



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE
NATURALI E AMBIENTE

Corso di laurea in Scienze e tecnologie alimentari

LA FERMENTAZIONE MICROBICA COME NUOVA FONTE DI VITAMINA B₁₂

Relatore
Prof.ssa. Viviana Corich

Laureando
Giona Panizza
Matricola n. 1232766

ANNO ACCADEMICO
2021-2022

Riassunto

La vitamina B₁₂ è una molecola molto importante per l'organismo umano, che deve essere assunta con l'alimentazione. Tale vitamina del gruppo B presenta la peculiarità di essere sintetizzata in natura unicamente da microrganismi. I prodotti di origine animale sono le principali fonti naturali della vitamina B₁₂. Individui che seguono diete a ridotto contenuto di tali alimenti sono più a rischio di incorrere nella carenza della vitamina in questione. L'industria alimentare, sfruttando batteri che sintetizzano la vitamina B₁₂, potrebbe produrre alimenti di origine vegetale fermentati contenenti tale vitamina. Ciò potrebbe ampliare gli orizzonti della tecnologia alimentare e offrire al consumatore prodotti alternativi innovativi per l'assunzione della vitamina B₁₂.

Abstract

Vitamin B₁₂ is a very important molecule for the human organism, which must be taken by food. This vitamin is synthesized in nature only by microorganisms: this is its peculiarity. Animal products are the main natural sources of vitamin B₁₂. Individuals that mostly eat vegetable foods are more at risk to incurring deficiency of the vitamin. The food industry, using bacteria that synthesize vitamin B₁₂, could produce fermented plant-based foods containing the vitamin. That could extend the horizons of food technology and offer consumers innovative alternative products for vitamin B₁₂ intake.

Indice

Riassunto	2
Abstract	2
Indice	4
Indice delle figure	6
Indice delle tabelle	7
Abbreviazioni	8
CAPITOLO I - La vitamina B₁₂	10
1.1 Introduzione	10
1.1.1 Breve storia	10
1.2 Origine e sintesi	11
1.2.1 Struttura chimica	11
1.2.2 Significato biologico	14
1.2.3 Biosintesi	16
1.2.4 I microrganismi usati per la produzione industriale	18
1.3 Importanza per l'organismo umano	18
1.3.1 Assorbimento	18
1.3.2 Reazioni metaboliche dell'organismo umano in cui è coinvolta la vitamina B ₁₂	20
1.3.3 Patologie umane correlate alla carenza di vitamina B ₁₂	22
1.3.3.1 Anemia perniciosa	23
1.3.3.2 Neuropatia e anemia megaloblastica	24
1.3.3.3 Difetti del tubo neurale NTD	26
1.3.3.4 Malattie cardiovascolari	26
1.3.4 Fabbisogni	27
CAPITOLO II - Ciclo naturale e fonti alimentari	29
2.1 Ciclo di degradazione e bioaccumulo nell'ecosistema	29
2.1.1 Fonti di origine animale	31
2.1.2 Funghi commestibili	34
2.1.3 Alghe commestibili	35
CAPITOLO III - La fermentazione microbica come biotecnologia per la sintesi di vitamina B₁₂ in prodotti di origine vegetale	37
3.1 Introduzione	37
3.2 Tempeh	38
3.2.1 Effetto della lavorazione della soia sul contenuto di folato, vitamina B ₁₂ e isoflavoni nel tofu e nel tempeh	39

3.2.2 Produzione di vitamina B ₁₂ nella fermentazione della soia per il tempeh	43
3.2.3 Miglioramento della vitamina B ₁₂ nel tempeh di lupino mediante fortificazione <i>in situ</i>	46
3.3 Fermentati a base di legumi e cereali	50
3.3.1 Fermentazione di cereali, pseudocereali e legumi con <i>P. freudenreichii</i> e <i>L. brevis</i> per la fortificazione della vitamina B ₁₂	51
3.3.2 Produzione <i>in situ</i> di vitamina B ₁₂ e destrano in farina di soia e crusca di riso: una tecnologia per migliorare il sapore e la consistenza del pane fortificato	57
CAPITOLO IV - Conclusioni	67
Bibliografia	71
Sitografia	73

Indice delle figure

1. Struttura chimica generale delle cobalamine (Raux <i>et al.</i> 2000)	13
2. Struttura chimica delle principali cobalamine (Martens <i>et al.</i> 2002)	13
3. Forme strutturali della cobalamina a confronto con quelle della cobamide (Bito <i>et al.</i> 2020)	14
4. Rappresentazione schematica delle vie biosintetiche della vitamina B ₁₂ , aerobica e anaerobica (Martens <i>et al.</i> 2002)	17
5. Assorbimento e circolazione entero-epatica della vitamina B ₁₂ (Green <i>et al.</i> 2017)	20
6. Reazioni cobalamina-dipendenti nell'uomo e vie metaboliche correlate. Alcuni di questi metaboliti si accumulano durante la carenza di vitamina B ₁₂ (Martens <i>et al.</i> 2002)	22
7. Ciclo della metionina o ciclo di metilazione e ciclo del folato (Scott 1999)	26
8. Ciclo di degradazione e bioaccumulo dei corrinoidi nell'ecosistema (Watanabe <i>et al.</i> 2013)	30
9. Tempeh di soia intero da cuocere (Romulo <i>et al.</i> 2021)	39
10. Scenari di lavorazione della soia per il tempeh (e il tofu) (Mo <i>et al.</i> 2013)	41
11. Diagramma di flusso della preparazione dell'impasto madre e dei tipi di pane prodotti a pasta acida o con farine non fermentate in questo studio (Wang <i>et. al</i> 2022)	59
12. Profili di gusto (dal panel test) dei pani di crusca di riso e di soia (Wang <i>et. al</i> 2022)	66

Indice delle tabelle

1. Migliori produttori microbici di vitamina B ₁₂ , mezzi e condizioni raccomandati per la produzione biosintetica di vitamina B ₁₂ e le concentrazioni della vitamina ottenibili (Martens <i>et al.</i> 2002)	18
2. Fabbisogno medio (AR, Average Requirement) e assunzione raccomandata per la popolazione (PRI, Population Reference Intake) della vitamina B ₁₂ secondo i LARN (Http1)	28
3. Principali fonti alimentari di vitamina B ₁₂ , con i rispettivi contenuti medi e biodisponibilità (Watanabe 2007)	33
4. Contenuto di vitamina B ₁₂ dei prodotti di soia ottenuti attraverso cinque scenari di lavorazione (Mo <i>et al.</i> 2013)	43
5. Numero totale di microrganismi nella fermentazione della soia inoculata con diverse colture (Kustyawati <i>et al.</i> 2020)	44
6. Effetto delle colture inoculate sul pH e nella produzione di vitamina B ₁₂ , daidzeina e genisteina durante la fermentazione del tempeh (Kustyawati <i>et al.</i> 2020)	46
7. Effetto della composizione della coltura starter e della temperatura di incubazione sul contenuto di vitamina B ₁₂ e sulla carica batterica nel tempeh di lupino (Wolkers-Rooijackers <i>et al.</i> 2018)	48
8. Effetto della dose di inoculo di <i>Propionibacterium freudenreichii</i> in coltura mista con <i>Rhizopus oryzae</i> sul contenuto di vitamina B ₁₂ , sul pH finale e sulla carica batterica del tempeh di lupino prodotto a 25 °C (Wolkers-Rooijackers <i>et al.</i> 2018)	49
9. Contenuto di vitamina B ₁₂ (ng/g, DW) durante la fermentazione delle undici matrici vegetali (Xie <i>et al.</i> 2021)	53
10. Contenuto di vitamina B ₁₂ (ng/g, DW) durante la fermentazione con diversi livelli di colture starter (Xie <i>et al.</i> 2021)	55
11. Contenuto di vitamina B ₁₂ nelle paste madri acide dopo 24 ore di fermentazione (Wang <i>et al.</i> 2022)	61
12. Contenuto di vitamina B ₁₂ dei pani (Wang <i>et al.</i> 2022)	62

Abbreviazioni

AA,	acido acetico
AdoCbl,	adenosilcobalamina
ALA,	acido 5-aminolevulinico
AR,	fabbisogno medio
CNCbl,	cianocobalamina
DMBI,	5,6-dimetilbenzimidazolo
DW,	peso secco
FW,	peso della farina
GC,	gas cromatografia
HPLC,	cromatografia liquida ad alte prestazioni
IF,	fattore intrinseco
LA,	acido lattico
LAB,	batteri lattici
LARN,	Livelli di Assunzione di Riferimento di Nutrienti ed energia per la popolazione italiana
MeCbl,	metilcobalamina
MS,	spettrometria di massa
NTD,	difetti del tubo neurale
OHCbl,	idrossicobalamina
PA,	anemia perniciosa (solo nel capitolo I)
PA,	acido propionico (solo nel capitolo III)
PAB,	batteri propionici
PRI,	assunzione raccomandata per la popolazione
SAM,	S-adenosilmetionina
SINU,	Società Italiana di Nutrizione Umana
TCN1,	transcobalamina I
TCN2,	transcobalamina II
TTA,	acidi totali titolabili
UFC,	unità formanti colonia
UL,	livello massimo tollerabile di assunzione
Urogen III,	uroporfirinogeno III

CAPITOLO I

La vitamina B₁₂

1.1 Introduzione

La vitamina B₁₂ è sempre più frequentemente oggetto di discussione all'interno della comunità scientifica ma anche di quella sociale. Spesso però le informazioni a riguardo sono incomplete o addirittura contraddittorie. Anche la comunicazione scientifica può generare incomprensioni, ciò è dovuto alle relativamente recenti scoperte riguardo alla molecola e ai complessi processi metabolici che coinvolgono la vitamina B₁₂.

L'interesse sia scientifico che sociale è dovuto al fatto che questa vitamina del gruppo B viene spesso citata in merito alle diete vegetariane e vegane. Infatti, i regimi alimentari che escludono in parte o totalmente gli alimenti di origine animale apportano quantità di vitamina B₁₂ ridotte o irrisorie a seconda della rigidità della dieta vegetariana sostenuta. La vitamina B₁₂ è prodotta esclusivamente da microrganismi, per lo più batteri; questi, risiedendo anche nell'apparato gastro-intestinale degli animali d'allevamento, apportano a carni, latte, latticini e uova tale vitamina tanto importante per la salute dell'uomo.

1.1.1 Breve storia

La vitamina B₁₂ è stata identificata per la prima volta nel 1926 da Minot e Murphy (Martens *et al.* 2002). I due medici americani hanno dimostrato di essere in grado di curare l'anemia perniciosa, un disturbo segnalato nel 1849 da Thomas Addison, con una dieta a base di fegato. Partendo dall'identificazione del "fattore estrinseco" presente nel fegato, la loro scoperta ha aperto nuovi campi di indagine scientifica i cui risultati sono stati riconosciuti di altissimo valore, tanto da permettere l'assegnazione di due premi Nobel. Il primo proprio a Minot e Murphy (insieme a Whipple) nel 1934, per le loro scoperte riguardanti la terapia dell'anemia perniciosa, e a Dorothy Hodgkin nel 1964 per la determinazione, con tecniche a raggi X, delle strutture di importanti molecole biochimiche, tra cui proprio la vitamina B₁₂, avvenuta nel 1956 (Raux *et al.* 2000).

Dal 1926, l'identità del "fattore estrinseco" è rimasta sconosciuta per i successivi 20 anni fino a quando due importanti aziende farmaceutiche, la Merck e la Glaxo, isolarono simultaneamente un composto cristallino rosso dal fegato in grado di sconfiggere l'anemia perniciosa e designato

vitamina B₁₂. Poco dopo, la vitamina B₁₂ è stata identificata anche nel latte in polvere, nella carne di manzo e nei brodi di coltura di vari generi batterici. Ciò ha avviato la ricerca riguardante la natura chimica del fattore anti-anemia pernicioso, culminata nella scoperta di Dorothy Hodgkin (1956) che ha messo in luce la struttura chimica della vitamina B₁₂, molto più complessa di qualsiasi ipotesi fatta in precedenza.

In seguito, sono state scoperte le forme biologicamente attive della vitamina B₁₂, l'adenosilcobalamina e la metilcobalamina; inoltre vennero isolati e identificati diversi enzimi adenosilcobalamina-dipendenti e metilcobalamina-dipendenti. Oltre a questi approcci biochimici, volti a indagare e comprendere la complessità funzionale della vitamina B₁₂, va sottolineata la brillante ricerca relativa alla sintesi chimica *in vitro* della vitamina B₁₂. Questa è stata condotta negli anni '60 e '70 da Woodward ed Eschenmoser con la partecipazione di oltre 100 scienziati, in un periodo complessivo di 11 anni. Questa ricerca ha contribuito alla delucidazione della via biochimica di sintesi della vitamina B₁₂ nel batterio aerobico *Pseudomonas denitrificans*, nel 1993 (Martens *et al.* 2002).

Già negli anni '90 la carenza di vitamina B₁₂ è emersa come un importante problema di salute pubblica, con la più alta prevalenza di biomarcatori irregolari dello stato della vitamina osservata in persone e popolazioni con una bassa assunzione di alimenti di origine animale e negli anziani (Butola *et al.* 2020).

1.2 Origine e sintesi

1.2.1 Struttura chimica

Il termine "vitamina B₁₂" è ampiamente utilizzato per descrivere i composti del gruppo della cobalamina o famiglia dei corrinoidi¹ del cobalto. Le forme naturali sono la 5'-deossiadenosilcobalamina o adenosilcobalamina (AdoCbl), la metilcobalamina (MeCbl) e l'idrossicobalamina (OHCbl). La cianocobalamina (CNCbl), per definizione vitamina B₁₂, è la forma di cobalamina stabile prodotta industrialmente, che non si trova in natura (Fig. 2). La presenza del gruppo -CN che differenzia questa forma da quelle naturali, è dovuta alla procedura di estrazione mediante la quale il composto viene recuperato dalle colture batteriche (Martens *et al.* 2002).

Le cobalamine hanno una massa molecolare compresa tra 1.300 e 1.500 Da.

¹ Corrinoidi: gruppo di composti che hanno come base una molecola di corrina (macrocielo composto da 4 anelli pirrolici).

Le varie molecole di cobalamina sono costituite da una struttura di base uguale, rappresentata da: un anello di corrina planare composto da quattro unità pirroliche² che si differenzia da quello degli altri tetrapirroli o porfirine (eme, siroeme, clorofilla...) (Raux *et al.* 2000) per il ponte metinico³ (in questo caso =CH- formante un doppio ed un singolo legame) mancante tra gli anelli pirrolici A e D, ovvero presenta solo tre ponti metinici invece che quattro (Fig. 1 & 2). Ulteriori differenze rispetto agli altri macrocicli tetrapirrolici sono il numero e il tipo di catene laterali e l'elemento metallico chelato centralmente, che in questo caso è il cobalto (Co). Lo ione cobalto nelle cobalamine (un elemento altrimenti estremamente tossico per l'organismo) si trova nello stato di ossidazione +3 ed è complessato con i quattro atomi di azoto dei quattro anelli pirrolici. Il cobalto presenta, inoltre, due legami perpendicolari rispetto al piano dell'anello. Il primo di essi (in basso) si stabilisce con una molecola di 5,6-dimetilbenzimidazolo (DMBI) legata al ribosio-5-fosfato legato, a sua volta, a un gruppo aminopropanolico; quest'ultimo è legato in modo covalente all'acido propionico dell'anello D (Fig. 1). Il secondo legame è stabilito con diversi gruppi funzionali ("R" in Fig. 1 e "X" in Fig. 2) i quali identificano le varie forme di cobalamina esistenti. Nel caso in cui il gruppo funzionale (X) sia il 5'-deossiadenosile si ottiene l'AdoCbl, con l'idrossile (-OH) si genera la OHCbl, con il cianuro (-CN) la CNCbl, mentre con il metile (-CH₃) la MeCbl (Fig. 2). Nel caso della AdoCbl il legame C-Co, determinato dall'atomo di C (5') del 5'-deossiadenosile, è stato il primo legame metallo-carbonio ad essere descritto nelle molecole biologiche (Martens *et al.* 2002). Questo legame è relativamente debole, con un'energia di dissociazione di circa 130 kJ/mol, e può quindi scindersi facilmente.

Le molecole di MeCbl e di AdoCbl, nelle loro forme libere, sono note per essere sensibili alla luce e si trasformano facilmente in OHCbl, anch'essa sensibile alla luce, a temperatura ambiente in soluzione acquosa. In presenza di cianuro si genera la CNCbl più stabile.

² Pirrolo: composto aromatico eterociclico a cinque termini, avente formula bruta C₄H₅N

³ Ponte metinico o gruppo metinico o metino: gruppo funzionale trivalente costituito da un atomo di carbonio legato a un atomo di idrogeno.

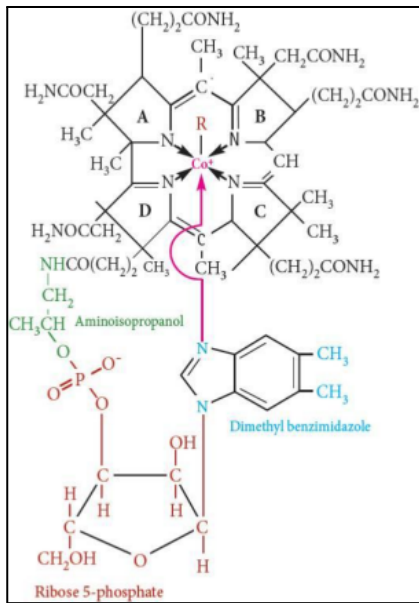


Fig. 1 Struttura chimica generale delle cobalamine (Raux *et al.* 2000).

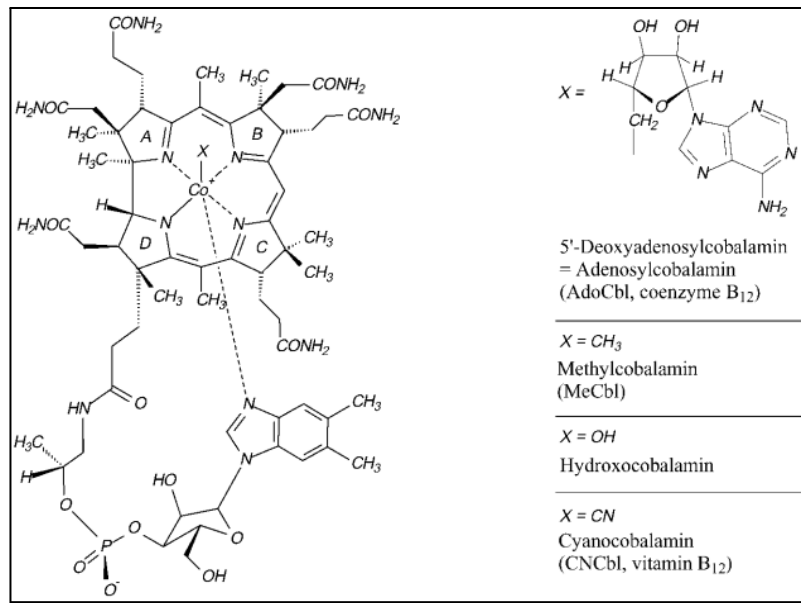


Fig. 2 Struttura chimica delle principali cobalamine. Adenosilcobalamina (AdoCbl), metilcobalamina (MeCbl), idrossicobalamina (OHCbl) e cianocobalamina (CNCbl) (Martens *et al.* 2002).

La MeCbl e la AdoCbl sono le due forme di cobalamina biologicamente attive nell'uomo. Queste, cioè, hanno il ruolo di coenzimi in due reazioni metaboliche dell'organismo umano. La OHCbl e la CNCbl però, a livello degli enterociti, sono prontamente convertite nelle due forme coenzimatiche attive (Watanabe *et al.* 2014; Bito *et al.* 2020; Agostoni *et al.* 2015). Tali quattro forme di cobalamina, MeCbl, AdoCbl, OHCbl e CNCbl, sono quindi tutte considerate forme bioattive per l'uomo.

