a quello riscontrato nelle prove fermentate per 24 h. Invece, al contrario di quanto riscontrato per le prove fermentate 24 h, la crescita del battere sembra essere stimolata in co-coltura con il pool di lieviti, infatti al termine della fermentazione la sua concentrazione raggiunge valori di 8.90 Log UFC/ml per le 48 h di fermentazione (Fig. 15) e 9.70 Log UFC/ml per le 72 h di fermentazione (Fig. 16). Probabilmente la presenza dei lieviti, i quali dopo 48 h e 72 h di fermentazione iniziano ad andare in contro ad autolisi, forniscono fonti nutritive che stimolano la crescita di *L. casei* Shirota.



**Figura 16-** andamento della crescita dei lieviti e del battere nelle prove sottoposte a 24 ore di fermentazione (set 24 ore). Lbs C+= *Lactobacillus casei* Shirota in coltura pura, Lbs pool= *Lactobacillus casei* Shirota in co-cultura con il pool dei lieviti + battere, Pool lieviti = insieme delle specie di lievito inoculate nel pool, Dh = *Debaryomyces hansenii* 36 e 78 nel pool, Kl= *Kluyveromices lactis* 80 nel pool, Mp = *Metschnikowia pulcherrima* 50 nel pool, Cz = *Candida zeylanoides* 13 nel pool.



**Figura 17-** andamento della crescita dei lieviti e del battere nelle prove sottoposte a 24 ore di fermentazione (set 24 ore). Lbs C+= *Lactobacillus casei* Shirota in coltura pura, Lbs pool= *Lactobacillus casei* Shirota in co-cultura con il pool dei lieviti + battere, Pool lieviti = insieme delle specie di lievito inoculate nel pool, Dh = *Debaryomyces hansenii* 36 e 78 nel pool, Kl= *Kluyveromices lactis* 80 nel pool, Mp = *Metschnikowia pulcherrima* 50 nel pool, Cz = *Candida zeylanoides* 13 nel pool.



**Figura 18-** Andamento della crescita dei lieviti e del battere nelle prove sottoposte a 72 ore di fermentazione (set 24 ore). Lbs C+= *Lactobacillus casei* Shirota in coltura pura, Lbs pool= *Lactobacillus casei* Shirota in co-cultura con il pool dei lieviti + battere, Pool lieviti = insieme delle specie di lievito inoculate nel pool, Dh = *Debaryomyces hansenii* 36 e 78 nel pool, Kl= *Kluyveromyces lactis* 80 nel pool, Mp = *Metschnikowia pulcherrima* 50 nel pool, Cz = *Candida zeylanoides* 13 nel pool.

Riguardo la cinetica di crescita dei lieviti nel tempo, questi hanno mostrato una crescita variabile, ceppo specifica. In tutte le prove con i tre differenti tempi di fermentazione, il pool ha mantenuto un andamento di crescita pressoché costante dall'inizio della fermentazione fino alla fine dello stoccaggio, raggiungendo valori compresi tra 6.80 Log UFC/ml e 7.10 Log UFC/ml. Analizzando nel dettaglio la dinamica di ciascuna specie di lievito costituente il pool, la specie *D. hansenii* ricalca quanto riportato per il pool in generale, prendendo il sopravvento rispetto alle altre specie, nella prime 24 ore passa da una concentrazione di 3,87 Log UFC/ml al tempo T0, a 5,89 Log UFC/ml nelle prime 24 ore fino a raggiungere una concentrazione di 6,81 Log UFC/ml alla fine del periodo di stoccaggio, dopo le 4 settimane. Questo microorganismo ha avuto un incremento ancora più evidente dopo le 48 ore di fermentazione, arrivando a una concentrazione di 7.28 Log UFC/ml partendo dall'inoculo iniziale di 3.76 Log UFC/ml mentre dopo il periodo di stoccaggio si denota una leggera diminuzione arrivando a una concentrazione di 7.12 Log UFC/ml. (Fig. 14, 15, 16), mentre variabile è stata la cinetica di crescita delle altre specie utilizzate, in funzione del tempo di fermentazione. In particolare, nelle prove fermentate per 24 h (Fig. 14) le specie *K. lactis* e *M. pulcherrima* aumentano la loro concentrazione di circa due ordini di grandezza, raggiungendo valori intorno a 5.00 Log UFC/ml a fine fermentazione. Per quanto riguarda *K. lactis* 80 questa specie rimane predominante fino alle 48 ore di fermentazione. Questo microorganismo ha un andamento diverso rispetto a tutti gli altri lieviti presenti nel pool. Durante il primo periodo di fermentazione passa da una concentrazione dell'inoculo iniziale di 3.58 Log UFC/ml a 5.35 Log UFC/ml dopo le 24 ore di fermentazione, alla fine dello stoccaggio presenta un valore di 5.85 Log UFC/ml. *K. lactis* 80 mostra un comportamento diverso per il periodo di fermentazione delle 48 ore partendo da un inoculo iniziale con una concentrazione di 3.62 Log UFC/ml, passa da 5.35 Log UFC/ml fino ad arrivare a una concentrazione di 2.00 Log UFC/ml a fine dello stoccaggio. Il lievito non è stato rilevato al termine delle 72 h di fermentazione per poi essere di nuovo rilevato a fine stoccaggio con una concentrazione di 5.30 log UFC/ml (Fig. 16). Questa discrepanza di concentrazione tra fine fermentazione e fine stoccaggio probabilmente è dovuta all'incapacità del metodo usato di rilevare concentrazioni molto basse di *K. lactis* (effetto negativo delle 72 h di fermentazione) in un pool microbico dove le altre specie sono a concentrazione nettamente superiore.

La specie *Metschnikowia pulcherrima* 50, si può notare come, anche questo lievito non-*Saccharomyces* tenda ad avere un incremento di concentrazione per ogni set di prove. Nel set delle 24h si ha un inoculo iniziale con concentrazione di 3.04 Log UFC/ml. a 5.00 Log UFC/ml alla fine del tempo di fermentazione,

fino a 5.66 Log UFC/ml dopo le 4 settimane. Per il set delle 48 ore si ha un inoculo iniziale al tempo T0 di 2.81, Log UFC/ml, 5.00 Log UFC/ml a 48 h fino a 5.89 Log UFC/ml dopo le quattro settimane. Infine per il set delle 72 ore l'inoculo iniziale presenta una concentrazione di 3.89 Log UFC/ml (T0) fino a 4.39 Log UFC/ml al termine del periodo di stoccaggio. In questo caso il lievito subisce un leggero decremento di concentrazione, anche se rimane uno dei lieviti più rappresentativi del pool che è stato selezionato. La specie *C. zeylanoides* mostra una cinetica fermentativa più lenta ma costante, infatti cresce di circa un ordine di grandezza a fine fermentazione per poi continuare a crescere durante il periodo di stoccaggio e raggiungere valori confrontabili con quelli di *K. lactis* e *M. pulcherrima* (circa 5.50 log UFC/ml). Riguardo gli altri due tempi di fermentazione, *M. pulcherrima* mostra una cinetica fermentativa confrontabile con le prove fermentate 24 h, invece è evidente l'effetto della temperatura di fermentazione sulle altre due specie di lievito. A subire negativamente questa condizione di fermentazione è soprattutto la specie *C. zeylanoides* che scompare completamente già a fine delle 48 h di fermentazione (Fig. 15). In tutte le prove infatti *C. zeylanoides* mostra una difficoltà nella crescita rispetto all'inoculo iniziale, arrivando a una concentrazione di quasi 0.00 Log UFC/ml nel set delle 48 e 72 ore. L'andamento di *C. zeylanoides* nelle prove fermentate per 72 h riflette quello delle prove a 48 h.

## 4.2 ANALISI CHIMICHE

I principali caratteri chimici analizzati sono stati il pH, l'acido acetico, l'acido lattico, la determinazione dell'attività antiossidante (come % di riduzione del radicale DPPH) e la determinazione dei polifenoli a fine fermentazione (Tabella 5) ed a fine periodo di stoccaggio (Tabella 6). Inoltre, solo a fine periodo di stoccaggio, tutti le prove sono state analizzate per il contenuto in acidi grassi (Tabella 7).