A rendere tutto più complesso è l'esistenza di forme di vitamina B₁₂ inattive e non convertibili dall'organismo umano nelle due forme coenzimatiche attive. Infatti, in natura, sono presenti anche corrinoidi del cobalto con un ligando inferiore (ovvero la molecola legata in basso al cobalto, perpendicolarmente rispetto al piano dell'anello centrale) diverso dal DMBI (Watanabe *et al.* 2013). Si tratta delle cosiddette adenil cobamidi, ovvero le pseudo forme della vitamina B₁₂ (Bito *et al.* 2020). Queste presentano come ligando inferiore l'adenina e come ligando superiore, in maniera del tutto analoga alle cobalamine, un cianuro (la vera "pseudovitamina B₁₂"), un 5'-deossiadensile, un idrossile, oppure un metile (Fig. 3).

Le varie adenil cobamidi, prodotte sempre da batteri, sono biologicamente inattive per l'uomo, proprio per l'assenza del DMBI nella loro struttura. Il DMBI, come ligando inferiore, è fondamentale per il legame con il fattore intrinseco, una glicoproteina responsabile del trasporto delle

cobalamine nel tratto gastrointestinale umano. L'adenina delle cobamidi rende l'affinità con il fattore intrinseco 500 volte inferiore rispetto a quella esistente con il DMBI delle cobalamine (Deptula *et al.* 2015).

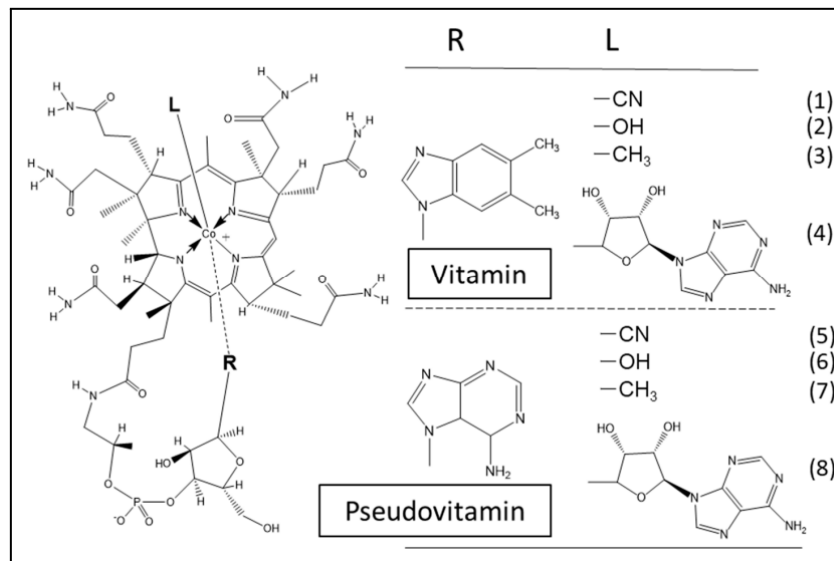


Fig. 3 Forme strutturali della cobalamina a confronto con quelle della cobamide. (1) CNCbl, (2) OHCbl, (3) MeCbl, (4) AdoCbl, (5) pseudovitamina B₁₂ (Ade-CNCba), (6) forma idrossilica della pseudovitamina B₁₂ (Ade-OHCba), (7) forma metilica della pseudovitamina B₁₂ (Ade-MeCba) e (8) forma adenosilica della pseudovitamina B₁₂ (Ade-Ado-Cba) (Bito *et al.* 2020).

In seguito, nel testo, si farà riferimento alle varie cobalamine con il termine di “vitamina B₁₂” come semplificazione, a meno che non ci si riferisca in particolare ad un tipo specifico di cobalamina.

Alla stessa maniera, verranno chiamate come “pseudovitamina B₁₂” le diverse adenil cobamidi.

1.2.2 Significato biologico

Martens e collaboratori (2002) hanno riportato interessanti teorie in merito all'origine della vitamina B₁₂. E' stato osservato che questa molecola nei batteri è coinvolta nei processi fermentativi. L'ipotesi è che sia comparsa fin dai primi stadi di sviluppo della vita sulla terra, quando i microrganismi, non essendoci ossigeno a disposizione, utilizzavano unicamente processi fermentativi per lo sviluppo (Martens *et al.* 2002). In un ambiente biotico emergente, infatti, i processi di fermentazione, e con essi la vitamina B₁₂, erano di fondamentale importanza per la produzione di energia e il bilanciamento del potenziale redox (Martens *et al.* 2002). Anche altri processi minori di produzione anaerobica di energia, come la metanogenesi e varie fermentazioni di aminoacidi, richiedono la partecipazione della vitamina B₁₂. Sembra quindi che la funzione originaria della vitamina B₁₂ sia legata ai classici processi metabolici anaerobici.

Il processo stesso di biosintesi della vitamina B₁₂ fornisce prove di un'antica origine di tale derivato tetrapirrolico. Ad esempio, la biosintesi della vitamina B₁₂, in tutti i procarioti che la attuano (batteri e *Archaea*), inizia da una molecola di aminoacil-tRNA. Tale fatto è considerato una vestigia del passato, quando il metabolismo cellulare si basava su informazioni legate direttamente alla sola presenza di RNA e non di DNA. Nella via biosintetica della vitamina B₁₂, da un aminoacil-tRNA viene prodotto l'acido 5-aminolevulinico. A partire da tale precursore le reazioni biosintetiche che portano alla formazione del primo macrociclo tetrapirrolico, l'uroporfirinogeno III, sono identiche per tutti i derivati tetrapirrolici (clorofilla, eme, sioeme e vitamina B₁₂). L'uroporfirinogeno III, è una molecola asimmetrica come l'anello di corrina delle cobalamine (data la presenza di solo tre ponti metinici). Questo fatto potrebbe rappresentare la caratteristica fondamentale che determina la fase di contrazione dell'anello tetrapirrolico (ovvero l'eliminazione del carbonio tra due anelli pirrolici; il risultato si nota osservando il legame diretto tra gli anelli A e D in Fig. 1) che si verifica più tardi nella biosintesi della vitamina B₁₂. Ciò potrebbe riflettere l'ipotesi che l'intero percorso di sintesi dei derivati tetrapirrolici sia stato inizialmente funzionale alla sintesi della sola la vitamina B₁₂ e che i rami biosintetici per sintetizzare clorofille ed emi siano nati successivamente, indicando la vitamina B₁₂ come la più antica (Martens *et al.* 2002; Raux *et al.* 2000). A sostegno di quanto detto, è stata descritta un'antica via biosintetica dell'eme originata dalla sintesi del tetrapirrolo della vitamina B₁₂ in *Desulfovibrio vulgaris*, batterio tuttora esistente.

Nel complesso, tali osservazioni suggeriscono che la vitamina B₁₂ sia emersa in un mondo a RNA primitivo e selezionata per la sua capacità iniziale di supportare la fermentazione anaerobica di piccole molecole (Martens *et al.* 2002). L'instaurarsi della biosintesi della clorofilla e dell'eme ha portato all'utilizzo dell'ossigeno molecolare. Con l'aumento dei livelli atmosferici di ossigeno, la dipendenza metabolica dalla vitamina B₁₂ è diminuita. Sono state maggiormente sviluppate, quindi, funzioni secondarie della vitamina B₁₂, come il trasferimento di gruppi metile ad altre molecole o la riduzione di nucleotidi. Nonostante il fatto che dal processo di biosintesi della vitamina B₁₂ si siano evoluti i processi di produzione di pigmenti fotosintetici e respiratori (secondo le ipotesi precedenti), che hanno permesso lo sviluppo di piante e animali, gli organismi superiori sono incapaci di sintetizzare la vitamina B₁₂. Tuttavia, l'unicità strutturale della vitamina e della chimica da essa mediata risulta tuttora essenziale per l'uomo e per gli animali in genere; questi, per mantenersi in buono stato di salute, necessitano di reazioni dipendenti dalla vitamina B₁₂.

1.2.3 Biosintesi

Come accennato in precedenza, la biosintesi della vitamina B₁₂ è limitata ai microrganismi. Per via della sua complessa natura chimica, sono necessari più di 30 geni per l'intera biosintesi *ex novo* della vitamina B₁₂, che ammontano a circa l'1% di un tipico genoma batterico. In realtà, in natura esistono due diverse vie biosintetiche per la vitamina B₁₂: una via anaerobica, indipendente dall'ossigeno, ma anche una via aerobica, ossigeno-dipendente (Fig. 4). La biosintesi di tutti i derivati tetrapirrolici nelle piante, negli *Archaea* e nella maggior parte dei batteri (eccezione fatta dal gruppo degli α -proteobatteri), parte dallo scheletro con cinque atomi di carbonio del glutammato (Raux *et al.* 2000).

Inizialmente il glutammato legato al tRNA (ciò avviene grazie all'attività della glutamil-tRNA sintetasi) viene ridotto a glutammato-1-semialdeide dalla glutamil-tRNA reduttasi. L'aldeide viene convertita, tramite spostamento (intramolecolare) del gruppo amminico dal C-2 al C-1 della glutammato-1-semialdeide, ad acido 5-aminolevulinico (ALA), il primo precursore generale di tutti i tetrapirroli conosciuti. La molecola di ALA può in maniera alternativa, ma molto meno comune, essere anche prodotta dalla condensazione di succinil-CoA e glicina. Due molecole di ALA vengono condensate per generare il primo derivato pirrolico, il porfobilinogeno pirrolico (PBG). Quattro molecole di PBG vengono polimerizzate, riorganizzate e quindi ciclizzate per formare l'uroporfirinogeno III (Urogen III), il primo intermedio macrociclico. La metilazione dell'Urogen III al C-2 e al C-7 porta alla sintesi di precorrina-2 (mentre la decarbossilazione dell'Urogen III porterebbe alla sintesi di emi e clorofille), che è anche l'ultimo intermedio comune nella sintesi del coenzima F430 (derivato tetrapirrolico coinvolto nella metanogenesi) e del siroeme (tetrapirrolo costituente della nitrito reduttasi batterica). Dalla precorrina-2, le due vie per la biosintesi della vitamina B₁₂ divergono (Martens *et al.* 2002): nella via aerobica la precorrina-2 viene metilata al C-20 per dare precorrina-3A, mentre nella via anaerobica la precorrina-2 è chelata con cobalto per dare cobalto-precorrina-2. Quindi la parte del metabolismo indipendente dall'ossigeno inizia con l'inserimento del cobalto nella precorrina-2, mentre questa reazione di chelazione nella parte dipendente dall'ossigeno avviene solo dopo nove ulteriori fasi. È interessante notare alcune differenze fra le due vie: la cobalto-chelatasi nella via aerobica richiede ATP, mentre la sua controparte anaerobica non richiede molecole ad alta energia. Inoltre, nella via anaerobica, dato l'inserimento precoce del cobalto, la maggior parte degli intermedi sono cobalto-complessi, quindi richiedono enzimi con diverse specificità di substrato, a differenza degli intermedi della via

ossigeno-dipendente che sono privi di metalli. Un'ulteriore differenza tra le due vie è il processo di contrazione dell'anello, con la rimozione del C-20 dal macrociclo: in condizioni aerobiche il C-20 della precorrina-3A viene ossidato con il successivo rilascio di acetato; in condizioni anaerobiche si ipotizza che sia lo stesso ione cobalto complessato che, con la sua capacità di assumere diversi stati di ossidazione (da +1 a +3), favorisce l'ossidazione del C-20 ed il suo rilascio come acetaldeide. Le due vie biosintetiche si riuniscono a livello dell'acido adenosilcobirico (nel caso in cui venga sintetizzata AdoCbl come prodotto finale, Fig. 4), che viene convertito in adenosilcobinamide dal legame con una catena di aminopropanolo all'acido propionico dell'anello D (Martens *et al.* 2002). Il ribosio-5-fosfato viene legato ad una molecola di 5,6-dimetilbenzimidazolo (DMBI); questo complesso è infine legato in modo covalente all'adenosilcobinamide, generando la molecola di AdoCbl finita (o delle altre forme di cobalamina a seconda della molecola introdotta in precedenza come gruppo X, secondo la Fig. 1).

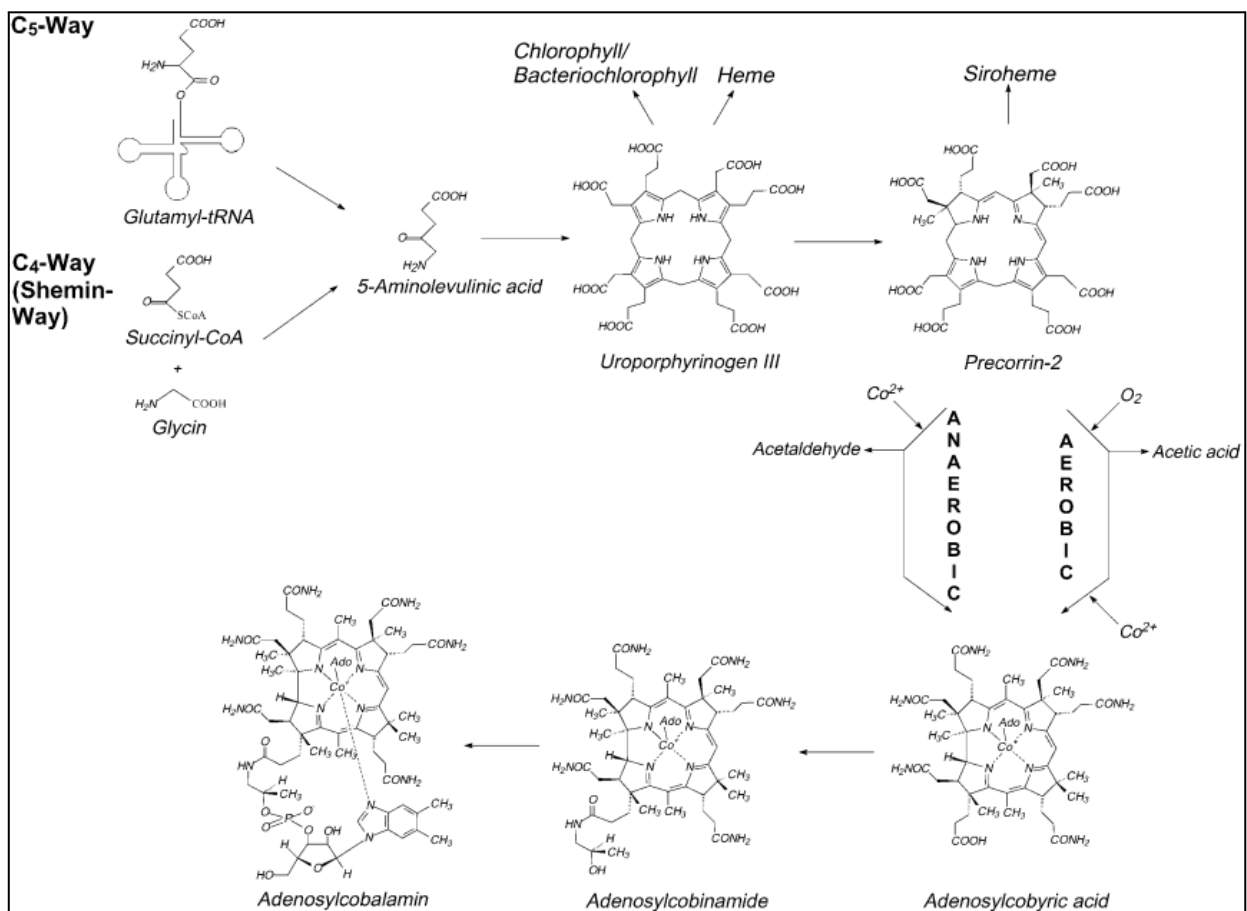


Fig. 4 Rappresentazione schematica delle vie biosintetiche della vitamina B₁₂, aerobica e anaerobica (Martens *et al.* 2002).

1.2.4 I microrganismi usati per la produzione industriale

La produzione di vitamina B₁₂ per la preparazione di integratori alimentari e farmaci non prevede l'utilizzo dell'estremamente complessa sintesi chimica, con circa 70 fasi di sintesi, bensì processi di fermentazione biosintetica, utilizzando microrganismi selezionati e geneticamente ottimizzati (Martens *et al.* 2002). *Propionibacterium freudenreichii* è il migliore produttore di vitamina B₁₂ presente in natura (Tab. 1), ma l'industria degli integratori alimentari ha selezionato ceppi di altre specie per la produzione efficiente della molecola. Sono infatti preferiti *Propionibacterium shermanii* e *Pseudomonas denitrificans* per via della loro rapida crescita, oltre alla produttività di vitamina B₁₂ comunque elevata (Martens *et al.* 2002). Specifici ceppi di tali specie sono sottoposti a interventi di miglioramento attraverso l'ingegneria genetica al fine di ottimizzare la produzione industriale di vitamina B₁₂.

Species of micro-organism or microbiological process	Main component of culture medium	Conditions of fermentation	Vitamin B ₁₂ production (mg/l)
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Glucose	Anaerobiosis, 5,6-dimethyl benzimidazole	206.0
<i>Rhodopseudomonas protamicus</i>	Glucose	5,6-dimethyl benzimidazole	135.0
<i>Propionibacterium shermanii</i>	Glucose	5,6-dimethyl benzimidazole	60.0
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Sucrose	Aerobiosis, betaine	60.0
<i>Nocardia rugosa</i>	Glucose	Aerobiosis	18.0
<i>Rhizobium cobalaminogenum</i>	Sucrose	Aerobiosis	16.5
<i>Micromonospora</i> sp.	Glucose	5,6-dimethyl benzimidazole	11.5
<i>Streptomyces olivaceus</i>	Glucose	5,6-dimethyl benzimidazole	6.0
<i>Nocardia gardneri</i>	Hexadecane	Aerobiosis	4.5
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	Methanol	Anaerobiosis	3.6
<i>Pseudomonas</i> sp.	Methanol	5,6-dimethyl benzimidazole	3.2
<i>Arthrobacter hyalinus</i>	Isopropanol	5,6-dimethyl benzimidazole	1.1

Tab. 1 Migliori produttori microbici di vitamina B₁₂, mezzi e condizioni raccomandati per la produzione biosintetica di vitamina B₁₂ e le concentrazioni della vitamina ottenibili (Martens *et al.* 2002).

1.3 Importanza per l'organismo umano

Il fatto che la vitamina B₁₂ derivi dalla sintesi microbica (batteri e *Archaea*) la rende unica tra tutte le vitamine. È interessante notare che gli animali (incluso l'uomo) e i protisti richiedono la vitamina B₁₂ ma non la sintetizzano, mentre le piante non la sintetizzano né la usano (Martens *et al.* 2002). Ciò determina la sua essenzialità per l'organismo umano.

1.3.1 Assorbimento

La vitamina B₁₂ negli alimenti è generalmente complessata con proteine. Il rilascio della vitamina B₁₂ dalle proteine alimentari avviene principalmente nello stomaco grazie all'azione dell'acido cloridrico e della pepsina (Agostoni *et al.* 2015). La vitamina B₁₂ libera viene quindi legata dalla transcobalamina I (TCN1), nota anche come aptocorrina, fattore R o proteina R, una glicoproteina

secreta dalle ghiandole salivari della bocca (Fig. 5). L'aptocorrina serve principalmente a proteggere la vitamina B₁₂ dall'ambiente acido dello stomaco, producendo un complesso aptocorrina-vitamina B₁₂. Nel duodeno, la vitamina B₁₂ viene rilasciata dal suo complesso con l'aptocorrina attraverso gli effetti combinati del bicarbonato pancreatico e di enzimi proteolitici. La vitamina B₁₂ successivamente si lega al fattore intrinseco (IF), una glicoproteina con peso molecolare di 50 kDa; il IF è prodotto nel fondo e nelle cellule parietali dello stomaco. Il complesso vitamina B₁₂-IF passa nell'ileo terminale, dove si lega ai microvilli, in particolare alla membrana degli enterociti, in corrispondenza di un recettore specifico (chiamato cubam) (Butola *et al.* 2020). Il recettore cubam è essenzialmente composto dalla cubilina (CUBN), proteina imputata al riconoscimento del complesso vitamina B₁₂-IF, e dalla proteina amnionless (AMN) che guida l'endocitosi del complesso molecolare di interesse. Nella cellula ileale il complesso vitamina B₁₂-IF viene degradato. La vitamina B₁₂ viene infine metabolizzata nei suoi derivati, metilico e deossiadenosilico (MeCbl e AdoCbl) (Agostoni *et al.* 2015). La vitamina entra nel plasma principalmente sotto forma di MeCbl. L'assorbimento intestinale mediato dal IF è saturo a circa 1,5-2 µg di vitamina B₁₂ per pasto in condizioni fisiologiche normali (Agostoni *et al.* 2015). Gli agenti che stimolano la secrezione acida per la digestione gastrica, inducono anche la produzione del IF; un eccesso di IF è generalmente disponibile con la normale secrezione gastrica. Oltre alla quantità di IF, il numero di recettori intestinali per il complesso vitamina B₁₂-IF è uno dei fattori che determinano l'assorbimento della vitamina B₁₂. In condizioni favorevoli, le persone sane possono assorbire più di 10 µg di vitamina B₁₂ al giorno. Quando vengono somministrate per via orale dosi crescenti di vitamina B₁₂, la frazione assorbita diminuisce rapidamente e la quantità assorbita si avvicina a un *plateau*. Infatti, quando l'assunzione di vitamina B₁₂ supera la disponibilità di IF, l'assorbimento della vitamina diventa dipendente da meccanismi passivi non specifici, a livello della mucosa orale, duodenale e ileale, che sono molto meno efficienti (1-2 % della dose assunta).

Da notare inoltre, che alcune popolazioni batteriche che risiedono nel colon umano sono in grado di produrre vitamina B₁₂. Questa è appunto sintetizzata dopo l'intestino tenue, sito in cui avviene l'assorbimento attivo di vitamina B₁₂. Quindi l'unica fonte interna di vitamina non viene di fatto assorbita, ma in gran parte persa attraverso le feci (Agostoni *et al.* 2015).

Nelle cellule epiteliali dell'ileo la transcobalamina II (TCN2) si lega alla vitamina B₁₂ in forma attiva (Butola *et al.* 2020; Agostoni *et al.* 2015). Il complesso vitamina B₁₂-TCN2 entra in circolazione in circa 2-3 ore e può essere assorbito attivamente dal fegato, dal midollo osseo e da altre cellule

vitali. Il fegato può immagazzinare circa 4-5 mg di vitamina B₁₂, una quantità sufficiente per soddisfare il fabbisogno corporeo per circa 4-5 anni.

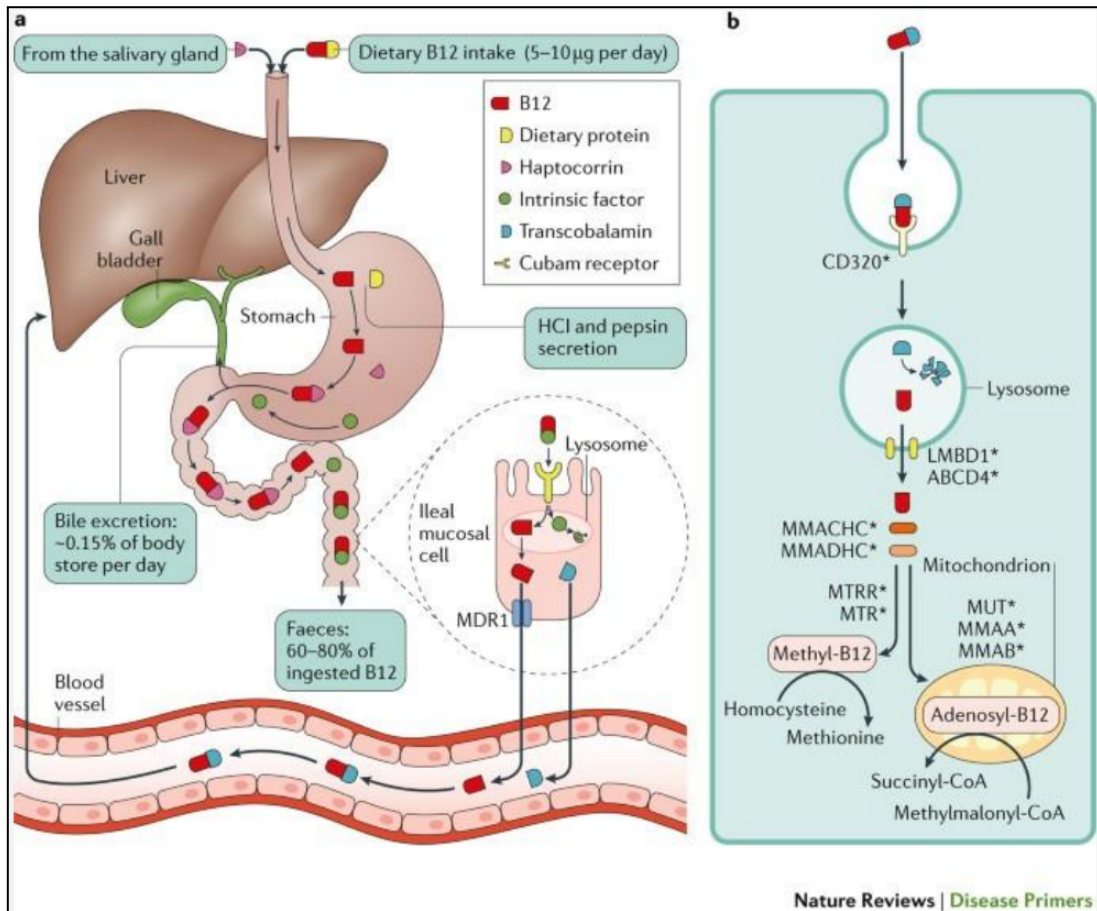


Fig. 5 Assorbimento e circolazione entero-epatica della vitamina B₁₂ (Green *et al.* 2017).

1.3.2 Reazioni metaboliche dell'organismo umano in cui è coinvolta la vitamina B₁₂

Nell'uomo è noto che solamente due reazioni richiedono la cobalamina in forma attiva, cioè nelle sue due forme coenzimatiche⁴: l'AdoCbl e la MeCbl. L'AdoCbl è richiesta per la reazione sostenuta dall'enzima (R)-metilmalonil-CoA mutasi, mentre la MeCbl è richiesta per il funzionamento della metionina sintasi (Fig. 6).

La (R)-metilmalonil-CoA mutasi è coinvolta nel metabolismo del propionil-CoA; questo è derivato dalla degradazione di molecole come timina, valina, metionina e acidi grassi a catena dispari (Martens *et al.* 2002). Il propionil-CoA, nel metabolismo mitocondriale, viene carbossilato per formare (S)-metilmalonil-CoA. Il (S)-metilmalonil-CoA viene successivamente epimerizzato nell'isomero (R). In seguito il (R)-metilmalonil-CoA subisce un riarrangiamento a succinil-CoA grazie all'attività della (R)-metilmalonil-CoA mutasi, AdoCbl-dipendente. Infine il succinil-CoA entra nel

⁴ Coenzima: molecola di natura non proteica che si associa ad un enzima e ne rende possibile l'attività catalitica.

ciclo di Krebs. Nei pazienti carenti di vitamina B₁₂ l'intermedio metilmalonil-CoA si accumula e viene scisso da una idrolasi in coenzima A e acido metilmalonico. Quest'ultimo porta all'acidosi⁵. Parallelamente, i livelli di propionil-CoA aumentano. La citrato sintasi condensa il propionil-CoA con una molecola di acido ossaloacetico per formare acido 2-metilcitrico. Alti livelli di acido 2-metilcitrico, un inibitore dell'aconitasi⁶, alterano il funzionamento del ciclo di Krebs.

L'enzima citoplasmatico MeCbl-dipendente, la metionina sintasi, metila l'omocisteina per formare metionina. La reazione si basa sull'utilizzo del 5-metil-tetraidrofolato come donatore di metile. Tuttavia, le normali concentrazioni di metionina sembrano mantenute anche nei pazienti carenti di vitamina B₁₂ (Martens *et al.* 2002). Una possibile spiegazione di tale fenomeno è data dall'incremento dell'attività della betaina-omocisteina metiltransferasi, che si verificherebbe appunto nelle situazioni in cui il funzionamento della metionina sintasi è compromesso (Fig. 6). La betaina-omocisteina metiltransferasi, MeCbl e folato-indipendente, sintetizza la metionina attraverso il trasferimento del gruppo metile dalla betaina all'omocisteina. Inoltre la metionina viene normalmente integrata con la dieta.

Ciò non toglie che la carenza di vitamina B₁₂ possa portare a complicanze dovute dall'alterazione del metabolismo dell'omocisteina. Una causa dell'insorgenza di malattie come l'anemia megaloblastica (patologia caratterizzata da eritropoesi⁷ inefficace) è proprio la carenza di vitamina B₁₂. Tale forma di anemia è causata dalla cosiddetta "trappola del metilfolato" (Martens *et al.* 2002), che verrà discussa in seguito.

Inoltre, senza un adeguato apporto di vitamina B₁₂ e folato (vitamina B₉), anche la sintesi della S-adenosilmetionina (SAM), molecola derivata della metionina, è compromessa (Agostoni *et al.* 2015). SAM è il donatore di metile universale, usato in oltre 100 reazioni che coinvolgono il metabolismo di amminoacidi, nucleotidi, neurotrasmettitori e fosfolipidi; la sua carenza ha quindi profondi effetti negativi sulle normali funzioni cellulari.

⁵ Acidosi: condizione clinica caratterizzata dalla riduzione del pH del plasma sanguigno, che porta a ripercussioni fisiologiche negative.

⁶ Aconitasi: enzima mitocondriale che catalizza l'isomerizzazione del citrato a isocitrato nel ciclo di Krebs.

⁷ Eritropoesi: processo di formazione dei globuli rossi.

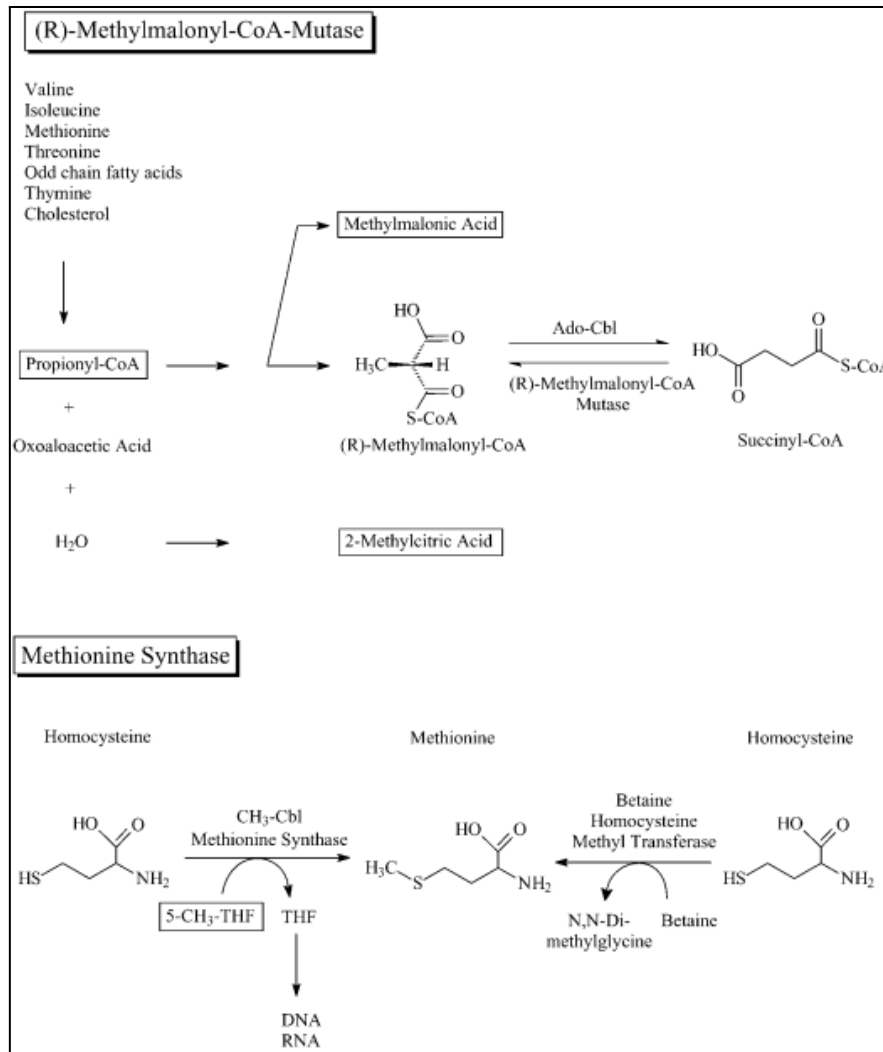


Fig. 6 Reazioni cobalamina-dipendenti nell'uomo e vie metaboliche correlate. Alcuni di questi metaboliti si accumulano durante la carenza di vitamina B₁₂.

5-CH₃-THF, 5-metil-tetraidrofolato; THF, tetraidrofolato (Martens *et al.* 2002).

1.3.3 Patologie umane correlate alla carenza di vitamina B₁₂

A fronte delle due reazioni metaboliche viste in precedenza, ne consegue che la carenza di vitamina B₁₂ può causare forti scompensi e gravi danni, anche permanenti, all'organismo umano.

Prima di, e per, descrivere le principali patologie correlate alla vitamina B₁₂, è importante fare alcune precisazioni riguardo alla vitamina B₉, molecola strettamente connessa dal punto di vista metabolico all'attività della MeCbl (Scott 1999; Agostoni *et al.* 2015). Il folato o acido folico o vitamina B₉ sotto forma di cofattore, il 5-metiltetraidrofolato, è coinvolto nella rimetilazione dell'omocisteina in metionina. Come detto in precedenza, la metionina è poi convertita in S-adenosilmetionina (SAM), questa agisce come donatore di metile per le decine di

metiltransferasi diverse presenti in tutte le cellule. La carenza di 5-metiltetraidrofolato compromette quindi importanti reazioni di metilazione ad opera della SAM (Fig. 7).

Il folato nella sua forma attiva, il tetraidrofolato, è coinvolto nella biosintesi delle purine e delle pirimidine (Fig. 7). La sua carenza determina una riduzione della produzione di basi azotate e, di conseguenza, della biosintesi del DNA e della divisione cellulare. L'effetto più palese è una riduzione degli eritrociti, che causa anemia⁸.

1.3.3.1 Anemia perniciosa

L'anemia perniciosa (PA) è una malattia autoimmune. Nella maggior parte dei casi di PA vengono prodotti anticorpi autoimmuni contro le cellule parietali gastriche, causandone l'atrofia (Scott 1999). Le cellule quindi perdono la loro capacità di produrre fattore intrinseco (IF) e anche di secernere HCl. In alcune forme di PA, invece, le cellule parietali rimangono intatte, ma vengono prodotti anticorpi autoimmuni che reagiscono con il IF. Ciò impedisce la formazione del legame del IF con la vitamina B₁₂, e quindi si verifica un mancato assorbimento intestinale. Esiste un'ulteriore forma meno comune di PA in cui gli anticorpi consentono alla vitamina B₁₂ di legarsi al fattore intrinseco, ma impediscono l'assorbimento del complesso IF-vitamina B₁₂ da parte dei recettori ileali. Come la maggior parte delle malattie autoimmuni, l'incidenza della PA aumenta notevolmente con l'età. Pertanto, nella maggior parte dei gruppi etnici la malattia non si verifica prima dei 50 anni (Butola *et al.* 2020).

La PA non causa solo il malassorbimento della vitamina B₁₂ alimentare, ma si traduce anche nell'incapacità di riassorbire la vitamina B₁₂ che viene secreta quotidianamente nella bile (normalmente calcolata tra 0,3 e 0,5 µg al giorno). L'interruzione di questa cosiddetta circolazione enteroepatica della vitamina B₁₂ fa sì che l'organismo entri in una significativa carenza di vitamina. Il soggetto affetto da PA quindi, non riesce ad assorbire nuova vitamina B₁₂ e perde velocemente la vitamina B₁₂ stoccata nelle ampie riserve epatiche. Una volta che le scorte si sono esaurite e non si integra la vitamina efficacemente (come avveniva fino all'inizio dello scorso secolo), si entra nelle fasi finali della carenza che portano alla morte nel giro di alcuni mesi. Da qui il termine "perniciosa", dal latino *perniciosus* (ovvero capace di nuocere in modo grave e irreparabile), che caratterizza questa anemia.

⁸ Anemia: riduzione patologica dell'emoglobina al di sotto dei livelli di normalità, che determina una ridotta capacità del sangue di trasportare ossigeno.

In passato la PA era considerata la principale causa di malassorbimento della vitamina B₁₂. In realtà la PA non è la causa primaria, di origine patologica, di carenza della vitamina. Più recentemente è stata infatti descritta una patologia riguardante la vitamina B₁₂ molto più comune, ovvero l'acloridria (Scott 1999). Questa è caratterizzata da una progressiva riduzione della capacità delle cellule parietali di secernere HCl. Si stima che fino a un quarto dei soggetti anziani potrebbe soffrire di acloridria di varia gravità. Tale carenza di HCl nel succo gastrico, tra le altre complicanze, impedisce il rilascio di vitamina B₁₂ dalle proteine alimentari. La patologia però non interferisce con l'assorbimento della vitamina B₁₂ alimentare libera, come quella presente negli alimenti fortificati o negli integratori. Inoltre, l'acloridria non impedisce il riassorbimento della vitamina B₁₂ biliare e, quindi, non produce una carenza così drammatica come nel caso della PA. Tuttavia, con il protrarsi dell'acloridria, il ridotto assorbimento di vitamina B₁₂ alimentare finisce per esaurire anche le riserve epatiche di vitamina B₁₂.

1.3.3.2 Neuropatia e anemia megaloblastica

Come spiegato in precedenza, il ciclo della metionina è necessario per mantenere adeguati livelli del donatore di metile SAM. Se la produzione di SAM è interrotta, si verifica la carenza di un'ampia gamma di prodotti metilati. Uno di questi importanti processi di metilazione ha come prodotto finale la mielina⁹. La ridotta produzione di mielina, osservata nella PA e in altri casi di carenza di vitamina B₁₂, provoca infatti demielinizzazione dei neuroni e una neuropatia molto caratteristica nota come “degenerazione combinata subacuta del midollo spinale e dei nervi periferici” (Scott 1999). Se non trattata, questa condizione porta ad atassia¹⁰, paralisi e infine alla morte. Questa forma di neuropatia è solitamente associata alla carenza di vitamina B₁₂, ma non a quella di folati. Nel caso dei folati, la neuropatia si osserva solo se la relativa carenza è molto grave e prolungata. Ciò è dovuto alla consolidata capacità del tessuto nervoso di concentrare il folato fino a circa cinque volte quella del plasma.

L'altra principale forma di manifestazione della carenza di vitamina B₁₂ è l'anemia megaloblastica, identica a quella osservata nel caso di carenza di folati. A prima vista è difficile capire perché la compromissione del ciclo di metilazione dovrebbe causare una riduzione della biosintesi del DNA e

⁹ Mielina: molecola lipo-proteica che si aggrega per formare la guaina mielinica, struttura che riveste gli assoni dei neuroni. Ovvero è un costituente delle fibre nervose, con funzione protettiva e isolante della conduzione dello stimolo nervoso.

¹⁰ Atassia: è un disturbo nervoso che consiste nella progressiva perdita della coordinazione muscolare, rendendo quindi difficoltosa l'esecuzione di alcuni movimenti volontari.

anemia. Questa menomazione è spiegata dall'ipotesi della "trappola del metilfolato" (Scott 1999; Butola *et al.* 2020). Tale fenomeno biochimico ha come base il fatto che l'enzima 5,10-metilentetraidrofolato reduttasi forma il 5-metiltetraidrofolato, ma non è in grado di degradarlo nella reazione inversa (Fig. 7). Pertanto, l'unico modo per riciclare questo cofattore folico è produrre tetraidrofolato, la forma attiva del folato. Il tetraidrofolato, che permette l'efficiente biosintesi del DNA e divisione cellulare, è prodotto attraverso l'enzima metionina sintasi vitamina B₁₂-dipendente. Quando l'attività di questo enzima è compromessa, come accade nella PA, i folati cellulari vengono progressivamente intrappolati come 5-metiltetraidrofolato. Di conseguenza la cellula subisce una sorta di pseudo carenza di folati: è sì presente una fonte di folato quantitativamente adeguata, ma questa risulta intrappolata in una forma che non può essere utilizzata per la biosintesi del DNA.