La produzione del kefir, partendo dalla bevanda di soia è stata valutata e confermata grazie alla formazione del coagulo in tutte le prove (Fig. 18), per ogni tempo di fermentazione, sia a fine fermentazione che dopo le 4 settimane (fine stoccaggio). Questo coagulo formatosi col passare delle ore di fermentazione è una conseguenza dell'abbassamento del pH dovuto ai processi di fermentazione ad opera del battere *Lb. Casei Shiota*. Durante tutto il periodo trascorso fino alla fine delle 4 settimane il prodotto, conservato a 4°C, ha mostrato una riduzione del pH seppur in modo graduale fino a raggiungere alla fine del periodo di stoccaggio valori intorno a 4.00. come si vede in figura (fig. 19) il pH dei vari tempi di fermentazione e dello stoccaggio subisce una variazione.

Riguardo il valore di pH, i tre set di fermentazione (24h, 48h e 72h) a fine della fase fermentativa hanno mostrato valori differenti, in particolare, la prova controllo C+ (*Lb. casei Shiota*) raggiunge valori di pH intorno a 6.40-6.60, indipendentemente dal tempo di fermentazione. Al contrario, la prova pool mostra valori statisticamente differenti a seconda del tempo di fermentazione, infatti il pool che ha fermentato 24h mostra un valore di pH paragonabile a quello del C+, invece il pool che ha fermentato 48h e 72h mostra un valore di pH di circa 2 punti inferiore. Questi valori di pH, e quindi di acidificazione del fermentato, riflettono il contenuto di acido lattico ed acetico.

Dai risultati riportati la concentrazione di acido lattico è aumentata nel corso delle settimane. Relativamente alle prove che contenevano solo il battere la concentrazione di acido lattico non ha subito una variazione così alta, si è mantenuta costante sia alla fine del periodo di fermentazione delle diverse ore che alla fine del periodo di stoccaggio. Il tempo a 24h di fine fermentazione è di 0.16, mentre alla fine delle 4 settimane raggiunge 0.18, vi è un piccolo aumento ma non significativo. Relativamente alle prove che contengono il pool si nota come ci sia una forte variazione di concentrazione di acido lattico, questo ha visto un forte aumento nel corso del tempo e della conservazione nella cella fredda, la produzione maggiore si è verificata nelle prove con tempo di fermentazione di 72 ore. In questa prova si può vedere una significativa differenza rispetto a un primo tempo di fermentazione, in cui la concentrazione di acido lattico era intorno a 0.68 g/l, mentre alla fine dello stoccaggio arriva valori di 1,26-2,02 g/l. da questo si può dedurre che, molto probabilmente, alcuni lieviti come anche il battere, sono impegnati in questo aumento di concentrazione di acido lattico. Il kefir con un aumento di acido lattico denoterà anche un gusto diverso, leggermente più acido e meno dolce. Quindi Il più basso contenuto di acido lattico è stato rilevato nelle prove C+ 24h di

fermentazione, seguito dalle prove C+ 48h e 72h raggiungendo valori di circa 0.20-0.30 g/l. Al contrario, le prove pool mostrano una produzione di acido lattico maggiore rispetto alle prove C+, acido lattico che aumenta con l'aumentare del tempo di fermentazione. Non sono state osservate differenze statisticamente significative nei valori di acido acetico fra le prove C+ e pool a tutti i tempi di fermentazione (Tabella 5).

Riguardo a variazioni di pH e acidi (acetico) durante il periodo di conservazione a 4 °C, è stata osservata una leggera riduzione del pH delle prove C+ 24h e 48h, riduzione che si è accentuata di circa 1 punto nella prova C+ 72h. Anche tutte le prove pool hanno mostrato una riduzione del pH rispetto a fine fermentazione, fino a raggiungere valori compresi tra 3.90-4.20. Durante lo stoccaggio a 4 °C non sono state osservate grandi variazioni nel contenuto di acido acetico rispetto a quello rilevato a fine fermentazione. Tutte le prove, ed a tutti i tempi di fermentazione, hanno mostrato un contenuto di acido acetico < 0.1 g/l (Tabella 6). Nel kefir C+ 24 h si vede che la concentrazione di acido acetico raggiunge valori a fine fermentazione di 0.04 mg/ml a valori di 0.31 mg/ml. Per la prova in cui è presente anche il pool di lieviti la variazione non è così marcata, passando da valori di 0.03 mg/ml a 0.04 mg/l alla fine del periodo di stoccaggio. Anche nelle altre prove si può sottolineare una piccola variazione della concentrazione di acido acetico, dove nel caso delle 48 ore si ha un aumento più marcato nella prova dove è presente il battere alla fine del tempo di fermentazione, mentre alla fine del periodo di stoccaggio è la prova con il pool che presenta una maggiore concentrazione di acido acetico. I valori della prova a 72 ore passano da 0.09 mg/ml a 0.042 mg/ml, in questo caso mentre nella prova preliminare di fermentazione si ha una produzione considerevole a carico della prova col solo battere, alla fine delle quattro settimane si ha una concentrazione nella prova con il pool e quella con il controllo molto simile, restando però la prova in cui sono stati aggiunti i 5 ceppi di lieviti con valori lievemente superiori di acido acetico.

Riguardo l'attività antiossidante del kefir, riportata come percentuale di riduzione del radicale DPPH e calcolata rispetto a quella della bevanda di soia non fermentata, è stata valutata a fine fermentazione (Tabella 5) ed a fine periodo di stoccaggio a 4 °C (Tabella 6). Le prove C+ e pool che hanno fermentato 24h e 72h non mostrano differenze significative per l'attività antiossidante, che si aggira a valori intorno a 35-39 % di riduzione del DPPH. La prova C+ 48h è quella che ha mostrato la minor attività antiossidante, mentre il pool 48h è quella che ne ha mostrata di più (42.6 % DPPH). Confrontando l'attività antiossidante rilevata a fine fermentazione con quella a fine stoccaggio, essa si riduce in tutte le prove ed a tutti i tempi di fermentazione con il passare del tempo a 4 °C. In particolare, diminuisce considerevolmente, anche di 20 punti percentuali, nelle prove che hanno fermentato 24h. La prova C+ 24h passa da 39.5 % di riduzione del DPPH a 37.26 % . Mentre il pool 24h passa da 39.49 % a 26.75% di attività antiossidante. In generale, sia le prove C+ che pool 48h sono quelle che mantengono l'attività antiossidante più stabile nel tempo.

I polifenoli sono sostanze che hanno un potere benefico per la salute essendo degli ottimi antiossidanti e antinfiammatori. I risultati riportati in Tabella 5 e Tabella 6 mostrano il contenuto in polifenoli dei kefir alla fine dei diversi tempi di fermentazione e alla fine del periodo di stoccaggio, rispettivamente. A fine fermentazione, le prove C+ 24 h e C+ 48h hanno mostrato un quantitativo di polifenoli maggiore (0.80 g/l c.a.) rispetto alle rispettive prove pool, tale quantitativo diventa invece confrontabile tra C+ e pool fermentate 72h con valori di circa 0.40-0.50 g/l. Al termine della fine di stoccaggio, sia le prove C+ che pool a 24h e 72h hanno mostrato piccole variazioni nel contenuto in polifenoli rispetto a fine fermentazione. Invece le prove fermentate 48h sono quelle che mostrano un incremento di circa 0.10 g/l durante lo stoccaggio, arrivando ad una concentrazione di 0.90 g/ c.a. e 0.50 g/l c.a. del C+ e pool, rispettivamente, in questo caso specifico il quantitativo di polifenoli sembra aumentare alla fine del periodo di stoccaggio, forse denotando una maggiore attività e capacità dei microorganismi di partecipare alla riduzione degli eventuali radicali presenti nel campione.