Pertanto, in condizioni di PA o altro stato carenziale di vitamina B₁₂, ci sarà una neuropatia e/o un'anemia megaloblastica. Il trattamento con vitamina B₁₂, se somministrato per via intramuscolare, riattiverà la metionina sintasi consentendo la ripresa della mielinizzazione. Verrà rilasciato anche il folato intrappolato, consentendo così la sintesi del DNA e la generazione di eritrociti, correggendo l'anemia megaloblastica. È noto che il trattamento con alte concentrazioni di acido folico risolve l'anemia megaloblastica ma non la neuropatia causata dalla PA. Questo perché, quando la forma sintetica dell'acido folico entra nella cellula viene prima convertita in diidrofolato e poi in tetraidrofolato. Questo processo inizialmente si verifica al di fuori della trappola del metile e può quindi avviare la biosintesi del DNA, trattando così l'anemia megaloblastica (Scott 1999).

Sebbene, in condizioni di carenza di vitamina B₁₂ una parte di acido folico sia in definitiva intrappolata come 5-metiltetraidrofolato, la somministrazione continua e adeguata di folato è in grado di curare l'anemia megaloblastica. Questo perché la somministrazione di elevate dosi di folato riesce a superare la capacità delle cellule di convertire il folato sintetico in 5-metiltetraidrofolato, mantenendo quindi attiva la biosintesi del DNA. Tuttavia, la somministrazione di acido folico non può fare nulla per riavviare il ciclo di metilazione, bloccato dall'enzima metionina sintasi vitamina B₁₂-dipendente. Pertanto, la neuropatia continua fino a quando non viene fatto un adeguato trattamento con vitamina B₁₂. In casi di neuropatia molto avanzati la somministrazione di vitamina B₁₂ può curare solo in parte l'eventuale danno nervoso (Scott 1999).

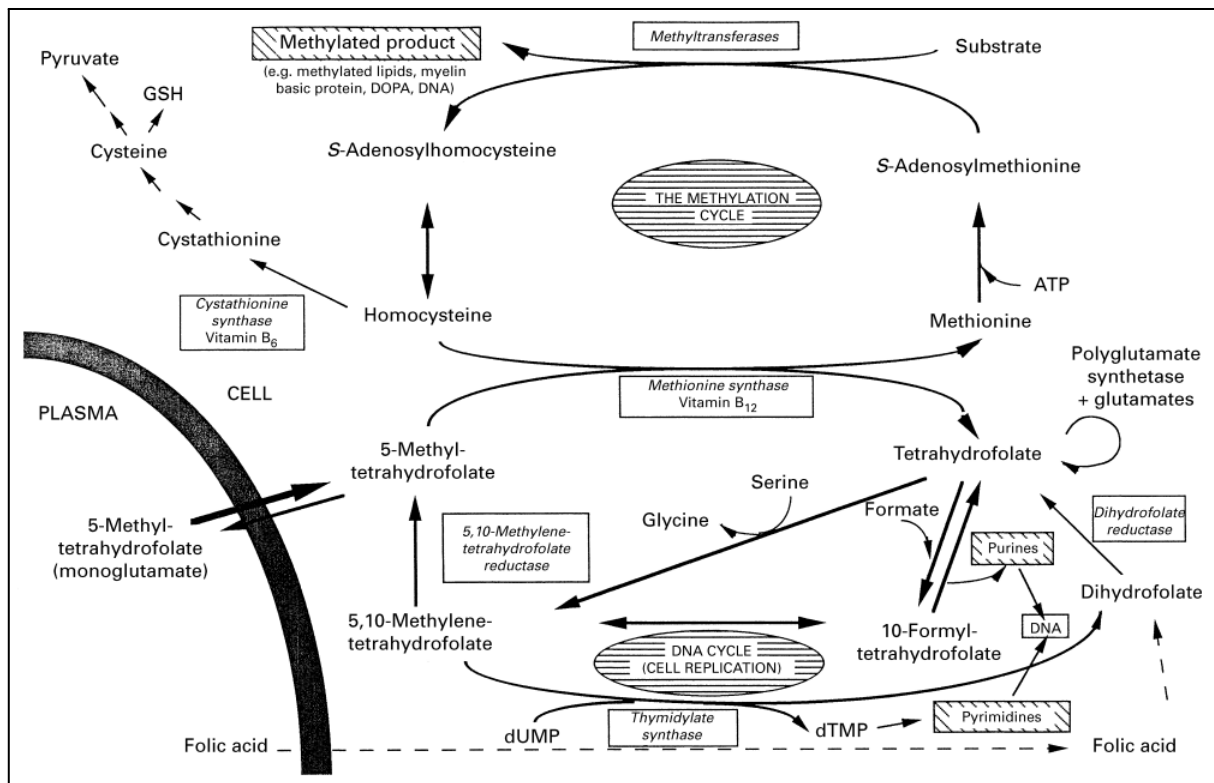


Fig. 7 Ciclo della metionina o ciclo di metilazione e ciclo del folato (Scott 1999).

1.3.3.3 Difetti del tubo neurale NTD

I difetti del tubo neurale (NTD) sono anomalie congenite del sistema nervoso centrale, caratterizzate da alterazione del processo di neurulazione¹¹ (Scott 1999; Butola *et al.* 2020). Il rischio che una madre abbia un bambino affetto da spina bifida o da un altro tipo di NTD aumenta in situazioni carenziali di vitamina B₁₂ e B₉. Nei casi di NTD si è infatti riscontrata una condizione di alterazione del metabolismo della metionina folato-dipendente. Inoltre, è stato dimostrato che lo stato carenziale di vitamina B₁₂ è un fattore di rischio per i NTD, indipendentemente dal livello dei folati. Tali dimostrazioni suggeriscono che l'evento responsabile della chiusura del tubo neurale è dipendente da entrambe le vitamine (Scott 1999).

1.3.3.4 Malattie cardiovascolari

Oltre a causare neuropatie, anemia megaloblastica e NTD, la carenza di vitamina B₁₂ porta ad un aumento dell'omocisteina plasmatica. Ciò avviene perché una delle principali vie del metabolismo dell'omocisteina è il suo riciclo in metionina, grazie alla metionina sintasi vitamina B₁₂-dipendente.

¹¹ Neurulazione: processo parte dell'organogenesi che porta alla differenziazione del sistema nervoso nell'embrione, con la relativa creazione del primo tubo neurale ben definito.

Altri due enzimi sono coinvolti nel controllo del livello plasmatico dell'omocisteina: la cistationina sintasi, vitamina B₆-dipendente, e indirettamente la 5,10-metilene-tetraidrofolato reduttasi, che richiede la vitamina B₉. È noto che la riduzione dei livelli di anche uno solo di questi tre nutrienti aumenta l'omocisteina plasmatica.

Elevati livelli di omocisteina sono un fattore di rischio per malattie cardiovascolari e ictus (Scott 1999; Butola et al. 2020). Tali concentrazioni di omocisteina rischiose sono verificabili anche in condizioni normali di folati e di vitamina B₁₂. Ciò costituisce un aspetto critico nell'identificazione delle suddette patologie.

Inoltre, è stato dimostrato che il rischio patologico associato alla omocisteina plasmatica non presenta un *plateau*, ovvero cresce al crescere dei livelli di omocisteina senza una significativa stabilizzazione (Scott 1999). Questo significa che più sono gravi le carenze vitaminiche in oggetto (B₁₂, B₉ e B₆) maggiore è il rischio dell'insorgenza di malattie cardiovascolari e ictus.

1.3.4 Fabbisogni

Quanto detto finora evidenzia l'esigenza di mantenere nell'organismo livelli di vitamina B₁₂ tali da garantire un buono stato di salute.

In questo senso i LARN, Livelli di Assunzione di Riferimento di Nutrienti ed energia per la popolazione italiana, dichiarano che per la vitamina B₁₂ l'evidenza scientifica non consente di definire l'UL, il livello massimo tollerabile di assunzione (tolerable Upper intake Level), per nessun gruppo di popolazione; ovvero, nessuna quantità di vitamina B₁₂ assunta è associata a effetti avversi sulla salute dell'uomo (Http1). I LARN definiscono anche gli AR per la vitamina B₁₂. Questi rappresentano il fabbisogno medio (Average Requirement), ovvero il livello di assunzione del nutriente che è sufficiente a soddisfare i fabbisogni giornalieri del 50% di soggetti sani in uno specifico gruppo di popolazione.

Infine, il valore più significativo dei LARN è il PRI, l'assunzione raccomandata per la popolazione (Population Reference Intake), ovvero il livello di assunzione del nutriente sufficiente a soddisfare il fabbisogno giornaliero di quasi tutti (97,5%) i soggetti sani in uno specifico gruppo di popolazione. Gli AR e i PRI per la vitamina B₁₂, fissati per fascia d'età, genere e condizione fisiologica, sono riportati in tabella (Tab. 2).

Condizione fisiologica	Età	AR vitamina B12 (µg)	PRI vitamina B12 (µg)
Bambini-adolescenti (M e F)	1-3	0,7	0,9
	4-6	0,9	1,1
	7-10	1,3	1,6
	11-14	1,8	2,2
	15-17	2,0	2,4
Adulti (M e F)	> 17	2,0	2,4
Gravidanza		2,2	2,6
Allattamento		2,4	2,8

Tab. 2 Fabbisogno medio (AR, Average Requirement) e assunzione raccomandata per la popolazione (PRI, Population Reference Intake) della vitamina B₁₂ secondo i LARN (Http1).

Valori di riferimento per l'assunzione di vitamina B₁₂ proposti da altre fonti autorevoli, come quelli della Organizzazione mondiale della sanità (WHO) (Agostoni *et al.* 2015), possono discostarsi, talvolta lievemente, dai LARN (proposti dalla SINU, Società Italiana di Nutrizione Umana).

CAPITOLO II

Ciclo naturale e fonti alimentari

2.1 Ciclo di degradazione e bioaccumulo nell'ecosistema

Come si è potuto evincere nel primo capitolo la vitamina B₁₂ è presente in natura esclusivamente grazie all'attività di sintesi di alcuni microrganismi. Questi, facendo parte del microbiota dell'apparato digerente in vari organismi animali, forniscono le quantità necessarie di vitamina B₁₂ che poi viene distribuita nei tessuti animali. La presenza di vitamina B₁₂ è raramente riscontrabile in tessuti di alcune specie vegetali e in funghi superiori. Ciò è dovuto esclusivamente all'interazione con microrganismi presenti nella litosfera o con quelli della idrosfera (nel caso delle alghe) (Fig. 8).

I ruminanti acquisiscono la vitamina B₁₂ attraverso una relazione simbiotica con i batteri presenti nel loro stomaco (in particolare nel rumine). Ruminanti come il manzo e l'agnello presentano maggiori contenuti di vitamina B₁₂ nei loro tessuti date le loro più grandi popolazioni batteriche, sintetizzanti la vitamina, rispetto a quelle degli animali monogastrici, come suini e pollame (Gille *et al.* 2015). Negli ambienti acquatici la maggior parte del fitoplancton acquisisce la vitamina B₁₂ attraverso un rapporto simbiotico con i batteri marini. Il fitoplancton è una fonte alimentare per pesci e molluschi bivalvi. La vitamina B₁₂ si bioaccumula quindi nei corpi dei predatori situati più in alto nella catena trofica (Watanabe *et al.* 2018).

Pertanto, gli esseri umani acquisiscono la vitamina B₁₂ principalmente dai prodotti alimentari derivati dai ruminanti e dal pesce (o crostacei e molluschi).

Inoltre, i batteri intestinali dei mammiferi, compreso l'uomo, sintetizzano notevoli quantità di vitamina B₁₂ e corrinoidi inattivi (comprese le pseudo forme della vitamina). Questi corrinoidi vengono prevalentemente escreti con le feci, compresa la vitamina B₁₂ se sintetizzata dopo il sito di assorbimento nell'intestino tenue. Vengono poi rapidamente reimmessi nel suolo o nell'acqua, ricircolando così nell'ambiente naturale (Watanabe *et al.* 2013).

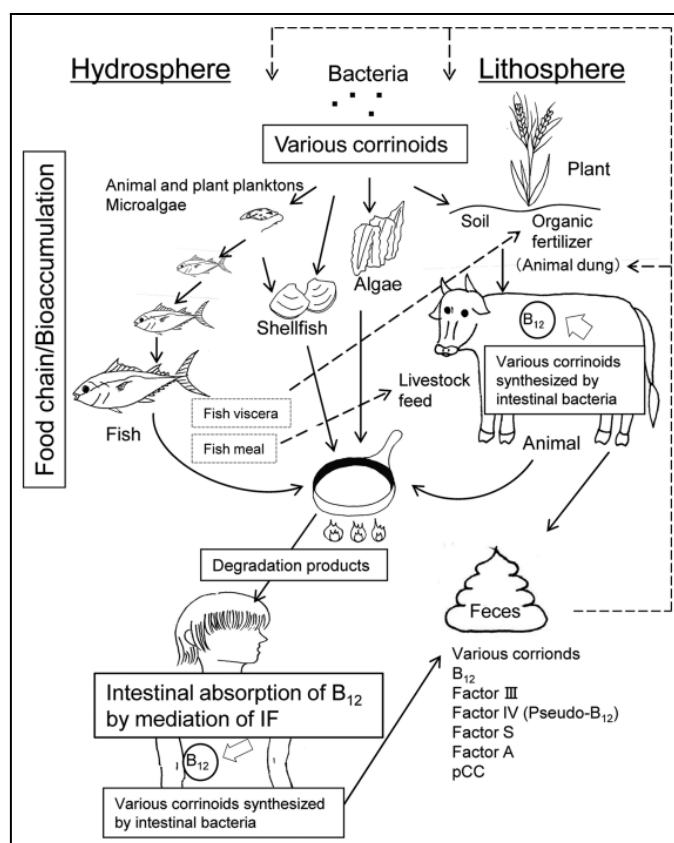


Fig. 8 Ciclo di degradazione e bioaccumulo dei corrinoidi nell'ecosistema (Watanabe *et al.* 2013). Factor III, IV, S, A, pCC, sono vari corrinoidi inattivi, tra cui la pseudovitamina B₁₂ (fattore IV).

Infine una nota importante riguarda la stabilità al calore della vitamina B₁₂. In seguito a cottura, tutte le fonti alimentari di vitamina B₁₂ possono infatti subire notevoli perdite della vitamina. Si formano cioè prodotti di degradazione termica della vitamina B₁₂, che risultano metabolicamente inattivi per l'organismo umano. Questi composti possono derivare da una modifica della parte zuccherina del ligando inferiore e/o da alterazioni dell'anello corrinico.

La gravità di tali perdite della vitamina dipendono dalla temperatura e dal tempo di cottura e sono ulteriormente influenzate dalla presenza di altri ingredienti alimentari, come ad esempio la presenza di polifenoli (Watanabe *et al.* 2018).

L'unica eccezione è la cottura sottovuoto (in busta) che non presenta alcuna perdita di vitamina B₁₂. Non è ancora del tutto chiaro però, se ciò sia dovuto alla tecnica di confezionamento sottovuoto o solo alla minore temperatura di cottura utilizzata.

Infine, la cottura con forno a microonde, ampiamente utilizzata per il riscaldamento di alimenti, mostra una conservazione talvolta migliore di varie vitamine (B₁, B₂, B₆, B₉ e C) rispetto al riscaldamento convenzionale. Nel caso della OHcbl, predominante tra le forme di cobalamina negli

alimenti con alte percentuali di umidità, è comunque riscontrabile una degradazione significativa della struttura vitaminica (Watanabe *et al.* 2013).

2.1.1 Fonti di origine animale

Watanabe e collaboratori si sono occupati di quantificare la vitamina B₁₂ in vari alimenti e di valutare l'effetto della loro assunzione nell'uomo. I livelli sierici (o plasmatici) della vitamina B₁₂ (attraverso il rilevamento di markers dello stato vitaminico) indicano che la carne, il latte e il pesce sono associati a un aumento della vitamina B₁₂ sierica (o plasmatica), in particolare nei paesi occidentali (Watanabe *et al.* 2018).

I bovini e gli ovini sono erbivori e si nutrono di vegetali come l'erba, che è priva di vitamina B₁₂. Questi ruminanti hanno uno stomaco composto da quattro camere contenenti vari microrganismi, tra cui batteri in grado di sintetizzare la vitamina B₁₂ (Watanabe *et al.* 2013). La vitamina B₁₂ sintetizzata nello stomaco viene assorbita nel loro intestino, in maniera del tutto simile a quanto avviene nell'uomo, trasferita nel sangue e immagazzinata nel fegato e nei muscoli dell'animale o secreta nel latte. Il contenuto di cobalto nella dieta è pertanto il fattore più importante che influenza la sintesi di vitamina B₁₂ nei microrganismi dei ruminanti.

I suini e i polli sono onnivori e si nutrono sia di prodotti vegetali che di quelli animali, fonti di vitamina B₁₂. Questi, come altre specie animali, non possiedono però una flora microbica in grado di produrre la vitamina B₁₂ così consistente come quella dei ruminanti (Gille *et al.* 2015).

La concentrazione di vitamina B₁₂ negli alimenti di origine animale è estremamente variabile (Gille *et al.* 2015, Http2, Http3). Come riportato in maniera approfondita da Gille e altri autori (2015) alcuni importanti fattori che influenzano il contenuto della vitamina nei prodotti di origine animale sono: la specie animale, il taglio anatomico, lo stato di allevamento, il trattamento termico e altri processi tecnologici.

Nel caso delle carni, un'importante differenza che determina il contenuto di vitamina B₁₂ risulta essere la specie animale. Il contenuto di vitamina B₁₂ della carne cruda è generalmente più elevato nei ruminanti, con circa 1,0-2,0 µg/100 g (di peso umido), che nel maiale o nel pollo, circa 0,5 µg/100 g e <0,5 µg/100 g rispettivamente. Il fegato è sicuramente la parte anatomica che presenta concentrazioni maggiori della vitamina. Il fegato crudo di manzo contiene 52,8 µg/100 g (di peso

umido), quello di maiale 25,2 µg/100g e quello di pollo contiene 44,4 µg/100 g (Watanabe *et al.* 2018).

Anche la concentrazione di vitamina B₁₂ nel latte di ruminanti varia molto a seconda della specie animale: per quello di pecora la concentrazione è 0,71 µg/100 g (di peso umido), per quello di vacca è 0,35 µg/100 g e per quello di capra è 0,06 µg/100 g. Sebbene il contenuto di vitamina B₁₂ del latte non sia elevato rispetto a quello delle carni, il latte bovino ed i suoi derivati risultano essere le principali fonti di vitamina B₁₂. Questo perché l'assunzione di prodotti lattiero-caseari è molto elevata in diverse popolazioni.

Per quanto riguarda i formaggi, il contenuto di vitamina B₁₂ è generalmente più elevato in quelli a pasta dura e semidura, circa 2,8 µg/100 g, rispetto ai formaggi freschi, circa 1,2 µg/100 g, o molli, circa 1,8 µg/100 g (Watanabe *et al.* 2018).

Le uova di gallina intere, crude e sode, contengono in media 0,9 µg di vitamina B₁₂ per 100 g (della parte commestibile); la maggior parte della vitamina si trova nel tuorlo d'uovo. La biodisponibilità della vitamina B₁₂ nelle uova è però molto bassa, circa il 10%. Di conseguenza, l'assunzione di uova non contribuisce in modo significativo all'aumento della vitamina B₁₂ sierica nell'uomo (Watanabe *et al.* 2018).