La concentrazione di zuccheri riducenti è variabile sia tra le prove di controllo e pool sia tra i vari tempi di fermentazione. Tutte le prove fermentate 24h hanno mostrato un contenuto in zuccheri riducenti intorno a 21 g/l, senza differenze fra la prova C+ e pool. Invece nelle prove fermentate 48h e 72h, il pool è quello che ne produca una quantità circa doppia rispetto alla prova C+ con lo stesso tempo di fermentazione. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che i lieviti nel pool, a differenza del battere, crescono maggiormente durante la fermentazione e quindi renderanno maggiore la disponibilità di zuccheri da utilizzare. In generale, il quantitativo di zuccheri riducenti al termine del periodo di stoccaggio si riduce, ad esempio, passano da 20.99 g/l a 19.96 g/l per il controllo C+ 24h, mentre per il pool 24h si ha una diminuzione di 5.29 g/l tra il tempo di fine fermentazione e la fine delle 4 settimane a 4°C. La diminuzione della concentrazione di questi zuccheri è stata più evidente per il pool 48h, passando da valori di 30.50 g/l a 16.58 g/l. Nell'ultima prova, quella a 72 h di fermentazione, vi è stato il cambiamento più evidente rispetto alle prime due prove. In questo caso vi è una forte diminuzione nel quantitativo di zuccheri riducenti presenti nel prodotto, infatti per il controllo i valori variano da 17.10 g/l a 9.17 g/l mentre per il pool la riduzione passa da 31.96 g/l a 10.69 g/l. La diminuzione del quantitativo degli zuccheri riducenti nel tempo è stata proporzionale al prolungarsi del periodo di fermentazione del prodotto.



**Figura 19-** Formazione del coagulo nel kefir di soia

Tempo di fermentazione	pH		Acido lattico g/l		%DPPH		Polifenoli g/l		Zuccheri riducenti g/l		Acido acetico g/l	
	C+	Pool di lieviti	C+	Pool di lieviti	C+	Pool di lieviti	C+	Pool di lieviti	C+	Pool di lieviti	C+	Pool di lieviti
T24 ore	6.59 ±0.03 <sup>a</sup>	6.23 ±0.06 <sup>c</sup>	0,17 ±0.01 <sup>d</sup>	0,19 ±0.01 <sup>dc</sup>	37.26 ±1,35 <sup>ab</sup>	39.49 ±0.90 <sup>ab</sup>	0.83 ±0.08 <sup>c</sup>	0.46 ±0.08 <sup>c</sup>	20.99 ±0.89 <sup>a</sup>	20.86 ±0.67 <sup>a</sup>	0.03 ±0.01 <sup>b</sup>	0,03 ±0,01 <sup>b</sup>
T48 ore	6.52 ±0.01 <sup>ab</sup>	4.82 ±0.03 <sup>d</sup>	0.28 ±0.18 <sup>c</sup>	0.47 ±0.00 <sup>b</sup>	30.25 ±8.56 <sup>b</sup>	42.68 ±0.00 <sup>a</sup>	0.84 ±0.08 <sup>cb</sup>	0.33 ±0.07 <sup>c</sup>	18.09 ±1.04 <sup>a</sup>	30.50 ±2.69 <sup>b</sup>	0.06 ±0.04 <sup>ab</sup>	0.03 ±0.06 <sup>b</sup>
T72 ore	6.39 ±0.05 <sup>bc</sup>	4.47 ±0.06 <sup>c</sup>	0.23 ±0.01 <sup>cd</sup>	0.67 ±0.00 <sup>a</sup>	36.62 ±0.45 <sup>ab</sup>	35.03 ±0.00 <sup>ab</sup>	0.43 ±0.07 <sup>b</sup>	0.48 ±0.01 <sup>a</sup>	17.10 ±0.66 <sup>b</sup>	31.28 ±0.69 <sup>b</sup>	0,09 ±0.01 <sup>a</sup>	0.09 ±0.08 <sup>a</sup>

**Tabella 5-** Analisi dei principali prodotti di fermentazione nelle varie prove. I valori che mostrano in apice, lettere differenti all'interno di alcune colonne sono significativamente differenti (Duncan test;  $p < 0,5$ ). I dati sono riportati con i valori medi  $\pm$  di deviazione standard.

pH	Acido lattico g/l	%DPPH	Polifenoli g/l	Zuccheri riducenti g/l	Acido acetico g/l
----	-------------------	-------	----------------	------------------------	-------------------

Tempo di fine stoccaggio	C+	Pool di lieviti	C+	Pool di lieviti	C+	Pool di lieviti	C+	Pool di lieviti	C+	Pool di lieviti	C+	Pool di lieviti
T24 ore	6.48 ±0.01 <sup>a</sup>	4.25 ±0.03 <sup>d</sup>	0.16 ±0.03 <sup>e</sup>	0.90 ±0.03 <sup>c</sup>	16.56 ±0.00 <sup>e</sup>	26.75 ±0.90 <sup>d</sup>	0.89 ±0.00 <sup>a</sup>	0.36 ±0.05 <sup>a</sup>	19.96 ±0.29 <sup>a</sup>	15.57 ±0.27 <sup>c</sup>	0.04 ±0.00 <sup>a</sup>	0.04 ±0.00 <sup>a</sup>
T48 ore	6.30 ±0.00 <sup>b</sup>	4.03 ±0.00 <sup>e</sup>	0.15 ±0.01 <sup>e</sup>	1.26 ±0.00 <sup>b</sup>	30.57 ±0.90 <sup>c</sup>	41.72 ±0.45 <sup>a</sup>	0.92 ±0.00 <sup>a</sup>	0.48 ±0.02 <sup>b</sup>	20.02 ±0.17 <sup>a</sup>	16.58 ±0.76 <sup>b</sup>	0.02 ±0.00 <sup>a</sup>	0.04 ±0.00 <sup>a</sup>
T72 ore	5.55 ±0.01 <sup>c</sup>	3.92 ±0.02 <sup>f</sup>	0.27 ±0.00 <sup>d</sup>	1.55 ±0.03 <sup>b</sup>	32.17 ±2.25 <sup>b</sup>	34.39 ±0,90 <sup>b</sup>	0.50 ±0.04 <sup>b</sup>	0.46 ±0.06 <sup>b</sup>	9.17 ±0.19 <sup>c</sup>	10.69 ±0.13 <sup>d</sup>	0.04 ±0.01 <sup>b</sup>	0.05 ±0.00 <sup>a</sup>

**Tabella 6-** Analisi dei principali prodotti di fine stoccaggio nelle varie prove. I valori che mostrano in apice, lettere differenti all'interno di alcune colonne sono significativamente differenti (Duncan test;  $p < 0,5$ ). I dati sono riportati con i valori medi  $\pm$  di deviazione standard.

#### 4.3 ANALISI DEGLI ACIDI GRASSI

Gli acidi grassi sono delle preziose molecole per l'organismo umano perché producono energia e sono anche mediatori del trasporto di alcune molecole non solubili come le vitamine, fondamentali per il buon funzionamento metabolico. I grassi sono presenti in molti alimenti sia quelli animali che quelli vegetali, occorre però fare una distinzione su alcuni tipi di acidi grassi come i grassi saturi e i grassi insaturi. Questi ultimi, che comprendono anche i grassi polinsaturi, sono formati al livello molecolare da più legami, a differenza di quelli saturi che presentano invece, un solo legame intramolecolare. Studi hanno evidenziato come una dieta ricca di grassi saturi possa favorire problemi al livello circolatorio e cardiovascolare, promuovendo un aumento del colesterolo "cattivo" (quantità alte di LDL) e una propensione maggiore ad ictus e infarti. Gli acidi grassi polinsaturi, oltre che a diversificarsi dagli insaturi per il maggior numero di doppio legami, sono molto importanti nelle diete dell'individuo. Sono, infatti, molto importanti nel prevenire le patologie cardiovascolari, nello sviluppo cerebrale neonatale e nella modulazione della risposta infiammatoria in quanto riducono la produzione delle citochine. Molti di questi sono conosciuti anche come  $\omega 3$  e  $\omega 6$  e sono molto importanti per regolare alcune funzioni cellulari come la permeabilità, la fluidità, entrano in gioco nella modulazione dei segnali cellulari, influenzano l'ossidazione, il quantitativo di colesterolo, in particolare sono importanti perché contribuiscono ad abbassare i livelli di LDL e ad alzare quelli di HDL (colesterolo "buono") nel sangue insieme ad effetti benefici sul funzionamento del fegato, inoltre se integrati con una dieta equilibrata diminuiscono il rischio di malattie cardiache e l'attività enzimatica (Chiaofalo B. et al., 2003).