Il pesce, i molluschi e i crostacei sembrano essere fonti di vitamina B₁₂ migliori rispetto ai prodotti carnei. I livelli sierici di vitamina B₁₂ sono infatti significativamente superiori nei soggetti che seguono una dieta a base di pesce rispetto a quelli che seguono una dieta a base di carne (Watanabe *et al.* 2018).

Negli ambienti acquatici la vitamina B₁₂ prodotta da alcuni batteri e da *Archaea* viene assunta prevalentemente dal fitoplancton¹² eucariotico, il quale è predato dallo zooplancton¹³. La vitamina B₁₂ viene quindi trasferita ai corpi dei pesci attraverso il plancton e si concentra nei corpi dei predatori più grandi nella catena alimentare oceanica. Pertanto, il contenuto di vitamina B₁₂ nella carne è generalmente più elevato nei pesci carnivori più grandi rispetto ai pesci di piccola taglia: in particolare, è stato dimostrato che quantità sostanziali della vitamina sono accumulate nel fegato e

¹² Fitoplancton: l'insieme degli organismi autotrofi fotosintetizzanti presenti nel plancton.

¹³ Zooplancton: organismi animali non autonomi nel movimento, ma che si lasciano trasportare dalla corrente.

nei reni di tonni e salmone. Ad esempio, nel caso delle aringhe, le quantità di vitamina B₁₂ sono tre volte maggiori nei visceri, circa 37,5 µg/100 g (di peso umido), che nella carne, circa 12,2 µg/100 g. I molluschi, come i bivalvi commestibili (ad esempio vongole, ostriche e cozze), sono noti per contenere quantità significative di vitamina B₁₂, con concentrazioni che arrivano a circa 60 µg/100 g (Watanabe *et al.* 2018).

I dati riportati in tabella sono relativi ad uno studio meno recente di Watanabe (2007) e collaboratori in grado, tuttavia, di fornire una panoramica complessiva della presenza di questa vitamina nei principali prodotti alimentari (Tab. 3).

Foods	Predominate corrinoid ^b	Bioavailability ^c	Content (µg/100 g)
Animal meats			
Mutton, cooked		56%–89% (21)	2.6 (18)
Chicken, cooked		61%–66% (23)	9.4 (18)
Cow's milk		65% (25)	0.4 (18)
Eggs			
Chicken, cooked		<9% (31)	1.3 (18)
Shellfish			
Oyster	Vitamin B ₁₂ (34)		46.3 (34), 28.1 (17)
Mussel	Vitamin B ₁₂ (34)		15.7 (34), 10.3 (17)
Short-necked clam	Vitamin B ₁₂ (34)		37.0 (34), 52.4 (17)
Fish meats			
Skipjack, dark muscle	Vitamin B ₁₂ (36)		158.5 (36)
Yellowfin tuna, dark muscle	Vitamin B ₁₂ (37)		52.9 (37)
Rainbow trout, cooked		42.0% (38)	4.9 (18)
Edible algae			
Purple laver	Vitamin B ₁₂ (54)		32.3 (54), 77.6 (17)
Green laver	Vitamin B ₁₂ (55)		63.6 (55), 31.8 (17)
Chlorella	Vitamin B ₁₂ (56)		200.9–211.6 (56)

Tab. 3 Principali fonti alimentari di vitamina B₁₂, con i rispettivi contenuti medi e biodisponibilità (Watanabe 2007). I numeri tra parentesi riguardano i riferimenti bibliografici dell'articolo citato.

Tecniche più sofisticate, quali ad esempio la cromatografia liquida accoppiata alla ionizzazione elettrospray¹⁴ e successivamente a spettrometria di massa tandem¹⁵ hanno permesso a Watanabe una maggiore precisione nell'identificazione e quantificazione delle molecole.

I valori di biodisponibilità¹⁶ riportati in tabella sono calcolati anche sulla base della limitata capacità dell'organismo umano di assorbire la vitamina B₁₂. Il sistema di assorbimento intestinale mediato dall'IF si satura infatti a circa 1,5-2,0 µg di vitamina B₁₂ per pasto in condizioni fisiologiche. La biodisponibilità della vitamina B₁₂ diminuisce significativamente con l'aumento dell'assunzione di

¹⁴ Ionizzazione elettrospray: tecnica utilizzata come interfaccia per eliminare il solvente usato come eluente in LC. Questa consiste nell'applicazione di un'alta tensione elettrica a un liquido per creare un aerosol ionizzato, analizzabile con spettrometria di massa.

¹⁵ Spettrometria di massa tandem (MS/MS): la spettrometria di massa (MS) è una tecnica utilizzata per identificare molecole misurando il rapporto massa-carica degli ioni. Nella MS/MS due o più spettrometri di massa vengono accoppiati al fine di ottenere maggiori informazioni delle strutture molecolari rispetto a quelle ottenute da MS.

¹⁶ Biodisponibilità: in fisiologia della nutrizione, la quota di un fattore nutritivo introdotto nell'organismo che viene effettivamente utilizzata.

vitamina per pasto (Watanabe 2007). Tale parametro per la vitamina B₁₂ risulta quindi relativo, oltre ad altri fattori interferenti, alla concentrazione della vitamina negli alimenti e alla dose di alimento assunta.

La biodisponibilità media della vitamina B₁₂ alimentare è di circa il 50% per esseri umani sani (Watanabe *et al.* 2018).

2.1.2 Funghi commestibili

Sei specie di funghi selvatici commestibili sono le più consumate tra gli individui vegetariani nei Paesi europei (Watanabe *et al.* 2013). Livelli nulli o in tracce di vitamina B₁₂ (0,01-0,09 µg/100 g di peso secco) sono stati misurati nei corpi fruttiferi essiccati di funghi porcini (*Boletus* sp.), funghi parasole (*Macrolepiota procera*), funghi ostrica (*Pleurotus ostreatus*) e spugnole nere (*Morchella conica*). Al contrario, i corpi fruttiferi di trombetta nera (*Craterellus cornucopioides*) e galletto dorato (*Cantharellus cibarius*) contengono livelli considerevoli di vitamina B₁₂, 1,09-2,65 µg/100 g di peso secco. Tali concentrazioni di vitamina B₁₂ sono state identificate mediante cromatografia liquida - ionizzazione elettrospray associata a spettrometria di massa tandem (Watanabe *et al.* 2018). Il consumo di circa 100 g di trombetta nera essiccata (circa 1 kg di fungo fresco con un contenuto di umidità del 90%) potrebbe fornire il PRI per gli adulti (2,4 µg/giorno), anche se l'ingestione di quantità così elevate non sarebbe proponibile in una comune dieta alimentare. Tuttavia, un'assunzione moderata di queste due specie di fungo può contribuire a raggiungere il fabbisogno giornaliero.

Inoltre, sono stati rilevati alti livelli di vitamina B₁₂ nei corpi fruttiferi essiccati dei funghi shiitake (*Lentinula edodes*) disponibili in commercio. Il contenuto di vitamina B₁₂ dei corpi fruttiferi essiccati di funghi shiitake (100 g di peso secco) varia significativamente e il valore medio di vitamina B₁₂ è di circa 5,61 µg (Watanabe *et al.* 2014). Il consumo di circa 50 g di corpi fruttiferi essiccati di funghi shiitake potrebbe soddisfare il PRI per gli adulti (2,4 µg/giorno). Anche in questo caso diventa difficile inserire nella dieta giornaliera quantità così elevate di questi corpi fruttiferi.

La vitamina B₁₂ trovata nei corpi fruttiferi dei funghi shiitake non è stata attribuita alla biosintesi *ex novo* della vitamina, ma sembra derivare da fonti esterne, presumibilmente batteri presenti sui funghi (Watanabe *et al.* 2018). Il diverso livello di contaminazione batterica spiegherebbe quindi, almeno in parte, la variabilità delle concentrazioni di vitamina B₁₂ nei funghi.

Infine i tartufi (*Tuber* sp.) hanno contenuto di vitamina B₁₂, circa 11,5 µg/100 g di peso secco, superiore a quello riportato per altri corpi fruttiferi di funghi commestibili. In questo caso è ovviamente limitante, oltre alla quantità, il costo economico necessario per raggiungere assunzioni significative di vitamina B₁₂ dal tartufo.

Non sono disponibili informazioni riguardo alla funzione fisiologica della vitamina B₁₂ in questi funghi (Watanabe *et al.* 2018).

2.1.3 Alghe commestibili

Poche specie di alghe commestibili sono diffuse commercialmente a livello mondiale, tra queste solo alcune hanno contenuti di vitamina B₁₂ nutrizionalmente significativi.

Le alghe commestibili alle quali è stato riconosciuto il contenuto di vitamina B₁₂ sono: le alghe verdi del genere *Monostroma*, *Ulva*, *Enteromorpha* e *Chlorella*; le alghe rosse del genere *Porphyra*; i cianobatteri, commercialmente considerati delle alghe, del genere *Arthrospira*, *Aphanizomenon* e *Nostoc*.

Per quanto riguarda le alghe verdi, il genere *Chlorella* è il più conosciuto, questo perché è molto utilizzato negli integratori alimentari di vitamina B₁₂. *Chlorella* è un genere di microalghe verdi unicellulari eucariotiche che comprende tredici specie. Le cellule hanno forma sferica e dimensioni di circa 2-10 µm di diametro.

Watanabe e collaboratori (2018) hanno analizzato il contenuto di vitamina B₁₂ in 19 integratori a base di *Chlorella* essiccata. La concentrazione della vitamina misurata nei diversi integratori era estremamente variabile, da <0,1 µg a circa 415 µg per 100 g di peso secco. Basandosi sul fatto che le cellule di *Chlorella* sp. possiedono un sistema di assorbimento della vitamina B₁₂ (Bito *et al.* 2016), Watanabe *et al.* (2018) hanno concluso che la presenza di tale vitamina nella microalga derivi dall'attività di sintesi batterica esogena. Le forme coenzimatiche della vitamina B₁₂, AdoCbl e MeCbl, erano notevolmente presenti nelle compresse di *Chlorella* (Watanabe *et al.* 2018).

L'alga rossa *Porphyra* sp., conosciuta come alga nori, è una delle colture marine più disponibili in commercio in forma essiccata o diversamente trasformata. Diverse specie di *Porphyra* sono ampiamente consumate come prodotti essiccati in fogli, che contengono grandi quantità di vitamina B₁₂. Sempre Watanabe *et al.* (2018) hanno analizzato il contenuto di vitamina B₁₂ in

diverse alghe nori in commercio. L'alga nori cinese (essiccata), quella neozelandese (essiccata), quella coreana (essiccata) e quella gallese (in scatola) contenevano rispettivamente circa 60,2, 28,5, 66,8 e 2,8 µg di vitamina B₁₂ per 100 g di peso.

I cianobatteri che appartengono al genere *Arthrospira* sono quelli sicuramente più utilizzati negli integratori alimentari. La biomassa composta da *A. platensis* e *A. maxima* è nota con il termine comune di alga spirulina (Edelmann *et al.* 2019). Ciò deriva dal fatto che le specie *A. maxima* e *A. platensis* appartenevano un tempo al genere *Spirulina*.

Le compresse contenenti l'alga spirulina sono vendute come integratori alimentari. In tali compresse Watanabe e collaboratori (2013) hanno trovato concentrazioni di 127-244 µg di corrinoidi del cobalto su 100 g di peso. Dalla caratterizzazione dei corrinoidi è stato scoperto che solo il 17% di tali composti era rappresentato dalla vitamina B₁₂, mentre il restante 83% consisteva nella pseudovitamina B₁₂. Grandi quantità di pseudovitamina B₁₂ (relative alla concentrazione di vitamina B₁₂) sono state trovate nelle polveri di alga spirulina anche da Edelmann *et al.* (2019) e in altri cianobatteri analizzati, del genere *Aphanizomenon* e *Nostoc*, sempre da Watanabe *et al.* (2013).

Pertanto, i cianobatteri non possono essere considerati una fonte di vitamina B₁₂ sempre attendibile, ma va analizzato caso per caso.

Infine il recente studio di Sela e collaboratori (2020) ha trovato concentrazioni rilevanti di vitamina B₁₂ nella pianta acquatica da fiore *Wolffia globosa* (Mankai), conosciuta con i nomi comuni di farina d'acqua asiatica o lenticchia d'acqua. Il ceppo di Mankai coltivato conteneva 2,8 ± 0,5 µg di vitamina B₁₂/100 g di peso secco (DW). Nei campioni di Mankai sono state identificate solo le forme di cobalamina bioattive (o convertibili in bioattive), mentre non è stata rilevata pseudovitamina B₁₂.

Una nota interessante di tale lavoro scientifico è che, pur non avendo determinato l'origine della vitamina B₁₂ nella *W. globosa*, gli autori ipotizzano che la vitamina nella pianta acquatica derivi da una fonte batterica endofita (Sela *et al.* 2020).

CAPITOLO III

La fermentazione microbica come biotecnologia per la sintesi di vitamina B₁₂ in prodotti di origine vegetale

3.1 Introduzione

Nel capitolo II sono state presentate le fonti alimentari che contengono naturalmente la vitamina B₁₂. Prodotti di origine animale, funghi e alghe commestibili, al giorno d'oggi, non rappresentano l'unica opzione per assumere la vitamina B₁₂. Per la vitamina B₁₂, come per altre vitamine, molto in voga sono infatti gli integratori alimentari e gli alimenti fortificati¹⁷.

Attualmente, la CNCbl e la OHCbl possono essere aggiunte sia negli alimenti che negli integratori alimentari, mentre la AdoCbl e la MeCbl, le due forme coenzimatiche della vitamina, possono essere aggiunte solo agli integratori alimentari. Il contenuto di vitamina B₁₂ aggiunta negli alimenti per lattanti e bambini piccoli, e in quelli trasformati a base di cereali è regolamentato a livello dell'Unione Europea (Agostoni *et al.* 2015).

A differenza della forma complessata negli alimenti, che deve essere liberata dai legami con le proteine, le forme di vitamina B₁₂ provenienti dagli integratori e dagli alimenti fortificati, essendo in forma libera, presentano il vantaggio di potersi combinare direttamente con l'aptocorrina (Agnoli *et al.* 2017). Questa glicoproteina è essenziale per la protezione dall'acidità gastrica e permette il trasferimento della vitamina B₁₂ al fattore intrinseco (che consente l'assorbimento enterico).

Dalla più recente letteratura scientifica emerge un'ulteriore possibilità per assumere la vitamina B₁₂. Si tratta di alimenti fermentati che la contengono. Questi sono tradizionalmente presenti in molte culture e vengono prodotti biotecnologicamente a partire da materie prime vegetali naturalmente prive di vitamina B₁₂. Ciò risulta possibile attraverso l'utilizzo *in situ* di ceppi batterici, anche naturalmente presenti, sintetizzanti la vitamina B₁₂. L'attività batterica di biosintesi della vitamina avviene in co-coltura con lieviti responsabili della fermentazione alimentare, anche se indipendentemente da quest'ultima. In maniera alternativa sono gli stessi batteri inoculati, produttori di vitamina B₁₂, ad essere responsabili della fermentazione delle matrici vegetali.

¹⁷ Alimento fortificato: alimento addizionato di nutrienti attraverso specifici processi tecnologici, con l'intento di aumentare la loro assunzione nella popolazione o gruppi di popolazione. Si differenziano dagli alimenti arricchiti, in cui è incrementata la concentrazione di nutrienti già naturalmente presenti, per l'aggiunta *ex novo* di un nutriente.

Questo tipo di processo biotecnologico può essere riscontrato, ad esempio, nella produzione del tempeh. La potenzialità di tale prodotto, come possibile fonte alimentare di vitamina B₁₂, risulta però non riconosciuta a livello commerciale. Ciò è dovuto dall'attuale mancanza di dati a riguardo che provengano da fonti autorevoli (Agostoni *et al.* 2015; Agnoli *et al.* 2017). Il motivo per il quale enti come l'EFSA o la SINU non abbiano espresso un parere positivo rispetto al contenuto di vitamina B₁₂ in prodotti come il tempeh, in particolar modo, riguarda l'alta variabilità di processo che tale produzione presenta.

Nel presente capitolo verranno esposti ed analizzati vari lavori scientifici della più recente letteratura (articoli degli ultimi 10 anni). *In primis* verranno riportati gli articoli riguardanti il tempeh, come principale, se non unico, esempio di prodotto vegetale fermentato con contenuto di vitamina B₁₂ (potenziale, in base alle variabili di processo), presente in commercio.

In seguito verranno considerati altri lavori, di carattere principalmente innovativo, che riguardano la fermentazione *in situ* per apportare vitamina B₁₂ a matrici vegetali diverse.

Questi ultimi articoli scientifici riportano sostanzialmente processi di bio-fortificazione *in situ* innovativi, che si differenziano da quelli di fortificazione convenzionale. Normalmente, infatti, il nutriente da additivare viene preventivamente sintetizzato, per via chimica o biologica, e in seguito aggiunto alla matrice alimentare da fortificare.

3.2 Tempeh

Tra i numerosi prodotti a base di soia di origine asiatica, il tofu e il tempeh godono di un crescente interesse da parte dei consumatori che seguono diete prevalentemente a base di alimenti vegetali. Il tempeh (o tempe), in particolare, è un prodotto fermentato tradizionale indonesiano (Romulo *et al.* 2021). Il processo di produzione del tempeh prevede che i semi di soia (o, in alternativa, quelli di altri legumi) vengano lavati, immersi in acqua, decorticati, bolliti e incubati con uno starter.

Il processo di ammollo permette a batteri lattici, normalmente presenti nella matrice vegetale, di effettuare la fermentazione lattica, con conseguente acidificazione del mezzo, che interferisce con lo sviluppo di microrganismi alteranti. L'ammollo, inoltre, consente una completa idratazione della soia e facilita la successiva decorticazione. È essenziale che la soia sia decorticata al fine di favorire lo starter per l'accesso ai nutrienti dei semi e quindi ottenere un'efficiente fermentazione. La fase di bollitura ha lo scopo di ammorbidire i semi e di uccidere i microrganismi indesiderati. Dopo essere stata bollita e raffreddata, la soia viene inoculata con *Rhizopus* sp. (*R. oligosporus*, *R. oryzae*,

R. microsporus, *R. chinensis* e *R. arrhizus*) e incubata in condizioni microaerofile a 30 ± 2 °C per 48 ore.

Durante l'incubazione, la fermentazione fungina provoca l'idrolisi di lipidi e proteine, aumentando il contenuto di acidi grassi e aminoacidi liberi, e diminuisce il contenuto di carboidrati. Inoltre, la fermentazione sviluppa aromi tipici e migliora la biodisponibilità di alcuni sali minerali.

Le spore di *Rhizopus* sp. si disperdono e sviluppano un denso micelio bianco tra i semi di soia, formando un panetto compatto che presenta classiche venature biancastre (Fig. 9).

È noto che la potenziale presenza di vitamina B₁₂ nel tempeh sia dovuta all'attività biosintetica di batteri contaminanti, quali *Citrobacter freundii* e *Klebsiella pneumoniae*. Quest'ultimo batterio, in particolare, si svilupperebbe principalmente durante la fase di ammollo della soia (Kustyawati *et al.*, 2020) e verrebbe prevalentemente ucciso, eventuali ceppi patogeni compresi, dalla successiva cottura dei semi di soia (Romulo *et al.* 2021).



Fig. 9 Tempeh di soia intero da cuocere (Romulo *et al.* 2021).

In questo sottocapitolo verranno presentati lavori scientifici che analizzano il contenuto di vitamina B₁₂ derivante da un processo di fermentazione *in situ*. Di ogni articolo verranno evidenziate le relative potenzialità e limiti. In particolare, l'efficacia del processo biotecnologico, nell'ottica di apportare la vitamina B₁₂, sarà valutata in base alla concentrazione di vitamina B₁₂ misurata nel prodotto finito e alle interazioni microbiche che lo hanno permesso.

3.2.1 Effetto della lavorazione della soia sul contenuto di folato, vitamina B₁₂ e isoflavoni nel tofu e nel tempeh

Mo e coautori si sono posti l'obiettivo di confrontare il contenuto di vitamina B₉, vitamina B₁₂ e isoflavoni¹⁸ nel tofu e nel tempeh, e come questo veniva influenzato dalla varietà di soia e dal processo di produzione, in particolare dalla fermentazione. Per quanto riguarda la vitamina B₁₂,

¹⁸ Isoflavoni: composti fenolici di origine vegetale appartenenti ai flavonoidi (metaboliti secondari delle piante).

essi hanno concluso che il tofu non presentava alcun contenuto di vitamina B₁₂, mentre il tempeh sì. Ciò era dato dall'attività batterica avvenuta durante la fermentazione della soia per la produzione del tempeh. La varietà dei semi di soia non influiva significativamente sul contenuto di vitamina B₁₂ (Mo *et al.* 2013). Quest'ultima variabile non verrà quindi presa in considerazione nella descrizione del presente studio, dato il fine di analizzare solo il contenuto di vitamina B₁₂.

Tra i microrganismi utilizzati nello studio vi era il *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* LU573, pre-coltivato fino ad ottenere una coltura ben sporificata. Le spore di tale ceppo sono state poste in sospensione e inoculate, dopo la fase di ammollo, per la fermentazione della soia. Per la produzione di tempeh è stato utilizzato anche uno starter commerciale in polvere, proveniente dall'Indonesia, di composizione non definita.

Infine, *Lactobacillus plantarum* LU852 è stato incubato in brodo di coltura e utilizzato per inoculare l'acqua di ammollo prima dell'aggiunta dei fagioli di soia crudi.

Per la produzione di tempeh sono stati formulati quattro scenari di processo, al fine di includere diverse variabili nelle condizioni di ammollo e in quelle di inoculo (Fig. 10). Un quinto scenario riguardava la produzione del tofu, che non verrà quindi preso in considerazione.

Due scenari di produzione del tempeh (1 e 2) prevedevano l'ammollo della soia "al naturale", ovvero per 24 ore a 30 °C in acqua. Nel primo scenario (1) la soia ammollata e decorticata è stata inoculata con lo starter puro, cioè con 10⁶ UFC/g di coltura pura di *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* LU573. Per il secondo scenario (2) è stato invece usato lo starter misto, che consisteva in 10⁶ UFC/g di starter commerciale.

Gli altri due scenari (3 e 4) prevedevano l'ammollo della soia, per formare una matrice "acida". In questo caso i semi sono stati ammollati per 24 ore a 30 °C in acqua inoculata con 10⁶ UFC/mL di coltura pura di *Lactobacillus plantarum* LU852. In seguito, analogamente ai primi due scenari (1 e 2), la soia del terzo scenario (3) è stata inoculata con lo starter puro, mentre quella del quarto scenario (4) con lo starter misto commerciale.

Infine tutti e quattro i tipi di tempeh sono stati sottoposti a cottura in forno a microonde per 5 minuti (Mo *et al.* 2013).

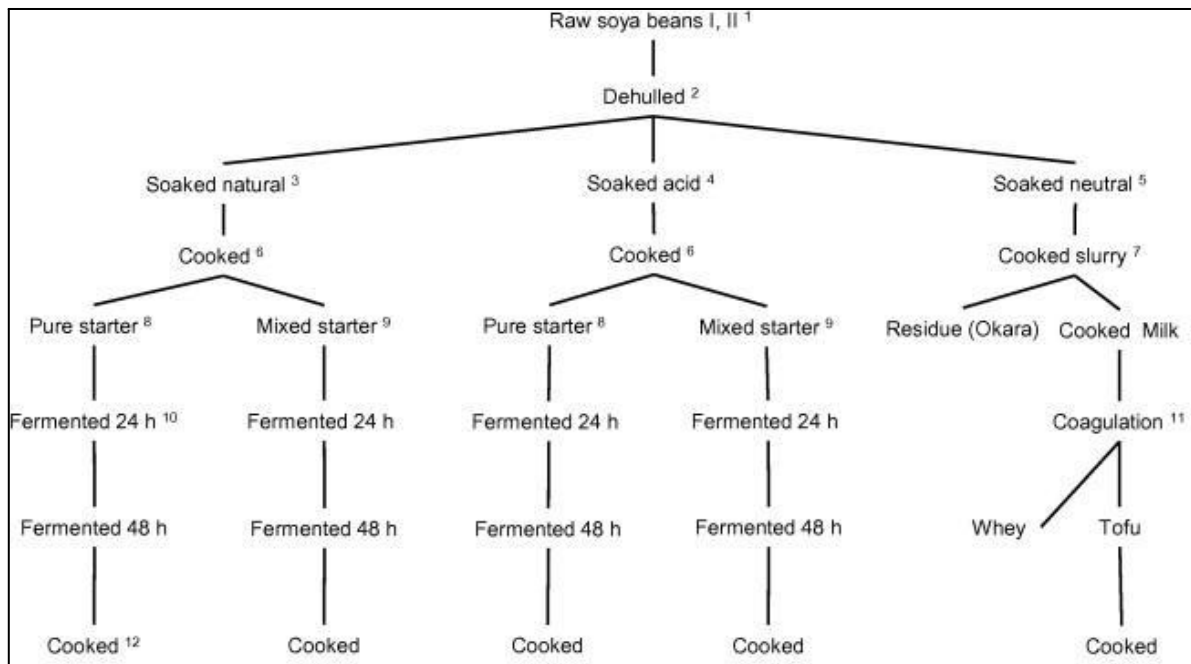


Fig. 10 Scenari di lavorazione della soia per il tempeh (e il tofu) (Mo *et al.* 2013).

I, semi di soia a occhio nero; II, semi di soia a occhio bianco; ⁿ, numeri all'apice per la descrizione nell'articolo originale.

Lo studio ha condotto analisi microbiologiche per dimostrare la possibile relazione tra lo sviluppo batterico e la formazione di vitamina B₁₂. La diversità microbica è stata stimata mediante estrazione diretta del DNA e analisi del 18S rDNA, utile per l'identificazione di microrganismi eucarioti.

L'ammollo "al naturale" (scenari 1 e 2) ha portato a un'abbondante crescita di batteri lattici, ma il pH relativamente alto (rispetto all'acqua di ammollo degli scenari 3 e 4) ha permesso anche la crescita di altri batteri, quali *Enterobacteriaceae*. Negli scenari che prevedevano l'ammollo "acido" della soia (3 e 4), attraverso l'utilizzo di *Lactobacillus plantarum* (10⁶ UFC/mL di acqua), si è riscontrata una concentrazione di batteri vitali totali notevolmente inferiore rispetto ai primi due casi. Ciò si è tradotto in concentrazioni inferiori di batteri lattici (non inoculati) e nell'assenza di *Enterobacteriaceae*, quest'ultima a favore della sicurezza alimentare del prodotto finito.

I batteri lattici predominanti nei primi due casi (1 e 2) erano *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* e *Leuconostoc fallax* in ordine decrescente.

Lo starter commerciale conteneva *R. microsporus* var. *microsporus* e *R. microsporus* var. *chinensis*, con contaminazioni minori da funghi del suolo (*Cladosporium cladosporioides*) ed *Enterobacteriaceae*.

Solo nel tempeh del primo scenario (1) le *Enterobacteriaceae* sono state in grado di proliferare abbondantemente, ma comunque in modo non sufficiente per produrre livelli di vitamina B₁₂ tali da influire sulle concentrazioni finali (Mo *et al.* 2013).

Per l'analisi del contenuto di vitamina B₁₂ sono stati raccolti diversi campioni, oltre che dalla soia cruda (come controllo negativo), dalla soia ammollata, per il tempeh fermentato e per il tempeh cotto. Questi campioni comprendevano tutti gli scenari di produzione del tempeh, e comunque, ogni campione è stato liofilizzato, macinato e setacciato per l'analisi della vitamina B₁₂.

La determinazione della presenza di vitamina B₁₂ è stata ottenuta con un test microbiologico. Il test si basava sull'utilizzo di *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 7830, come organismo indicatore di crescita, e della CNCbl, come standard esterno. Questo ceppo, infatti, non è in grado di crescere in assenza di vitamina B₁₂ e l'entità dello sviluppo è proporzionale alla quantità di vitamina presente. Il fegato di maiale è stato utilizzato come materiale di riferimento per il suo contenuto di vitamina B₁₂.

La vitamina B₁₂ è stata determinata solo nei prodotti fermentati (Tab. 4). Tutti gli scenari (1-4) hanno dato luogo a un livello simile di biosintesi di vitamina B₁₂. Il miglior valore di vitamina B₁₂ è stato trovato nel tempeh fermentato del quarto scenario (4), con 1,06 µg/kg di peso secco (DW). Tale concentrazione trovata dallo studio, 1,06 µg/kg DW ovvero 0,106 µg/100 g DW, risulta nutrizionalmente non significativa, dato il fabbisogno giornaliero medio di 2,4 µg di vitamina B₁₂.

Questo dato quantitativamente insoddisfacente è sceso a 0,072 µg/kg DW in seguito alla cottura (Mo *et al.* 2013).

Da tale studio del 2013, si possono quindi trarre conclusioni positive solo a livello qualitativo. Ovvero informazioni sulle condizioni di crescita delle *Enterobacteriaceae*, come *K. pneumoniae* (noto produttore di vitamina B₁₂, ma anche specie che presenta ceppi patogeni), nel processo di produzione del tempeh. Lo sviluppo di tale famiglia di batteri, secondo lo studio, è infatti inibito dall'attività acidificante dei batteri lattici.

Infine, la più importante informazione che può essere tratta dallo studio è l'effettiva potenzialità di specie batteriche di produrre la vitamina B₁₂ in condizioni fermentative *in situ*.

	Vitamin B12 ($\mu\text{g}/\text{kg DM}$)			
	I	II		
Soybean type (I or II)				
Raw soybeans	-	-		
<i>Scenario 1</i>				
Soaked natural	-	-		
Cooked natural	-	-		
Tempe natural pure fermented 24 h	0.62	0.40		
Tempe natural pure fermented 48 h	0.46	0.51		
Cooked tempe natural pure	0.16	0.46		
<i>Scenario 2</i>				
Soaked natural	-	-		
Cooked natural	-	-		
Tempe natural mixed fermented 24 h	0.58	0.71		
Tempe natural mixed fermented 48 h	0.83	0.72		
Cooked tempe natural mixed	0.55	0.62		
<i>Scenario 3</i>				
Soaked acid	-	-		
Cooked acid	-	-		
Tempe acid pure fermented 24 h	0.86	0.48		
Tempe acid pure fermented 48 h	0.85	0.46		
Cooked tempe acid pure	0.34	0.52		
<i>Scenario 4</i>				
Soaked acid	-	-		
Cooked acid	-	-		
Tempe acid mixed fermented 24 h	0.63	0.85		
Tempe acid mixed fermented 48 h	1.06	0.82		
Cooked tempe acid mixed	0.72	0.36		
<i>Scenario 5</i>				
Soaked neutral for tofu	-	-		
Tofu okara	-	-		
Tofu	-	-		
Cooked tofu	-	-		

Tab. 4 Contenuto di vitamina B₁₂ dei prodotti di soia ottenuti attraverso cinque scenari di lavorazione (Mo *et al.* 2013). Tutti i campioni sono stati analizzati con misurazioni in doppio. Le differenze tra i duplicati non hanno superato il 10% delle medie.

-, non determinato; I, semi di soia a occhio nero; II, semi di soia a occhio bianco.

3.2.2 Produzione di vitamina B₁₂ nella fermentazione della soia per il tempeh

Questo studio ha avuto come fine quello di analizzare l'effetto di colture starter selezionate sul contenuto di vitamina B₁₂ e di isoflavoni nella fermentazione della soia per la produzione di tempeh. Kustyawati *et al.* (2020) hanno riscontrato che la produzione del tempeh era possibile solo con l'inoculo di *Rhizopus* sp. Hanno trovato concentrazioni di vitamina B₁₂ nutrizionalmente significative in diversi campioni di tempeh prodotti e hanno inoltre osservato che l'inoculo di *Saccharomyces cerevisiae* aveva un effetto positivo sulla concentrazione finale di vitamina B₁₂, pur non essendo in grado di sintetizzarla.

Le colture starter utilizzate in questo studio contenevano *Rhizopus oligosporus*, isolato dal tempeh, *Saccharomyces cerevisiae*, isolato dal prodotto commerciale "Fermipan", e *Klebsiella* sp. non patogena, isolata dal tempeh. Quest'ultimo batterio è stato preventivamente coltivato in un terreno di crescita solido, mentre le colture fungine, *R. oligosporus* e *S. cerevisiae*, sono state coltivate in terreno liquido a 37 e 32 °C rispettivamente, per 24 ore.

Le cellule provenienti da tutte le colture sono state sospese per ottenere concentrazioni di 10⁵ UFC/100 g per l'inoculo.

Per la produzione del tempeh, 300 g di semi di soia sono stati messi a bagno, in acqua, per una notte a temperatura ambiente e poi decorticati manualmente. La soia decorticata è stata bollita in

acqua con un rapporto di 1:3 (soia/acqua) per 30 minuti. I semi sono stati quindi scolati e asciugati all'aria a temperatura ambiente. Tale processo è stato svolto cinque volte per ottenere cinque matrici di soia da inoculare con cinque diverse combinazioni delle tre colture microbiche. Le tre colture starter (10^5 UFC/100 g) sono state inoculate come segue: soia + *R. oligosporus* + *Klebsiella* sp. (SRK); soia + *R. oligosporus* + *S. cerevisiae* (SRSc); soia + *R. oligosporus* + *S. cerevisiae* + *Klebsiella* sp. (SRScK); soia + *R. oligosporus* (SR); soia + *Klebsiella* sp (SK). I semi di soia inoculati sono stati confezionati in imballaggi di plastica perforati e incubati a 30 ± 2 °C per 40 ore. Inoltre, sono stati fatti fermentare semi di soia non inoculati, come controllo. Per ogni esperimento sono state effettuate tre repliche.

Per ciascuna matrice di soia fermentata è stato analizzato il numero totale di batteri e funghi, all'inizio (0 ore) e alla fine della fermentazione (40 ore). L'analisi microbiologica è stata svolta con l'utilizzo di tre diversi mezzi di coltura selettivi. L'incubazione dei campioni, adeguatamente omogeneizzati e diluiti, è avvenuta rispettivamente a 37, 27, 32 °C nel terreno selettivo per *Klebsiella* sp., in quello per *S. cerevisiae* e in quello per *R. oligosporus*, per 24-48 ore.

L'inoculo di *S. cerevisiae* e di *Klebsiella* sp. insieme o separatamente non ha influenzato la crescita di *R. oligosporus*. Nella fermentazione della soia, è possibile che *R. oligosporus* abbia svolto un ruolo di supporto alla crescita di altri microrganismi. Tale fungo produce infatti diversi enzimi, tra cui lipasi e proteasi, che producono (dall'idrolisi di lipidi e di proteine) acidi grassi e aminoacidi, utilizzabili da batteri e lieviti. Infatti, *Klebsiella* sp. risulta essere cresciuta, dopo 40 ore di fermentazione, anche nelle matrici che non erano state inoculate del batterio, ovvero SR e SRSc (Tab. 5). Ciò può essere un'importante rappresentazione del fatto che batteri sintetizzanti vitamina B₁₂ non inoculati, ovvero contaminanti, riescano a svilupparsi abbondantemente durante la fermentazione fungina per la produzione del tempeh, apportando quindi la vitamina al prodotto finito.

Type of isolates in soy fermentation	Microbial number (CFU g ⁻¹) at					
	0 h of fermentation			40 h of fermentation		
	Ro	Sc.	K	Ro	Sc.	K
SR	2.6×10^3	ND	ND	3.4×10^6	ND	2.0×10^8
SRSc	2.8×10^3	3.6×10^3	ND	4.5×10^6	1.2×10^6	1.1×10^8
SRScK	4.4×10^3	6.3×10^3	1.0×10^3	5.6×10^5	3.7×10^5	2.5×10^8
SRK	5.0×10^3	ND	2.7×10^3	3.0×10^5	ND	1.9×10^8
SK	ND	ND	2.1×10^3	ND	ND	2.7×10^8

Tab. 5 Numero totale di microrganismi nella fermentazione della soia inoculata con diverse colture (Kustyawati *et al.* 2020).

I dati riportati nella tabella rappresentano il valore medio delle tre repliche delle analisi microbiologiche.

SRK, soia + *R. oligosporus* + *Klebsiella* sp.; SRSc, soia + *R. oligosporus* + *S. cerevisiae*; SRScK, soia + *R. oligosporus* + *S. cerevisiae* + *Klebsiella* sp.; SR, soia + *R. oligosporus*; SK, soia + *Klebsiella* sp.

ND, non rilevato; Ro, *R. oligosporus*; Sc., *S. cerevisiae*; K., *Klebsiella* sp.

Il metodo di analisi della vitamina B₁₂ prevedeva un'estrazione ad ultrasuoni in acqua. L'estratto, adeguatamente trattato e filtrato, è stato iniettato nel sistema HPLC (con colonna C-18). La soluzione standard è stata preparata con CNCbl.

R. oligosporus è risultato essere un microrganismo essenziale per la produzione di tempeh. Infatti, quando *Klebsiella* sp. è stata utilizzata come unica coltura starter, il tempeh non è stato prodotto (Kustyawati *et al.* 2020).

Quando *R. oligosporus* è stato utilizzato come inoculo nella fermentazione della soia (SR), si è ottenuta una quantità di vitamina B₁₂ di circa 2,88 µg/ 100 g (peso umido), mentre dal co-inoculo di *R. oligosporus* con *Klebsiella* sp. (SRK) è derivata una quantità inferiore di vitamina B₁₂ (0,81 µg/ 100 g di peso umido) (Tab. 6). La presenza di *S. cerevisiae* durante la fermentazione del tempeh è risultata vantaggiosa dal punto di vista nutrizionale. Quando *S. cerevisiae* è stato co-inoculato con *R. oligosporus* (SRSc), nel tempeh è stata prodotta la più alta quantità di vitamina B₁₂, 3,15 µg/ 100 g (peso umido). Ciò può essere dovuto al fatto che *S. cerevisiae* è un lievito ricco di cobalto e quindi fornisca in maniera aggiuntiva tale elemento minerale ai ceppi batterici responsabili della sintesi di vitamina B₁₂ nel tempeh.

I semi di soia non inoculati, utilizzati come controllo del processo di produzione del tempeh (dai quali evidentemente non si è riusciti ad ottenere il prodotto finito), contenevano una quantità di vitamina B₁₂ più bassa rispetto a tutti i campioni di tempeh ottenuti con soia inoculata (0,36 µg/ 100 g). Tale concentrazione di vitamina B₁₂ non era però nulla. Ciò rappresenta un'altra prova del fatto che la contaminazione batterica sia direttamente responsabile della sintesi di vitamina B₁₂ nella soia per la produzione del tempeh.

Dato il PRI di 2,4 µg di vitamina B₁₂ al giorno, una normale assunzione del tempeh prodotto dallo studio di Kustyawati *et al.* (2020) potrebbe essere sufficiente a soddisfare il fabbisogno individuale della vitamina, o quasi. Infatti, nella migliore delle ipotesi formulata dallo studio, con una concentrazione di vitamina B₁₂ di 3,15 µg/100 g, il consumatore può soddisfare il suo fabbisogno giornaliero consumando circa 76,2 g di tempeh. Si evidenzia che a seguito della cottura sarebbe

necessario consumare maggiori quantità di tempeh, date le perdite vitaminiche causate dal calore, non studiate dal presente articolo.