In questa analisi è stata ricercata la concentrazione di alcuni tipi di acidi grassi tra cui gli insaturi e i saturi (Tabella 6) nei kefir dopo il periodo di 4 settimane a 4 °C. In generale, in ogni prova il contenuto di grassi saturi è stato inferiore rispetto alla concentrazione degli acidi grassi insaturi (polinsaturi e monoinsaturi) mostrando in tutte le prove un rapporto di acidi grassi polinsaturi/saturi di circa 3.50. Il pool fermentato 24h è quello che ha mostrato la maggiore concentrazione di acidi grassi insaturi, pari a 1.559 g/100g di kefir, tutte le altre prove, pool e C+ a differenti tempi di fermentazione, ne hanno prodotta una quantità pari a circa 1.100-1.200 g/100g. L'acido palmitico è noto per non essere un alleato della salute, infatti un effetto negativo che può portare è un aumento dell'effetto ipercolesterolemizzante, questo se assunto in grandi quantità aumenta il colesterolo LDL e aumenta i rischi di malattie cardiache e vascolari, tuttavia nelle analisi condotte la concentrazione di acido palmitico nelle varie prove ai diversi tempi di fermentazione non risulta alta e si mantiene costante nel tempo senza un aumento eccessivo nelle quantità, garantendo comunque una qualità del prodotto buona anche con il protrarsi delle ore di fermentazione. Anche l'acido mirisitico essendo un acido grasso saturo dovrebbe essere limitato nelle concentrazioni assunte giornalmente, anche in questo caso la concentrazione di questo acido grasso saturo rimane intorno a livelli molto bassi, garantendo e sottolineando che il prodotto nel tempo non diventi potenzialmente gravoso per la salute dell'organismo. L'acido benico e arachidico sono dei grassi saturi e si trovano in natura in molti alimenti, inclusi quelli vegetali, in questa prova non si riscontrano concentrazioni alte di questi due grassi per nessuna delle prove, si sottolinea un leggero aumento dell'acido arachidico tra il

controllo delle 24 ore e il pool delle 24 ore, mentre per tutte le altre prove il valore rimane simile a quello riscontrato nella prova con il solo battere al tempo di fermentazione di 24 ore. L'obiettivo di questo lavoro è produrre un prodotto che possa avere dei potenziali benefici anche sulla salute umana, questo viene sottolineato dalle varie analisi, ma in questo caso si sottolinea il contenuto di acidi grassi insaturi che non solo contribuiscono ad abbassare i livelli di LDL nel sangue ma alzano quelli del colesterolo "buono", hanno effetti benefici sul funzionamento del fegato e se integrati con una dieta equilibrata diminuiscono il rischio di malattie cardiache.

ACIDI GRASSI T4settimane (g/100g)					
	<i>C+ 24ore</i>	<i>POOL 24ore</i>	<i>C+ 48ore</i>	<i>POOL 48ore</i>	<i>POOL 72ore</i>
Acido miristico (14:0)	0,00134 ± 0,00070	0,00191 ± 0,00075	0,00151±0,00071	0,00130±0,00069	0,00145±0,00070
Acido palmitico (16:0)	0,170 ± 0,036	0,221 ± 0,044	0,173±0,036	0,167±0,035	0,164±0,035
Acido esadecenoico (16:1)	0,00108 ± 0,00068	0,00163 ± 0,00072	0,00111 ± 0,00068	0,00106±0,00067	0,00125±0,00069
Acido margarico (17:0)	0,00152 ± 0,00071	0,00199 ± 0,00076	0,00153±0,00071	0,00152±0,00071	0,00141±0,00070
Acido stearico (18:0)	0,068 ± 0,015	0,088 ± 0,019	0,310±0,050	0,067±0,014	0,066±0,014
Acido Octadecenoico (18:1)	0,306 ± 0,049	0,395 ± 0,057	0,310±0,050	0,300±0,049	0,293±0,049
Acido Octadecadienoico (18:2)	0,768 ± 0,0936	1,00 ± 0,12	0,781±0,097	0,759±0,095	0,744±0,093
Acido Arachidico (20:0)	0,0057 ± 0,0014	0,0070 ± 0,0016	0,0055±0,0013	0,0054±0,0013	0,0053±0,0013
Acido octadecatrienoico (18:3)	0,116 ± 0,025	0,155 ± 0,033	0,119±0,025	0,112 ± 0,024	0,0053±0,0013
Acido eicosenoico (20:1)	0,00208 ± 0,00077	0,00270 ± 0,00085	0,00213±0,00078	0,00197 ± 0,00076	0,00224±0,00079
Acido beenico (22:0)	0,0060 ± 0,0014	0,0079 ± 0,0018	0,0057±0,0014	0,0058 ± 0,0014	0,0055±0,0013
Acido lignocetrico (24:0)	0,00158 ± 0,00072	0,00207 ± 0,00077	0,00156±0,00071	0,00141 ± 0,00070	0,00153±0,00071
Acidi grassi saturi	0,254 ± 0,039	0,330 ± 0,048	0,258±0,039	0,236 ± 0,036	0,245±0,038
Acidi grassi monoinsaturi	0,309 ± 0,049	0,399 ± 0,057	0,313±0,050	0,288 ± 0,048	0,297±0,049
Acidi grassi polinsaturi	0,884 ± 0,099	1,16 ± 0,13	0,90±0,10	0,832 ± 0,094	0,858±0,096
Rapporto acidi grassi polinsaturi / acidi grassi monoinsaturi*	2,86 ± 0,56	2,91 ± 0,53	2,88±0,56	2,89 ± 0,58	2,89±0,58
Rapporto acidi grassi polinsaturi / acidi grassi saturi	3,48 ± 0,66	3,52 ± 0,65	3,49±0,66	3,52 ± 0,65	3,50±0,67

**Tabella 7-** contenuto di acidi grassi nei vari kefir ottenuti con diversi tempi di fermentazione

\* Il pacchetto software statistico JMP® 11 non ha evidenziato differenze significative tra i diversi campioni

#### 4.5-PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE

In questa prova sono stati valutati i principali prodotti secondari di fermentazione: acetaldeide, n-propanolo, isobutanolo, alcol amilico, alcol isoamilico e acetoino. I risultati sono riportati nella Tabella 7. In tutti i kefir prodotti con la bevanda di soia sono stati rilevati in maggiore quantità n-propanolo ed etilacetato.

Il quantitativo più alto di n-propanolo è stato riscontrato nella prova pool, sia fermentato 24h, 48h e delle 72h, con valori di 783.00 mg/l, 1247.13 mg/l e 1451,52mg/l, rispettivamente. Il valore di questo composto nelle prove C+ è stato molto inferiore, intorno a 22.00-24.00 mg/l. Allo stesso modo, l'etilacetato è stato rilevato maggiormente nelle prove pool 24h e 48h, ad una concentrazione di circa 128.00 mg/l e 160.84 mg/l, rispettivamente. Invece C+ ha prodotto etilacetato intorno a 12.00-15.78 mg/l, quest'ultimo valore corrisponde alla prova delle 72h.