Isolated culture	Initial pH	Final pH	Water content (%)	Vit B ₁₂ (Mcg100 g ⁻¹)	Daidzein (Mcg g ⁻¹)	Genistein (Mcg g ⁻¹)
SR	6.2	6.40	65.1 ± 0.19	2.88 ± 0.50	276.17 ± 0.20	492.96 ± 1.0
SRSc	6.2	6.10	65.23 ± 0.80	3.15 ± 0.70	224.37 ± 0.20	465.12 ± 0.90
SRScK	6.2	6.60	65.14 ± 0.10	1.64 ± 0.9	753.96 ± 0.15	1072.87 ± 0.90
SRK	6.2	6.60	65.24 ± 0.20	0.81 ± 2.00	781.76 ± 0.15	1071.85 ± 1.0
SK	6.2	7.40	65.91 ± 0.50	0.39 ± 1.9	782.17 ± 0.30	1072.51 ± 0.70
Soybean only	6.2	6.20	65.0 ± 0.50	0.36 ± 0.42	0.69 ± 0.20	0.25 ± 0.60

Tab. 6 Effetto delle colture inoculate sul pH e nella produzione di vitamina B₁₂, daidzeina e genisteina (due composti appartenenti agli isoflavoni) durante la fermentazione del tempeh (Kustyawati *et al.* 2020). SRK, soia + *R. oligosporus* + *Klebsiella* sp.; SRSc, soia + *R. oligosporus* + *S. cerevisiae*; SRScK, soia + *R. oligosporus* + *S. cerevisiae* + *Klebsiella* sp.; SR, soia + *R. oligosporus*; SK, soia + *Klebsiella* sp.

Va osservato che tali ottime concentrazioni di vitamina B₁₂ sono relative al peso umido del tempeh (contenuto di acqua dei campioni compreso nell'intervallo 65-66%), ovvero a quello del prodotto finito tal quale. Da questo studio si ottiene una valutazione del tempeh come fonte di vitamina B₁₂ molto positiva, rispetto a quella che emerge dal lavoro di Mo *et al.* del 2013, che riportava concentrazioni di vitamina B₁₂ nell'ordine di 0,1 µg/ 100 g di peso secco. Tale notevole discrepanza può essere causata dalle diverse condizioni sperimentali e di quantificazione proposte dai due studi. I due gruppi di ricerca hanno usato differenti processi di produzione del tempeh, che prevedevano inoculi di colture microbiche diverse.

3.2.3 Miglioramento della vitamina B₁₂ nel tempeh di lupino mediante fortificazione in situ

Nello studio di Wolkers-Rooijackers e collaboratori (2018), *Propionibacterium freudenreichii*, un batterio produttore di vitamina B₁₂, è stato utilizzato in co-cultura con *Rhizopus oryzae* per produrre tempeh di lupino, come alternativa a quello di soia. Questo studio si è quindi posto l'obiettivo di determinare i parametri di fermentazione ottimali per aumentare il contenuto di vitamina B₁₂ nel tempeh di lupino co-inoculato. Tutti i ceppi di *P. freudenreichii* presentano l'importante caratteristica di essere riconosciuti come generalmente sicuri (GRAS) (Wolkers-Rooijackers *et al.* 2018).

Per la fermentazione del lupino, il ceppo utilizzato in questo lavoro era *Rhizopus oryzae* CBS 285.55. Il ceppo è stato incubato per ottenere una coltura completamente sporificata. Le spore sono state raccolte e poste in soluzione.

Klebsiella pneumoniae IEMP-3, ceppo batterico produttore di vitamina B₁₂ isolato dal tempeh di soia, è stato utilizzato come controllo positivo. Il ceppo batterico produttore di vitamina B₁₂ utilizzato nello studio era invece *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSM 20271, isolato da formaggio svizzero. I batteri sono stati posti in coltura, *K. pneumoniae* è stato incubato in aerobiosi, mentre *P. freudenreichii* è stato incubato in anaerobiosi. In entrambi i casi la coltura è stata diluita in modo da ottenere l'inoculo.

Il substrato utilizzato per la produzione del tempeh è stato il lupino tritato, con una dimensione delle particelle di triturato di 1-2,8 mm. I semi tritati di lupino sono stati ammollati in acqua acidificata (pH 4,1) con acido lattico. L'ammollo è avvenuto a 30 °C per 15 ore. In seguito, il lupino è stato cotto per 20 minuti in acqua (rapporto fagioli/acqua 1:3). I semi di lupino lavorati sono stati stesi su una rete metallica come strato di circa 1 cm di spessore e quindi essiccati all'aria per 2 ore. Dopo l'essiccazione, la massa di lupino è stata inoculata come segue: una parte con *R. oryzae* (10⁴ UFC/g) e *P. freudenreichii* (10³ UFC/g), una con *R. oryzae* e *K. pneumoniae* ed infine una solamente con *R. oryzae*, come controllo.

Le masse di lupino diversamente inoculate sono state incubate a due diversi regimi di temperatura: per il primo regime era prevista una temperatura di 25 °C per 44 ore; il secondo regime prevedeva prima una temperatura di 30 °C per 24 ore e poi una di 25 °C per 20 ore (in Tab. 7 i due regimi sono denominati rispettivamente come "25 °C" e "30 °C").

Notando scarsi contenuti di vitamina B₁₂ nel tempeh co-inoculato con *R. oryzae* e *P. freudenreichii*, Wolkers-Rooijackers *et al.* hanno riformulato l'esperimento co-inoculando tale batterio alle seguenti differenti concentrazioni: 10³, 10⁵ e 10⁷ UFC/g di lupino.

La quantità di vitamina B₁₂ presente nel tempeh di lupino è stata determinata con un test microbiologico. Questo si basava sul fatto che la crescita di *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 è dipendente dalla presenza di vitamina B₁₂. *L. leichmannii* è stato inoculato nel campione di tempeh adeguatamente solubilizzato. E' stata quindi misurata la variazione della densità ottica OD causata dallo sviluppo vitamina B₁₂-dipendente del ceppo batterico. Dalla differenza di OD misurata è stata dedotta (attraverso formula matematica) la concentrazione di vitamina B₁₂ del campione.

In primo luogo, si è osservato che il tempeh di lupino inoculato solo con *R. oryzae* (il controllo), non presentava alcun contenuto di vitamina B₁₂, o comunque questo non era significativo (Tab. 7). Oltre all'incapacità di *R. oryzae* di sintetizzare la vitamina B₁₂, ciò era evidentemente dovuto alla mancata contaminazione di batteri sintetizzanti la vitamina. Il coinoculo con *K. pneumoniae* (Kp), a seguito di due giorni di fermentazione a 25 °C, ha aumentato significativamente il contenuto di vitamina B₁₂ a 0,96 µg/100 g di tempeh fresco (ovvero di peso umido). L'inoculo di *P. freudenreichii* con *R. oryzae* (Pf), tuttavia, non ha mostrato un aumento significativo della vitamina B₁₂ rispetto al controllo, a entrambi i regimi di temperatura.

Processing scenario*	Temperature (°C)	Vitamin B ₁₂ (µg/100 g)	Initial bacterial count (log CFU/g)	Final bacterial count (log CFU/g)
Control***	25	0 ^b	–	–
Kp***	25	0.96 ± 0.06 ^a	2.6 ± 0.1	9.5 ± 0.4 ^a
Pf**	25	0.01 ± 0 ^b	3 ± 0.3	5 ± 0 ^b
Control***	30	0.02 ± 0.02 ^b	–	–
Kp**	30	0.67 ± 0.17 ^a	2.6 ± 0.1	9.6 ± 0.3 ^a
Pf**	30	0.06 ± 0.02 ^b	2.9 ± 0.2	5 ± 0 ^b

Tab. 7 Effetto della composizione della coltura starter e della temperatura di incubazione sul contenuto di vitamina B₁₂ e sulla carica batterica nel tempeh di lupino (Wolkers-Rooijackers *et al.* 2018).

I valori rappresentano le medie ± SD di duplicati (***) o triplicati (**), ovvero di due o tre repliche.

Le medie con apici diversi rappresentano differenze significative (P < 0,05) all'interno di ciascuna colonna.

*) Control, si riferisce a l'inoculazione del solo *Rhizopus oryzae*; Kp, si riferisce all'inoculazione mista con *Klebsiella pneumoniae*; Pf, si riferisce all'inoculazione mista con *Propionibacterium freudenreichii*.

Lo studio riporta che la rapida crescita del micelio fungino ha prodotto calore, che ha aumentato la temperatura effettiva del tempeh. La temperatura interna del tempeh era di circa 30 °C quando incubato a 25 °C, mentre raggiungeva i 39 °C quando incubato a 30 °C.

Quest'ultima temperatura interna di 39°C è ben al di sopra della temperatura di crescita ottimale di *P. freudenreichii* (circa 30°C). Pertanto, Wolkers-Rooijackers *et al.* hanno continuato gli esperimenti a una temperatura di incubazione di 25 °C.

Inoltre, per aumentare la produzione di vitamina B₁₂ da parte di *P. freudenreichii*, è stata testata una dimensione di inoculo più elevata (10³, 10⁵ e 10⁷ UFC/g di lupino).

Con l'aumento dell'inoculo iniziale di *P. freudenreichii* nello starter misto, è stato raggiunto un numero maggiore di cellule vitali nel prodotto finale ed è stato misurato un maggiore contenuto di

vitamina B₁₂ (Tab. 8). In particolare, l'inoculo di 10⁷ UFC/g di *P. freudenreichii* ha portato a un aumento sostanziale del contenuto di vitamina B₁₂, pari a 0,97 µg/100 g di tempeh fresco. Questo valore era paragonabile al tempeh prodotto con l'aggiunta di *K. pneumoniae* nel primo approccio. Wolkers-Rooijackers *et al.* (2018) riportano, citando l'articolo di Bullerman e Berry (1966), che la produzione di vitamina B₁₂ da parte di *P. freudenreichii* non è legata alla fase di crescita esponenziale del batterio. Quantità apprezzabili di vitamina B₁₂ vengono infatti prodotte in una fase successiva quando *P. freudenreichii* si avvicina all'80-100% circa della crescita cellulare massima. Questo potrebbe spiegare l'aumento della vitamina B₁₂ nel tempeh in seguito all'aggiunta di un numero più elevato (10⁷ UFC/g di lupino) di cellule di *P. freudenreichii* all'inizio della fermentazione. Con tali concentrazioni iniziali la crescita cellulare massima viene raggiunta più rapidamente e le cellule rimangono più a lungo nella fase stazionaria.

La temperatura di incubazione di 25 °C è risultata quindi ottimale per la produzione di tempeh di lupino. Questo perché a tale temperatura il trasferimento di calore nel tempeh è risultato sufficiente per mantenere circa 30 °C, *optimum* di crescita per *P. freudenreichii*.

Infine, nel tempeh di lupino fermentato con diverse dimensioni di inoculo iniziale di *P. freudenreichii*, sono stati misurati valori di pH simili (Tab. 8), che non presentavano differenze significative tra i diversi scenari di lavorazione.

Processing scenario*	Vitamin B ₁₂ (µg/100 g)	pH	Initial bacterial count (log CFU/g)	Final bacterial count (log CFU/g)
Control***	0 ^b	6.59 ± 0.35	–	–
Pf 10 ³ **	0.01 ± 0 ^b	7.26 ± 0.29	3.0 ± 0.3 ^c	5 ± 0 ^b
Pf 10 ⁵ **	0.05 ± 0.02 ^b	6.76 ± 0.08	5.1 ± 0.2 ^b	7.8 ± 1.7 ^{ab}
Pf 10 ⁷ ***	0.97 ± 0.07 ^a	6.78 ± 0.57	6.7 ± 0.2 ^a	8.4 ± 0.1 ^a

Tab. 8 Effetto della dose di inoculo di *Propionibacterium freudenreichii* in coltura mista con *Rhizopus oryzae* sul contenuto di vitamina B₁₂, sul pH finale e sulla carica batterica del tempeh di lupino prodotto a 25 °C (Wolkers-Rooijackers *et al.* 2018).

I valori rappresentano le medie ± SD di duplicati (**) o triplicati (***), ovvero di due o tre repliche.

Le medie con apici diversi rappresentano differenze significative (P < 0,05) all'interno di ciascuna colonna.

*) Control, si riferisce a l'inoculazione del solo *Rhizopus oryzae*; Pf, si riferisce all'inoculazione mista con *Propionibacterium freudenreichii* a diverse concentrazioni.

Infine lo studio fa un'analisi delle interazioni microbiche confrontando la conta totale vitale (TVC) e la conta dei batteri lattici (LAB). Per i diversi scenari di lavorazione, si notano valori simili, anche nel tempeh di controllo, inoculato solo con spore di *R. oryzae*. TVC e LAB sono rispettivamente

nell'intervallo log 9,1-9,5 UFC/g e log 8-8,9 UFC/g per tutti gli scenari. Non sono quindi state riscontrate differenze significative per i conteggi di TVC e LAB tra i diversi scenari di lavorazione.

Il fatto che anche nella soia inoculata solo con *R. oryzae* vi siano valori così elevati di TVC e LAB, significa che si è verificata una contaminazione microbica. In questo caso però il contenuto finale di vitamina B₁₂ è risultato nullo, o quasi, evidentemente per via del fatto che tra i contaminanti non vi erano forti produttori della vitamina.

Wolkers-Rooijackers *et al.* (2018) propongono l'interessante osservazione che questi diversi microrganismi, presenti nel tempeh, traggono vantaggio l'uno dall'altro per quanto riguarda l'utilizzo del substrato. La parte fungina libera oligosaccaridi solubili in acqua attraverso la degradazione enzimatica dei polisaccaridi. Può anche idrolizzare le proteine e i lipidi in substrati utili per i batteri. L'aggiunta di *P. freudenreichii* non ha infatti mostrato alcuna inibizione della crescita del micelio di *R. oryzae*.

Tale studio, citando il lavoro di Skory *et al.* (1998), riporta che *R. oryzae* è in grado di produrre acido lattico, anche in condizioni microaerofile. Poiché l'acido lattico è un substrato adatto alla crescita di *P. freudenreichii*, è normale che la crescita di *P. freudenreichii* co-inoculato con *R. oryzae*, e quindi la sua produzione di vitamina B₁₂, risulti potenziata.

Oltre alla composizione microbica, altri parametri, come la consistenza e i composti organici volatili (non riportati, ma studiati da Wolkers-Rooijackers *et al.*), non sono stati influenzati dall'uso del co-inoculo batterico.

Ciò avvalorava il risultato principale, ovvero l'aumento significativo del contenuto di vitamina B₁₂, fino a 0,97 µg/100 g (peso umido), ottenuto dalla fermentazione del lupino utilizzando lo starter misto composto da *Rhizopus oryzae* (Log 4 UFC/g) e da *Propionibacterium freudenreichii* (Log 7 UFC/g). Tale concentrazione vitaminica è significativa a livello nutrizionale, il consumo moderato di tale tempeh di lupino potrebbe contribuire fortemente a soddisfare il PRI.

3.3 Fermentati a base di legumi e cereali

Oltre al raro caso della produzione del tempeh, un prodotto tradizionale rivalutato a livello nutrizionale, la biofortificazione rappresenta un modo per ottenere alimenti con significative concentrazioni di vitamina B₁₂ in alternativa ai prodotti di origine animale.

Tale biotecnologia si basa sull'utilizzo *in situ* di colture microbiche selezionate in grado di fermentare materie prime o semilavorati vegetali e produrre in questi la vitamina B₁₂.

Come è emerso dall'ultimo lavoro scientifico presentato, *Propionibacterium freudenreichii* è un batterio alimentare in grado di sintetizzare *ex novo* grandi quantità di vitamina B₁₂ in forma attiva. Tale specie batterica presenta una diversa capacità di produrre vitamina B₁₂ a seconda del ceppo (Xie *et. al* 2021).

Nel presente sottocapitolo verranno esposti due studi in cui *P. freudenreichii* è il protagonista del processo di biofortificazione. In questi due recenti lavori (Xie *et. al* 2021; Wang *et. al* 2022) è stato utilizzato *Propionibacterium freudenreichii* ceppo DSM 20271 come nella ricerca di Wolkers-Rooijackers *et al.* (2018) riguardante il tempeh di lupino.

Xie *et. al* (2021) hanno studiato la biofortificazione di vari cereali, pseudocereali e legumi, al fine di valutare l'attitudine di tali materie prime vegetali per la produzione di alimenti ad alto contenuto di vitamina B₁₂.

Nel 2022 Wang e collaboratori, basandosi anche su quanto fatto da Xie *et. al* (2021), hanno condotto una ricerca sulla biofortificazione della vitamina B₁₂ in sfarinati per la produzione di pane e sull'impatto organolettico che tale biotecnologia aveva sul prodotto finito.

3.3.1 Fermentazione di cereali, pseudocereali e legumi con *P. freudenreichii* e *L. brevis* per la fortificazione della vitamina B₁₂

Il presente studio di Xie e coautori (2021) ha analizzato la produzione *in situ* di vitamina B₁₂ in undici matrici di cereali, pseudocereali e legumi. La sintesi vitaminica è avvenuta mediante un processo fermentativo ad opera di *Propionibacterium freudenreichii* DSM 20271 e di *Levilactobacillus brevis* (ex *Lactobacillus brevis*) ATCC 14869. *P. freudenreichii* è stato utilizzato come produttore di vitamina B₁₂ e *L. brevis* è stato selezionato per migliorare la consistenza e la sicurezza microbica del prodotto finito.

Durante la fermentazione è stata monitorata l'attività di acidificazione degli starters. Sono stati misurati i contenuti dei macronutrienti e del cobalto, un fattore limitante per la produzione di vitamina B₁₂ da parte di *P. freudenreichii*, e sono stati valutati i loro effetti sulla produzione di vitamina B₁₂ nelle diverse matrici.

Le colture di *P. freudenreichii* DSM 20271 e di *L. brevis* ATCC 14869 sono state propagate rispettivamente a 30°C per 3 giorni e a 37°C per 1 giorno. Le cellule batteriche sono state raccolte e sospese per ottenere un inoculo di circa 9,0 log UFC/g per *P. freudenreichii* e circa 6,0 log UFC/g per *L. brevis*. L'articolo riporta che i livelli di inoculo sono stati stabiliti in studi precedenti per ottenere un livello significativo di produzione di vitamina B₁₂.

Le matrici vegetali utilizzate dallo studio erano a base di cereali (crusca di avena, crusca di riso, crusca di segale, farina di miglio e farina di sorgo), pseudocereali (crusca di grano saraceno, farina di amaranto e farina di quinoa) e legumi (farina di soia, farina di fava e farina di lupino).

Le farine, o le crusche, sono state miscelate con acqua. Il rapporto tra acqua e farina è stato deciso in base a esperimenti preliminari per ottenere delle miscele semi-liquide. 30 g di ogni miscela sono stati trasferiti in provette Falcon (da 50 mL) e inoculati con *P. freudenreichii* (9,0 log UFC/g) e *L. brevis* (6,0 log UFC/g). Le provette sono state preparate in triplo per ognuno dei tre punti di campionamento e incubate a 25 °C per tre giorni.

Le analisi sono state svolte in tre punti temporali (corrispondenti ai punti di campionamento): al tempo zero, a un giorno e a tre giorni di fermentazione. Ad ogni punto temporale sono stati predisposti i campioni per ciascuna replica della miscela (ovvero tre campioni ad ogni punto temporale d'analisi). Dei campioni è stato analizzato il pH, gli acidi totali titolabili (TTA), nonché il contenuto di acido lattico, di acido acetico, di acido propionico e di vitamina B₁₂.

In seguito, gli autori hanno svolto ulteriori esperimenti utilizzando solamente quattro matrici vegetali: crusca di grano saraceno, crusca d'avena, crusca di riso e farina di sorgo. Le miscele sono state preparate e fermentate nello stesso modo degli esperimenti precedenti. Per ogni materiale, le miscele sono state preparate in quattro modi: fermentate spontaneamente (senza inoculo, come controllo); inoculate con 9,0 log UFC/g di *P. freudenreichii* e 6,0 log UFC/g di *L. brevis* (P9/L6); inoculate con 9,0 log UFC/g *P. freudenreichii* e 7,0 log UFC/g *L. brevis* (P9/L7); inoculate con 9,0 log UFC/g *P. freudenreichii* e 8,0 log UFC/g *L. brevis* (P9/L8).

Le diverse concentrazioni di *L. brevis* sono state testate per determinare il livello di inoculo ottimale al fine di ottenere una produzione significativa di vitamina e inibire la crescita delle *Enterobacteriaceae*. Analogamente alla prima prova, le provette sono state preparate in triplo per ogni punto temporale d'analisi (al tempo zero, a un giorno e a tre giorni). I campioni prelevati sono stati sottoposti alla misurazione del pH, di TTA, della conta delle cellule vitali e del contenuto di vitamina B₁₂.