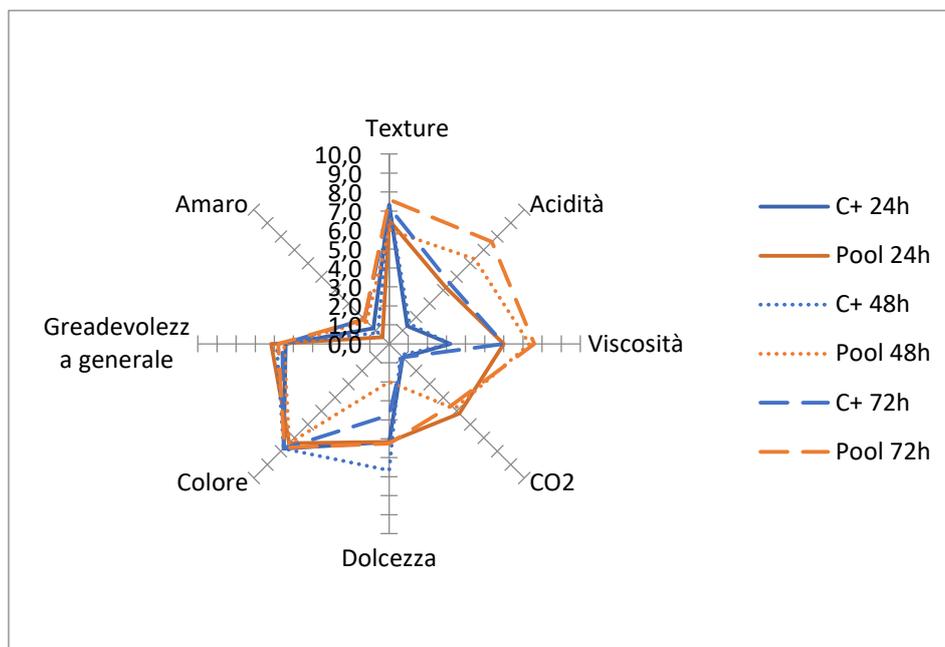
Riguardo acetaldeide, isobutanolo e alcol amilico, sono stati rilevati solamente nelle prove pool, indipendentemente dal tempo di fermentazione, con valori compresi fra 9.00 mg/l e 26.26 mg/l, il valore è riferito al tempo delle 72h, a sottolineare l'importanza dei lieviti nel conferire al prodotto finale un bouquet aromatico complesso e unico. In riferimento all'alcol isoamilico, C+ e pool hanno evidenziato minime differenze riguardo il contenuto tra i vari tempi di fermentazione, con produzione di questo composto di circa 1 mg/l maggiore nelle fermentazioni 48h rispetto a 24h, mentre non è stato determinato per il tempo delle 72h. L'acetoino non è stato rilevato in nessuno dei kefir analizzati. In generale, considerando la qualità e quantità dei prodotti secondari di fermentazione, la prova più complessa dal punto di vista aromatico è stata quella pool 48h.

PRINCIPALI PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE							
Campioni	Acetaldeide	Etilacetato	n-prpanolo	Isobutano	Alcol Amilico	Alcon Isoamilico	Acetoino
<b>C+24h</b>	Nd	12.11 ±0.08 <sup>b</sup>	24.04 ±0.77 <sup>d</sup>	Nd	Nd	3.03 ±0.09 <sup>a</sup>	Nd
<b>POOL 24h</b>	9.80 ±0.17 <sup>c</sup>	128.74 ±44.91 <sup>ab</sup>	783.27 ±82.81 <sup>c</sup>	10.20 ±2.14 <sup>a</sup>	16.17 ±5.66 <sup>a</sup>	3.05 ±0.08 <sup>a</sup>	Nd
<b>C+ 48h</b>	Nd	13.73 ±2.49 <sup>b</sup>	21.36 ±0.35 <sup>d</sup>	Nd	0.29 ±0.36 <sup>b</sup>	4.12 ±0.22 <sup>a</sup>	Nd
<b>POOL 48h</b>	12.30 ±1.05 <sup>b</sup>	160.84 ±39.86 <sup>ab</sup>	1247.13 ±182.88 <sup>b</sup>	8.94 ±1.34 <sup>a</sup>	13.96 ±4.39 <sup>a</sup>	4.79 ±0.64 <sup>a</sup>	Nd
<b>C+72h</b>	Nd	15.78 ±8.70 <sup>b</sup>	20.51 ±6.95 <sup>d</sup>	1.80 ±2.53 <sup>b</sup>	1.19 ±4.21 <sup>b</sup>	3.00 ±4.21 <sup>a</sup>	Nd
<b>POOL 72h</b>	26.26 ±0.00 <sup>a</sup>	109.77 ±1.09 <sup>a</sup>	1451.52 ±0.00 <sup>a</sup>	9.30 ±0.00 <sup>a</sup>	14.63 ±0.00 <sup>a</sup>	Nd	Nd

**Tabella 8-** Principali prodotti secondari di fermentazione

#### 4.4 ANALISI SENSORIALE

I kefir prodotti con diversi tempi di fermentazione sono stati sottoposti ad analisi sensoriale gusto-olfattiva e valutati da ogni assaggiatore con un punteggio compreso tra 1 (minimo) e 10 (massimo). Il grafico sottostante (Fig. 20) riporta il confronto tra i vari campioni di kefir con i diversi tempi di fermentazione.



**Figura 20**-Analisi gusto-olfattiva dei kefir C+ e pool ottenuti con diversi tempi di fermentazione.

I diversi campioni sono stati valutati in termini di acidità, dolcezza, viscosità, colore, amaro, texture e gradevolezza generale. La prova C+ 24h è risultata poco amara e poco acida, con una texture omogenea (punteggio medio di 7.6), la dolcezza e il colore ottengono punteggi di 5.6 e 7.2 rispettivamente, con una leggera nota frizzante data dalla produzione della CO<sub>2</sub>, infine la gradevolezza generale è stata valutata con un punteggio medio di 5.2 tra tutti gli assaggiatori. Il pool 24h ha ottenuto punteggi simili alla prova controllo per quanto riguarda texture, dolcezza, colore e gradevolezza generale. Le differenze principali sono state riscontrate per l'acidità (punteggio di 4.3), CO<sub>2</sub> (punteggio di 5.2) e viscosità con punteggio di circa 4 punti maggiore della prova C+. La differenza di acidità rilevata a livello sensoriale riflette i valori di pH e acido lattico delle determinazioni chimiche. Inoltre, alcuni assaggiatori hanno dichiarato di percepire nel kefir pool 24h un leggero sentore vanigliato e una sensazione di dolcezza generale.

Il kefir C+ 48h ha mostrato una texture molto simile a quella del C+ 24h con un punteggio medio di 7.3, anche questo non risulta acido né frizzante, al colore e alla dolcezza è stato assegnato lo stesso punteggio di 7.8. La gradevolezza generale si aggira intorno a punteggio 6. Il pool 48h si discosta maggiormente dalla prova controllo rispetto a quanto osservato per le prove fermentate 24h, esso infatti è risultato poco dolce (punteggio 2.00) e frizzante per la produzione maggiore di anidride carbonica, inoltre i punteggi

ottenuti per l'acidità sono 1.5, per l'amaro 1.7 e per la gradevolezza generale circa 6. Il punteggio più alto per questa prova è stato ottenuto per la viscosità con 7.8 e texture con 7.3. Il kefir pool 48h è risultato molto denso e con un retrogusto agrumato, dato probabilmente dal protendersi della fermentazione. Il kefir C+ 72h ha ottenuto punteggi paragonabili alle prove precedenti per texture, colore e gradevolezza generale. Mentre risulta leggermente acido con un punteggio di 5.5 e leggermente frizzante. Il pool delle 72 ore si è rivelato il più acido, con un punteggio di 7.6, stesso punteggio medio è stato assegnato anche per texture e viscosità, non è risultato particolarmente dolce (punteggio 5.3) e leggermente frizzante. Il colore ha ottenuto un punteggio di 7.8 e la gradevolezza generale si aggira intorno a quanto assegnato alle altre prove. Per questo kefir alcuni assaggiatori hanno descritto un leggero sapore amaro e di "mela cotta", dovuto probabilmente all'elevata quantità di etilacetato rilevato durante l'analisi dei composti secondari di fermentazione. Nel complesso il punteggio più alto per quanto riguarda la gradevolezza generale è stato assegnato al pool 24h seguito dal pool 48h e 72h , evidenziando l'importante contributo dei lieviti nel conferire note aromatiche complesse e di piacevolezza generale al kefir.

## CAPITOLO 5-CONCLUSIONI

Negli ultimi anni si sta assistendo ad un aumento della richiesta di prodotti a base vegetale, come ad esempio la soia, a sostituzione di quelli lattiero-caseari a causa di crescenti intolleranze alimentari a quest'ultimi ed a diete "della società moderna" sempre più volte al consumo di cibi vegetali. Come conseguenza a queste necessità/tendenze è divenuto sempre più facile reperire in commercio alimenti che non hanno una derivazione animale. Da molti secoli sono noti alimenti vegetali che sono utilizzati da popoli per i loro effetti benefici sul corpo e sulla salute. Come conseguenza è sempre più facile reperire alimenti che non contengono zuccheri complessi come il lattosio, o in generale alimenti che hanno una derivazione animale.

Già noto da molto tempo in Europa e in Oriente, il consumo di kefir sta iniziando a diffondersi anche in Italia e nei paesi occidentali; originariamente si tratta di un prodotto fermentato a base di latte animale (latte vaccino, latte di capra e pecora, latte di cammella). Recentemente si è proposta la possibilità di utilizzare anche matrici di origine vegetale, come la soia e l'avena per esempio, nella produzione di kefir. Il kefir è una bevanda in cui diversi tipi di microorganismi, quali lieviti e batteri, stabiliscono un rapporto di mutua convivenza e conferiscono al prodotto caratteristiche nutrizionali, organolettiche e sensoriali uniche, inoltre viene proposto al consumatore come alimento in grado di apportare effetti benefici alla salute dell'uomo per le sue proprietà probiotiche.

A causa della sempre più crescente richiesta, molte industrie alimentari ne hanno avviato la produzione e la commercializzazione, perché questo prodotto oltre ad avere una storia antichissima alle spalle possiede una varietà di effetti benefici sulla salute e sull'organismo e ad oggi viene proposto al consumatore come alimento probiotico. Il kefir introdotto nel mercato alimentare è sicuramente un prodotto industriale in cui la fermentazione procede grazie ai così detti granuli del kefir, i quali presentano una matrice polisaccaridica e proteica e al cui interno è possibile trovare i diversi microorganismi. Il kefir quindi ha delle virtù e degli effetti eccezionali sulla salute e in particolar modo si sottolinea la sua grande azione sul tratto gastrointestinale. Viene consigliato in molte diete e anche in casi di disbiosi intestinale, la quale potrebbe portare, a lungo andare, a complicazioni al livello intestinale e vascolare. Questo prodotto presenta delle proprietà antinfiammatorie e antimicrobiche, quest'ultima garantita dai microorganismi presenti nel prodotto come i batteri, che giocano un ruolo fondamentale nella difesa contro eventuali patogeni, partecipando insieme al microbioma intestinale alla protezione del tratto gastro-intestinale ma anche urogenitale. Tutti i benefici che conferiscono al kefir le sue particolari qualità devono essere ricondotte a questi microorganismi come già accennato, oltre che ai batteri lattici, rinomati per essere comuni probiotici, anche a microorganismi come i lieviti probiotici, insieme sicuramente conferiscono le particolari qualità e funzionalità all'organismo. Da precisare che i lieviti sono dei potenziali probiotici, su questi eucarioti non sono stati condotti molti studi e le loro proprietà non sono spesso sfruttate, basti pensare però che una grande

potenzialità nell'uso di questi microrganismi è la possibilità di evitare l'antibiotico resistenza, imputata a molti batteri, che ad oggi sta prendendo sempre più piede e potrebbe con il tempo diventare un enorme problema sanitario.

Nel presente lavoro di tesi è stata testata l'attitudine fermentativa di quattro diverse specie di lievito non commerciali, di tipo non-*Saccharomyces*, a creare un pool di lieviti da utilizzare in fermentazione mista con il ceppo batterico commerciale *Lb. casei Shirota*, nella produzione di kefir utilizzando la matrice vegetale soia. L'attitudine fermentativa del pool proposto è stata valutata considerando tre diversi tempi di durata della fermentazione (24h, 48h, 72h) con lo scopo di mimare il processo fermentativo di una produzione di kefir di tipo artigianale e valutarne le differenze microbiologiche, chimico-fisiche e sensoriali con il fine ultimo di proporre questo pool di lieviti come starter fermentativi e ottenere un prodotto delle qualità sensoriali e gustative uniche e gradevoli.

Durante lo studio si è visto che il battere, in co-fermentazione con i lieviti, si mantiene vivo e vitale in tutte le prove fino alla fine del periodo di stoccaggio, aumentando di circa un ordine di grandezza rispetto alla concentrazione di inoculo. Lo stesso andamento è stato osservato per tutti e tre i tempi di fermentazione testati, sottolineando la sua capacità di co-esistere con i lieviti senza alcun tipo di interazione negativa. Allo stesso modo, i lieviti non risentono negativamente della presenza del battere, la loro cinetica di crescita è ceppo specifica, generalmente la loro crescita è aumentata almeno di 1-2 ordini di grandezza col passare del tempo. In particolare, nel pool, alcuni microorganismi hanno preso il sopravvento su altri come *D.hansenii* ceppi 36 e 78 e *K. lactis* 80, questo si vede soprattutto dopo il tempo di 48 ore dove i nutrienti iniziano ad essere di meno e alcuni lieviti riescono a sopravvivere maggiormente rispetto ad altri. Al contrario *C. zeylanoides* 13 ha mostrato una sofferenza nella crescita, infatti la sua concentrazione si è ridotta di molti ordini di grandezza, quasi il doppio rispetto all'inoculo iniziale arrivando dopo le 72 ore di fermentazione addirittura a scomparire.

In questo lavoro sono state condotte diverse analisi chimiche, analizzando in particolare i diversi composti come l'acido lattico, la produzione di questo composto è aumentata in quasi tutte le tesi, nel corso del tempo fino alla fine delle quattro settimane. In particolare l'entità del maggiore aumento è riferita alla prova con il solo battere, in questo caso la produzione è aumentata quasi del doppio raggiungendo il più elevato contenuto nella prova delle 72 ore. Sempre per il controllo si può evidenziare un aumento rispetto alla prova preliminare di fermentazione delle 24 ore anche in quella delle 48 ore. Per quanto riguarda il pool la concentrazione subisce una variazione ma non così evidente come nel caso della prova di controllo.

Per l'acido acetico non è stato evidenziato alcun incremento, ad eccezione di una lieve diminuzione in quasi tutte le prove che sono state condotte. Questo forse da imputare al solo utilizzo di batteri lattici e non acetici che in ulterior modo avrebbero contribuito ad un aumento ben più significativo. La produzione di acido lattico è direttamente proporzionale al tempo di fermentazione, infatti esso aumenta con l'aumentare del tempo di fermentazione ed è sempre maggiore in presenza del pool di lieviti rispetto al solo battere. Nel corso delle prove è stata rilevante anche una attività anti-ossidante, monitorata nel corso del tempo dalla diminuzione delle percentuale del radicale DPPH, questo denota un possibile potere antiossidante del prodotto che rimane uno degli obbiettivi proposti per garantire dei benefici sulla salute dell'individuo. E' stata valutata anche la concentrazione di acidi grassi, nelle prove condotte, si evidenzia una concentrazione maggiore di acidi grassi insaturi che contribuiscono al benessere dell'organismo abbassando i livelli di colesterolo cattivo e promuovendo in compenso la produzione del colesterolo buono, favorendo anche una buona funzionalità della capacità cardiovascolare. I grassi saturi sono presenti in piccole quantità e questo sottolinea che il prodotto ha comunque delle ottime potenzialità anche per non promuovere l'ipercolesteromizzazione, che potrebbe essere mediata dal consumo di alimenti ricchi di acidi grassi saturi. La concentrazione di tutti i grassi riportati e rilevati nella tabella 6 non subiscono variazioni nel corso del tempo e nelle prove che sono state condotte, rimanendo a concentrazioni costanti rispetto alla prova delle 24 ore.

Relativamente ai composti secondari di fermentazioni questi non sono presenti in ogni prova che è stata condotta, sottolineando in particolar modo che l'acetoino non è stato rilevato in nessun tempo di fermentazione né nel controllo né nel pool. Il prodotto più rappresentativo presente in tutte le prove è n-propanolo e l'etilacetato che potrebbero conferire al prodotto tipiche qualità organolettiche e sensoriali. Nella prova di degustazione la prova delle 72 ore, in particolare nel pool, è stato rilevato un sapore di mela cotta e un retrogusto quasi fruttato. Il kefir sicuramente più gradito è il pool delle 24 ore ma hanno ottenuto punteggi molto simili anche le prove con il pool delle 48 e 72 ore. Anche l'acetaldeide, qualora presente, può donare un retrogusto e un aroma di erba come nel caso del pool delle 24 ore. Un contenuto troppo elevato di acetaldeide può conferire delle note aromatiche sgradevoli incidendo negativamente sulla qualità sensoriale del prodotto. Tutti i kefir ottenuti sono risultati gradevoli e graditi alla prova di degustazione, soddisfacendo le aspettative dei degustatori, anche i prodotti con un tempo di fermentazione prolungato hanno suscitato una gradevolezza e un consenso generale.

L'ottenimento dei vari prodotti finali è stato possibile grazie all'uso di batteri e lieviti che coesistendo simultaneamente senza influenzarsi negativamente hanno contribuito a garantire un prodotto complesso sia al livello aromatico che al livello chimico-microbiologico. La scelta di utilizzare il pool microbico ha aggiunto sicuramente qualità al prodotto garantendo anche le eventuali peculiarità benefiche per la salute.

Questo pool selezionato ha dimostrato la sua peculiare attività anche in prodotti come la bevanda di soia, scelta per garantire una matrice opzionale rispetto al solo latte vaccino.

I risultati descritti nella presente tesi, seppur ottenuti attraverso uno studio preliminare e applicato su scala di laboratorio, rappresentano un punto di partenza promettente per poter proporre il pool di lieviti in co-fermentazione con il battere lattico, come un valido starter fermentativo e ottenere un kefir di soia probiotico, con caratteristiche ad elevato valore nutrizionale e dal sapore gradevole.

## 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 food. *Foods*, 9(3), 287.
- Agarbati, A., Marini, E., Galli, E., Canonico, L., Ciani, M., & Comitini, F. (2021). Characterization of wild yeasts isolated from artisan dairies in the Marche region, Italy, for selection of promising functional starters. *LWT*, 139, 110531
- Akimitsu, Ti. Mitsuyoshi, K. and Chiaki, K., (2015). Possibility of Breast Cancer Prevention: Use of Soy Isoflavones and Fermented Soy Beverage Produced Using Probiotics
- Beshkova D, Simova ED, Simov ZI, Frengova GI, Spasov ZN. Pure cultures for making kefir. *Food Microbiol.* 2002.
- Bottazzi, V. (1993) *Microbiologia e biotecnologia lattiero-casearia*. Edagricole.
- Bourrie, B. (2016) *The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir*. *Frontiers in Microbiology*, 7
- Božanić R, Lovković S, Jeličić I. Optimising fermentation of soymilk with probiotic bacteria. *Czech J Food Sci.* 2011.
- Chiaofalo B., Salimeni E., Chiofalo L. (2003). *Acidi grassi del latte d'asina: proprietà bio-nutrizionali ed extranutrizionali*.
- Cocchi, M., & Mordenti, A. L. (2005). *Gli alimenti per la salute. Gli alimenti per la salute*, 1000-1084.
- Canonico, L., Ashoor, S., Taccari, M., Comitini, F., Antonucci, M., Truzzi, C., ... & Ciani, M. (2016). Conversion of raw glycerol to microbial lipids by new *Metschnikowia* and *Yarrowia lipolytica* strains. *Annals of Microbiology*, 66(4), 1409-1418.
- 
- Corgneau, M., Scher, J., Ritie-Pertusa, L., Le, D. t. l., Petit, J., Nikolova, Y., Gaiani, C. (2017). Recent advances on lactose intolerance: Tolerance thresholds and currently available answers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(15), 3344–3356.
- Farnworth ER, Mainville I. Kefir - A Fermented Milk Product. In: Farnworth ER, editor. *Handbook of Fermented Functional Foods*. 2th ed. CRC Press Taylor & Francis Group; Boca Raton, London, New York: 2008. pp. 89–127.
- Farnworth ER. Kefir - a complex probiotic. *Food Sci Technol Bull: Functional Foods*. 2005.
- Farris G. A., Gobetti M., Neviani E., Vincenzini M., *Microbiologia dei prodotti alimentari*. Casa editrice Ambrosiana prima edizione (2012).
- Gagliardi, A., Totino, V., Cacciotti, F., Iebba, V., Neroni, B., Bonfiglio, G., ...& Schippa, S., (2018). Rebuilding the gut microbiota ecosystem. *International journal of environmental reserch and public health*, 15(8), 1679.

- Garrote GL, Abraham AG, De Antoni G. Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink. In: Mozzi F, Raya RR, Vignolo GM, editors. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria - Novel Applications*. Iowa: Blackwell Publishing; 2010. pp. 327–340.
- Hawrelak J.A., Myers S.P. The causes of intestinal dysbiosis: A review. *Altern. Med. Rev.* 2004;**9**:180–197.
- Heine, R. G., Alrefae, F., Bachina, P., De Leon, J. C., Geng, L., Gong, S., ... Rogacion, J. M. (2017). Lactose intolerance and gastrointestinal cow's milk allergy in infants and children - Common misconceptions revisited. *World Allergy Organization Journal*
- Heine, R. G., Alrefae, F., Bachina, P., De Leon, J. C., Geng, L., Gong, S., ... Rogacion, J. M. (2017). Lactose intolerance and gastrointestinal cow's milk allergy in infants and children - Common misconceptions revisited. *World Allergy Organization Journal*
- Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint H.J., Salminen S., et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014;**11**:506–514.
- Hrelia S., Leoncini E., Angeloni C. Piante per alimenti funzionali e probiotici., in: *Le piante industriali per una agricoltura multifunzionale*, MILANO, Edizione avenue Media (2009), pp. 39-58.
- Huseini HF, Rahimzadeh G, Fazeli MR, Mehrazma M, Salehi M. Evaluation of wound healing activities of kefir products.
- Jones P. J. (2002) Clinical nutrition: 7. Functional food-more than just nutrition. *Cmaj* 166(12), 1555-1563.
- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International journal of Niosciences*, 1(3), 1-13.
- Ibba, I., Gilli, A., Boi, M. F., & Usai, P. (2014). Effects of exogenous lactase administration on hydrogen breath excretion and intestinal symptoms in patients presenting lactose malabsorption and intolerance. *BioMed Research International*, 2014
- Liu JR, Wang SY, Chen MJ, Chen HL, Yueh PY, Lin CW. Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soyamilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. *Br J Nutr.* 2006.
- Lopitz-Otsoa F, Rementeria A, Elguezabal N, Garaizar J. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev Iberoam Micol.* 2006;**23**:67–74.
- Magalhães KT, Pereira GVM, Dias DR, Schwan RF. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010
- -Marquina D, Santos A, Corpas I, Munoz J, Zazo J, Peinado JM. Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel. *Lett Appl Microbiol.* 2002.
- Nielsen, B. (2014). Kefir: A Multifaceted Fermented Dairy Product. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 6:123–135
- Metchnikoff, E. (1908). *The Prolongation of Life*. New York, NY: Putnam

- Ogemdi Florence Eze (2019) Extraction of proteins from soybean residue (okara) and investigation of their physicochemical properties and their application as emulsifiers
- Otles S, Cagindi O. Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan J Nutr.* 2003.
- Rattray FP, O'Connell MJ. Fermented Milks Kefir. In: Fukay JW, editor. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2th ed. Academic Press; San Diego, USA: 2011. pp. 518–524.
- Santos A, San Mauro M, Sanchez A, Torres JM, Marquina D. The Antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus* spp. Isolated from Kefir. *Syst Appl Microbiol.* 2003.
- Schippa S., Conte M.P. Dysbiotic Events in Gut Microbiota: Impact on health. *Nutrients.* 2014;**6**:5786–5805.
- Ségurel, L., & Bon, C. (2017). On the Evolution of Lactase Persistence in Humans. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*
- Szilagyi, A. (2015). Adaptation to lactose in lactase non-persistent people: Effects on intolerance and the relationship between dairy food consumption and evolution of diseases. *Nutrients*, 7(8), 6751–6779
- Thoreux K, Schmucker DL. Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rats. *J Nutr.* 2001;131:807–812.
- Wang Y, Xu N, Xi A, Ahmed Z, Zhang B, Bai X. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3833126/#b10-bjm-44-341>.
- [https://www.itsagroalimentarete.it/uploads/model\\_17/.files/386\\_item\\_45.pdf](https://www.itsagroalimentarete.it/uploads/model_17/.files/386_item_45.pdf)
- <https://www.lactoflorene.it/microbiota-intestinale>
- [https://www.my-personaltrainer.it/Tv/Ricette/Preparazioni\\_di\\_Base/latte-di-soia.html](https://www.my-personaltrainer.it/Tv/Ricette/Preparazioni_di_Base/latte-di-soia.html).

## RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare la Professoressa Comitini per avermi permesso di frequentare e accedere ai laboratori e affrontare questa bellissima e grande sfida nonostante il periodo di post-pandemia e pandemico. Grazie alla professoressa per avermi concesso fiducia e per avermi dato la possibilità di lavorare sulla tesi e per avermi dato la possibilità di mettermi in gioco e affrontare realtà che per me potevano sembrare nuove. Grazie perché in laboratorio ho appreso molto e ho conosciute molte persone che porterò sempre con me insieme a tutte le cose nuove che ho appreso in questo periodo.

È dovere, anzi obbligo ringraziare una persona che per tutti questi mesi mi è stata dietro. Cara Alice non so davvero da dove iniziare anche perché questi ringraziamenti non saranno mai abbastanza per ripagarti di tutto l'aiuto, e non solo, che ho ricevuto. All'inizio, devo dire la verità, ero un po' spaventata di entrare in laboratorio e di non saper fare tutte le cose o di non avere dimestichezza con altre. Ma sono sicura di una cosa che non potevo avere una guida migliore di te per questo lavoro di tesi. Sono entrate in quel laboratorio molto, molto insicura di me in grado solo di "pipettare" qualcosa poi però grazie al tuo aiuto sono riuscita a gestirmi meglio, a gestire meglio la prova. Magari può sembrare un non-nulla per alcune persone ma per me significa così tanto. Grazie per la tua pazienza anche durante la scrittura della tesi, sono una persona che alcune volta ha delle insicurezze anche stupide ma tu mi hai sempre rassicurata e spinta ad andare avanti. Grazie di tutto...

Grazie alla mia famiglia. Grazie a mia madre, mio padre e mia sorella. Grazie per avermi sostenuta sempre in questo periodo, grazie perché senza di voi non sarei sicuramente quella che sono e sono contenta della persona che sono. Di solito non sono una persona troppa affettuosa, quindi magari non dico spesso un "ti voglio bene" ma sappiate che siete, tutti voi la cosa più importante della mia vita. La cosa di cui non potrei fare a meno e senza la quale non potrei vivere. Grazie ai miei genitori per il loro sostegno siete le mie colonne d'Ercole, siete il mio sostegno e il mio angolo sicuro dei momenti difficili. Alla mia mamma, la persona che ammiro per il suo talento e la sua passione, perché in ogni cosa che fa ci mette sempre tutto l'impegno del mondo, senza di te sarei persa, sei la mia guida. Grazie al mio papà che so, che mi protegge sempre e so che è fiero di me e questo per il mio spirito è importantissimo e mi rende felicissima. Grazie a mia sorella, siamo diverse in molti aspetti ma ti voglio un mondo di bene e ti vorrei proteggere sempre e guidare sempre in ogni tuo passo.

Alle mie nonne, vi amo così tanto.... Siete arrivate anche alla laurea magistrale avete visto? Siete due forze della natura, l'amore che provo per voi è indescrivibile e vi stimo molto con tutto il mio cuore.

A tutti i miei zii e ai miei cugini anche voi fate parte di una tappa importante in questo tedioso percorso. Grazie per i consigli che per me sono oro. Grazie per avermi sempre sostenuta anche e solo con una singola parola.

Grazie alle mie amiche di sempre Alessia, Lucrezia e Sara, voi penso mi conoscete molto bene, sapete i miei difetti e i miei pregi alla perfezione, siete una parte così importante nella mia vita che non riesco a esprimerlo né qua scrivendolo, né a parole. Abbiamo passato così tante difficoltà insieme, ma voi ci siete state sempre, per me questa è la cosa più importante. Potrei mettermi a scrivere un'intera tesi sulle cose che abbiamo passato, sia belle che brutte, e su altre che non si dovrebbero scrivere. Ma voi, ogni volta che tornavo a casa eravate la mia luce, mi rendeva così felice rivedervi e parlare e affrontare tutte le nostre difficoltà. Vi voglio un mondo di bene e ve ne vorrò sempre.

A Giulia e Amalia, a loro a tutte le serate sushi e a tutti i film della Marvel che dobbiamo assolutamente recuperare e guardare. Grazie per le risate, per il divertimento e per le future passeggiate al lago che dovremmo fare prima o poi. Grazie perché mi portate solo gioia e quando sto con voi mi rendete sicuramente felice e spensierata.

Grazie ai ragazzi del laboratorio e a tutte le persone che ho conosciuto in università, purtroppo questo periodo non ci ha fatto vivere a pieno la bellezza del rivedersi a lezione o di fare due chiacchiere insieme. Grazie a Letizia, Marica e Giulia per gli scleri e per tutte le volte che dovevamo lamentarci di qualcosa, grazie per la compagnia e per le risate, le prime volte che vi ho conosciute ho pensato: “caspita avrei voluto tanto conoscerle prima”, siete state una parte importante del mio percorso in laboratorio.

Grazie a Margherita la mia compagna di avventure e sventure durante tutta la tesi, grazie anche a te per le risate e per i quasi pianti davanti quel distillatore o alle sudate durante i bagnetti termostatici. Sicuramente sei stata la migliore persona con cui condividere questo percorso e questi mesi e sono sicura che avrai le tue vittorie.

Grazie a Eleonora che è stata un po' la mia guida in questo arco di tempo, grazie per il tuo aiuto e la tua disponibilità, senza di te non sarei andata avanti con tutte le prove, sei stata indispensabile.

Grazie alle mie coinquiline a Desi, Linda e Maria Chiara non avrei potuto chiedere compagnia migliore di voi. All'inizio ero spaventata perché non avevo mai condiviso un appartamento, però voi siete state una

parte importante in questo percorso. Grazie per tutti i discorsi e le risate che abbiamo fatto, per avermi cucinato piatti buonissimi. Per fortuna ho trovato voi che siete state speciali in questi anni.

Grazie a Giulia per le chiacchiere e le risate e a tutte le persone che hanno fatto parte della mia vita, che sicuramente è stata arricchita dalla vostra presenza.

Infine grazie a me stessa, per l'impegno e per tutto il duro lavoro che ho portato avanti fino alla fine. In questo ultimo anno mi sono sempre più resa conto che l'impegno che ho messo nelle cose prima o poi porterà a dei frutti. Spero e mi auguro di avere un futuro brillante fatto di alti e bassi, così com'è la vita.

La scienza è fatta di errori, ma di errori che è bene commettere perché a poco a poco conducono alla verità.

Concludo con questa citazione di Albert Einstein: "Non credo in un Dio personale e non ho mai nascosto questa mia convinzione, anzi l'ho espressa chiaramente. Se c'è in me qualcosa che si può definire sentimento religioso, è proprio quella sconfinata ammirazione per la struttura del mondo nei limiti in cui la scienza ce la può rivelare."