I campioni, adeguatamente diluiti sono stati incubati in terreni selettivi per i batteri propionici (PAB), i batteri lattici (LAB) e le *Enterobacteriaceae* totali. Il numero di cellule vitali è stato determinato per conta in piastra.

I contenuti di acido lattico (LA), acido acetico (AA) e acido propionico (PA) sono stati determinati con un metodo di cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC).

La vitamina B₁₂ nelle miscele è stata determinata con un metodo di cromatografia liquida ad altissime prestazioni (UHPLC). La presenza di altri corrinoidi nei campioni, compresa la pseudovitamina B₁₂, è stata riconosciuta nei cromatogrammi sulla base della conoscenza dei loro spettri di assorbimento UV e dei tempi di ritenzione da studi precedenti.

Livelli di vitamina B₁₂ di 19-38 ng/g di peso secco (1,9-3,8 µg/100 g DW) sono stati rilevati nelle undici miscele subito dopo l'inoculo con *P. freudenreichii* (Tab. 9). Dopo un giorno di fermentazione è stato osservato un aumento significativo ($p < 0,05$) del contenuto di vitamina in tutte le miscele e il contenuto più elevato è stato riscontrato nella miscela di crusca di grano saraceno (circa 335 ng/g DW). Dal giorno 1 al giorno 3 non si è registrato un aumento significativo ($p < 0,05$) del contenuto di vitamina B₁₂ nelle matrici di crusca di segale, farina di miglio, farina di quinoa e farina di amaranto. Al giorno 3, il contenuto più elevato della vitamina è stato riscontrato nella miscela di crusca di riso (circa 742 ng/g DW), seguita dalle miscele di crusca di grano saraceno (circa 631 ng/g DW) e di farina di soia (circa 407 ng/g DW). Al terzo giorno, nelle miscele di crusca d'avena, farina di sorgo, farina di fave e farina di lupino, il contenuto di vitamina B₁₂ variava da 265 a 343 ng/g DW.

Batters	Day 0	Day 1	Day 3
Rye bran	38±5 ^{cx}	103±7 ^{cy}	104 ± 29 ^{by}
Oat bran	36±4 ^{cx}	128±3 ^{dy}	332 ± 24 ^{dz}
Rice bran	37±5 ^{cx}	133 ± 16 ^{dy}	742 ± 18 ^{gz}
Sorghum flour	20±3 ^{ax}	149±9 ^{dey}	265 ± 13 ^{cz}
Millet flour	19±3 ^{ax}	58±1 ^{ay}	51±6 ^{ay}
Buckwheat bran	29±4 ^{bx}	335 ± 76 ^{gy}	631 ± 61 ^{gz}
Quinoa flour	32±4 ^{bx}	60±1 ^{ay}	65±5 ^{ay}
Amaranth flour	31±4 ^{bx}	81 ± 13 ^{by}	78±4 ^{ay}
Faba bean flour	20±5 ^{cx}	155 ± 23 ^{ey}	298 ± 51 ^{cdz}
Soy bean flour	29±6 ^{bx}	154±2 ^{ey}	407±5 ^{ez}
Lupine flour	28±4 ^{bx}	246 ± 15 ^{fy}	343 ± 71 ^{dz}

Tab. 9 Contenuto di vitamina B₁₂ (ng/g, DW) durante la fermentazione delle undici matrici vegetali (Xie *et. al* 2021).

Oat bran, crusca di avena; rye bran, crusca di segale; rice bran, crusca di riso; sorghum flour, farina di sorgo; millet flour, farina di miglio; buckwheat bran, crusca di grano saraceno; quinoa flour, farina di quinoa; amaranth flour, farina di amaranto; faba bean flour, farina di fagioli fava; soybean flour, farina di soia; lupine flour, farina di lupino.

I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard (delle tre repliche).

I valori nella stessa colonna (a-g) e nella stessa riga (x-z) con apici diversi sono significativamente diversi ($p < 0,05$).

Inoltre, nel primo esperimento che prevedeva l'utilizzo delle undici matrici vegetali, è stata studiata la correlazione tra la composizione dei nutrienti, il contenuto di cobalto, l'acidità (pH, TTA e la produzione di acidi) e la produzione di vitamina B₁₂ al giorno 1 e al giorno 3. Sia al primo che al terzo giorno, il contenuto di vitamina era correlato positivamente ad un elevato valore di pH (>4,7) e con un alto contenuto di proteine, di grassi, di fibra alimentare, di acido propionico e di acido acetico. Infatti, la produzione di vitamina B₁₂ era correlata negativamente ad un elevato contenuto di TTA (>17 ml), di carboidrati e di acido lattico. Il contenuto di cobalto ha avuto solo un'influenza limitata sulla produzione di vitamina, sia al primo che al terzo giorno.

Come descritto in precedenza, la crusca di grano saraceno, la crusca di avena, la crusca di riso e la farina di sorgo sono state scelte per svolgere un ulteriore esperimento al fine di studiare l'effetto di diversi livelli di inoculo di *L. brevis* sulla fermentazione di ciascuna matrice vegetale.

Durante il giorno 1, la produzione di vitamina B₁₂ non differiva significativamente con i diversi inoculi di *L. brevis* nelle miscele di crusca d'avena e di crusca di riso (Tab. 10). Al giorno 3, invece, il contenuto di vitamina della miscela di crusca d'avena P9/L6 (circa 342 ng/g DW) era significativamente ($p < 0,05$) superiore a quello delle miscele di crusca d'avena P9/L7 e P9/L8 (298-312 ng/g DW). Alla stessa maniera, nella crusca di grano saraceno, l'inoculo P9/L6 ha prodotto una quantità significativamente maggiore di vitamina B₁₂ (circa 604 ng/g DW) rispetto agli inoculi P9/L7 e P9/L8. Nella crusca di riso, al terzo giorno, il contenuto di vitamina B₁₂ della miscela P9/L8 (circa 675 ng/g DW) era significativamente ($p < 0,05$) inferiore a quello delle miscele P9/L7 e P9/L6 (circa 720 ng/g DW). Nelle miscele di sorgo, il contenuto di vitamina è risultato significativamente ($p < 0,05$) più basso sia al giorno 1 che al giorno 3, quando è stato aumentato il livello di inoculo di *L. brevis*. In particolare, solo circa 67 ng/g DW di vitamina B₁₂ sono stati prodotti nella miscela P9/L8 di sorgo alla fine della fermentazione.

	Vitamin B12		
	Day 0	Day 1	Day 3
Oat bran			
Control	- ^a	-	-
P9/L6	38±5 ^{ax}	119 ± 7 ^{ay}	342 ± 14 ^{bz}
P9/L7	38±5 ^{ax}	104 ± 18 ^{ay}	312 ± 3 ^{az}
P9/L8	38±5 ^{ax}	128 ± 12 ^{ay}	298 ± 10 ^{az}
Rice bran			
Control	-	-	-
P9/L6	38±5 ^{ax}	112 ± 16 ^{ay}	722 ± 21 ^{bz}
P9/L7	38±5 ^{ax}	119 ± 24 ^{ay}	717 ± 10 ^{bz}
P9/L8	38±5 ^{ax}	122 ± 3 ^{ay}	675 ± 30 ^{az}
Buckwheat bran			
Control	-	-	-
P9/L6	29±4 ^{ax}	312 ± 76 ^{by}	604 ± 41 ^{bz}
P9/L7	29±4 ^{ax}	237 ± 38 ^{ay}	572 ± 58 ^{abz}
P9/L8	29±4 ^{ax}	256 ± 28 ^{ay}	508 ± 26 ^{az}
Sorghum flour			
Control	- ^a	-	-
P9/L6	19±3 ^{ax}	151 ± 16 ^{cy}	249 ± 11 ^{cz}
P9/L7	19±3 ^{ax}	88 ± 9 ^{by}	125 ± 27 ^{bz}
P9/L8	19±3 ^{ax}	68 ± 6 ^{ay}	67 ± 14 ^{ay}

Tab. 10 Contenuto di vitamina B₁₂ (ng/g, DW) durante la fermentazione con diversi livelli di colture starter (Xie *et. al* 2021). I risultati sono espressi come media ± deviazione standard (delle tre repliche).

Oat bran, crusca di avena; rice bran, crusca di riso; buckwheat bran, crusca di grano saraceno; sorghum flour, farina di sorgo.

Control, pastella a fermentazione spontanea; P9/L6, P9/L7 e P9/L8 indicano le miscele con 9,0 log UFC/g di *P. freudenreichii* e 6,0 log UFC/g, 7,0 log UFC/ e 8,0 log UFC/g di *L. brevis*, rispettivamente.

I valori nella stessa colonna e tipo di pastella con apici diversi (a-c) sono significativamente diversi (p < 0,05).

I valori nella stessa riga con apici diversi (x-z) sono significativamente diversi (p < 0,05).

-^a, Non rilevato.

Le matrici utilizzate da Xie e collaboratori avevano contenuti di nutrienti diversi (studiati in dettaglio). Ciò ha portato a diverse cinetiche di acidificazione e a una produzione molto diversa di vitamina B₁₂ da parte di *P. freudenreichii* (60-740 ng/g DW, Tab. 9) durante la fermentazione. In generale, le miscele di farine di cereali e pseudocereali presentavano un livello più elevato del contenuto di LA e del valore di TTA durante la fermentazione, probabilmente a causa del maggior livello di carboidrati disponibili rispetto ad altri materiali (crusca e farine di legumi), che supportano la crescita microbica. In linea con ciò, lo studio ha dimostrato una correlazione positiva tra il contenuto di carboidrati disponibili e la produzione di LA e il valore di TTA.

Sebbene l'articolo riporti che il LA prodotto dai LAB sia la fonte di carbonio preferenziale per i PAB, un rapido calo del pH causato dall'accumulo di LA può inibire la crescita e il metabolismo dei PAB.

Questi batteri, infatti, crescono preferibilmente a pH neutro e smettono di produrre acidi quando il valore del pH scende sotto 4,5. Inoltre, nel presente studio, è stata rilevata una correlazione

positiva della produzione di vitamina B₁₂ con la produzione di PA. Di conseguenza, le condizioni di fermentazione in miscele con alti contenuti di LA e, quindi, con bassi valori di pH (<4,5), come le farine di miglio, amaranto e quinoa, hanno generalmente prodotto basse rese di PA e di vitamina. Rispetto alle farine di cereali e pseudocereali, il contenuto di carboidrati disponibili nelle crusche e nelle farine di legumi era generalmente inferiore. Ciò portava a bassi livelli di LA e TTA, il che si traduceva in valori di pH più elevati nelle miscele di crusche e di legumi durante la fermentazione. Inoltre, l'elevato valore di pH può anche essere dovuto alla presenza nelle matrici di composti ad alta capacità di tampone dell'acidità, come le proteine e la fibra alimentare. Infatti, lo studio ha dimostrato che i contenuti di fibra alimentare, proteine e lipidi erano correlati positivamente con la produzione di vitamina B₁₂.

Nelle condizioni utilizzate dallo studio, il contenuto di cobalto non era un fattore limitante per la produzione di vitamina B₁₂. Infatti, le crusche di riso e di grano saraceno e le farine di miglio, di sorgo e di amaranto presentavano un livello simile di cobalto (157-183 ng/g p.c.), ma con un livello notevolmente diverso di produzione di vitamina (51-742 ng/g DW). Tra queste matrici le miscele con un pH più alto tendevano ad avere una maggiore produzione della vitamina. Pertanto, l'influenza del contenuto di cobalto sulla produzione di vitamina B₁₂ sembra essere meno significativa di quella del pH durante la fermentazione. Ciò è stato dimostrato con un livello minimo di cobalto di 17 ng/g DW, ovvero il valore più basso misurato in questo studio.

Come previsto, l'inoculo di *L. brevis* ha ridotto la concentrazione cellulare delle *Enterobacteriaceae* (di almeno 1 unità logaritmica) rispetto alle miscele di controllo. Quando la concentrazione di LAB è aumentata durante la fermentazione si sono osservati livelli di inibizione più marcati. Tuttavia, nel secondo esperimento, un aumento dell'inoculo di *L. brevis* ha portato a una drastica diminuzione della produzione di vitamina B₁₂ nella miscela di farina di sorgo. Ciò a causa della più rapida caduta del pH. Quando l'inoculo di *L. brevis* è stato aumentato a 8 log UFC/g, anche la produzione di PA in tale miscela è diminuita drasticamente.

Nella fermentazione della crusca di riso e della crusca di grano saraceno, sebbene il livello iniziale di *L. brevis* sia stato aumentato da 6 log UFC/g a 8 log UFC/g, i livelli di produzione di PA non sono stati significativamente influenzati. Ciò è probabilmente dovuto alla buona capacità tampone dei componenti di tali due matrici vegetali. Pertanto, nella crusca di riso e in quella di grano saraceno, il contenuto di vitamina B₁₂ dopo il terzo giorno era ancora elevato, rispettivamente 675 ng/g DW e 508 ng/g DW (Tab. 10).

In conclusione, dallo studio di Xie *et. al* (2021), si evince che maggiori concentrazioni di vitamina B₁₂ sono ottenibili fermentando crusca di cereali e farina di legumi con un inoculo batterico di 9 log UFC/g di *P. freudenreichii* e 6 log UFC/g di *L. brevis*. Questo perché tali matrici vegetali hanno in genere bassi contenuti di carboidrati, nutrienti che favoriscono la produzione di LA e la riduzione di pH, e maggiori contenuti di proteine, fibre alimentari e lipidi, nutrienti che hanno un effetto tampone del pH. La sintesi di vitamina B₁₂ da parte di *P. freudenreichii* è favorita da valori di pH verso la neutralità, raggiungibili solo con inoculi di *L. brevis* contenuti. L'inoculazione di *L. brevis* è comunque importante perché inibisce efficacemente la crescita delle *Enterobacteriaceae*.

Il consumo di un prodotto alimentare contenente 10 g di sostanza secca di crusca di riso o di grano saraceno fermentate, anche nelle peggiori condizioni di inoculo viste (P9/L8), potrebbe coprire il fabbisogno giornaliero della vitamina B₁₂ (ovvero il PRI di 2,4 µg per gli adulti).

Questo risulterebbe vero anche a fronte di un processo di cottura di tale ipotetico prodotto alimentare. Infatti, 10 g di sostanza secca di crusca di grano saraceno (508 ng/g DW di vitamina B₁₂) apporterebbero al prodotto alimentare circa 5 µg/100 g di vitamina B₁₂. Il consumo di 100 g di prodotto finito cotto sarebbe sufficiente a soddisfare il PRI stimando perdite con la cottura anche del 50%.

3.3.2 Produzione in situ di vitamina B₁₂ e destrano in farina di soia e crusca di riso: una tecnologia per migliorare il sapore e la consistenza del pane fortificato

Questo studio (Wang *et. al* 2022) mirava a sviluppare un processo di fermentazione che permettesse la produzione concomitante di destrano¹⁹ (molecola che migliora la consistenza) e di vitamina B₁₂ (per la fortificazione *in situ*) per applicazioni nella panificazione.

Nelle matrici vegetali non sterili, la fermentazione con una monocoltura di *Propionibacterium freudenreichii* non è in grado di inibire la crescita di batteri endogeni potenzialmente patogeni. Pertanto, è stata svolta la fermentazione mista con *P. freudenreichii* e LAB per migliorare la sicurezza microbiologica dei vegetali fermentati (Xie *et al.* 2021). La crusca di cereale e la farina di legume, con l'aggiunta di saccarosio, sono state scelte come matrici vegetali per essere fermentate con *P. freudenreichii* DSM 20271 e con *Weissella confusa* A16 al fine di aumentare la produzione di destrano, vitamina B₁₂ e metaboliti antimicotici (ad esempio, acido acetico e acido propionico).

¹⁹ Destrano: polimero ramificato del glucosio prodotto dai LAB a partire dal saccarosio grazie alla presenza dell'enzima destransaccarasi.

In particolare, è stata usata la crusca di riso, uno dei sottoprodotti più abbondanti del processo di lavorazione del riso, che è ricca di numerosi composti bioattivi (come lipidi, minerali, vitamine, fibre alimentari, fitonutrienti e antiossidanti). Allo stesso modo, è stata scelta la soia per la sua composizione nutrizionale vantaggiosa, come ad esempio il suo contenuto qualitativamente completo di aminoacidi essenziali. L'utilizzo della farina di soia come alternativa al frumento nella panificazione contribuisce quindi a migliorare il profilo aminoacidico e a incrementare il contenuto proteico.

Tuttavia, la sostituzione della farina di frumento con farina di soia o crusca di riso a livelli elevati (ad esempio, >15%) porta ad effetti negativi sulle proprietà di texture e sensoriali rispetto al pane di frumento normale. Inoltre, la farina di soia e la crusca di riso hanno un elevato contenuto di lipidi e sono suscettibili di reazioni ossidative, che portano allo sviluppo di aromi di frutta e verdura o di rancido. I destrani, sostituiti degli idrocolloidi commerciali, possono essere una valida soluzione per migliorare la consistenza e la qualità sensoriale dei pani con farina mista o con crusca. Gli stessi autori del presente studio hanno recentemente dimostrato che i destrani prodotti *in situ* dalle specie di *Weissella* possono funzionare come agenti mascheranti alcuni off-flavours.

Nello studio è stato inoltre coinoccolato *Levilactobacillus brevis* ATCC 14869, in maniera alternativa a *Weissella confusa* A16, con *P. freudenreichii* DSM 20271, come controllo negativo per la produzione di destrano.

I materiali utilizzati da Wang e collaboratori (2022) erano: farina di frumento commerciale (proteine 12%, grassi 2,1%, fibre 4%, umidità 13,6%), farina di soia (proteine 38%, grassi 20%, carboidrati 18%, fibre 13%, cobalto 68 ng/g), crusca di riso (proteine 13%, grassi 20%, fibre 20%, cobalto 166 ng/g), lievito fresco per la panificazione, saccarosio, sale e grassi.

A partire dalla crusca di riso o dalla farina di soia sono stati preparati tre tipi di pasta madre "acida" ottenuta mediante l'inoculo batterico (Fig. 11): pasta madre fermentata da una coltura mista di *P. freudenreichii* DSM 20271/*W. confusa* A16 (DS-PW), ad alto contenuto di destrano (prodotto *in situ*); pasta madre di controllo fermentata da una coltura mista di *P. freudenreichii* DSM 20271/*W. confusa* A16 (CS-PW), a basso contenuto di destrano (prodotto *in situ*); seconda pasta madre di controllo fermentata da una coltura mista di *P. freudenreichii* DSM 20271/*L. brevis* ATCC 14869 (CS-PL), senza destrano. Per *P. freudenreichii* e *L. brevis* le rispettive concentrazioni d'inoculo erano di circa 10^8 UFC/g e di circa 10^6 UFC/g.

La pasta madre ad alto contenuto finale di destrano (DS-PW) è stata prodotta sostituendo il 10% (peso della farina, FW) della crusca di riso o della farina di soia con saccarosio come substrato per la sintesi del destrano. Le paste madri di controllo (CS-PW e CS-PL) sono state prodotte senza integrazione di saccarosio.

La crusca di riso o la farina di soia sono state miscelate con acqua distillata in un rapporto di 1:4 e successivamente inoculate con i ceppi starter. Le fermentazioni sono state eseguite in triplo a 25 °C per 24 ore in condizioni di blanda aerobiosi. Il pH e l'acidità totale titolabile (TTA, ml 0,1 mol/L NaOH/10 g di lievito madre) delle paste madri sono stati determinati prima e dopo 24 h di fermentazione.

La conta cellulare dei LAB, dei batteri aerobi mesofili totali, delle *Enterobacteriaceae*, dei propionibatteri (PAB) e di *B. cereus* è stata determinata a 0 ore e dopo 24 ore di fermentazione. Il contenuto di destrano nei campioni fermentati è stato determinato con un metodo enzimatico. L'analisi dell'acido lattico, dell'acido acetico e dell'acido propionico è stata eseguita mediante HPLC.

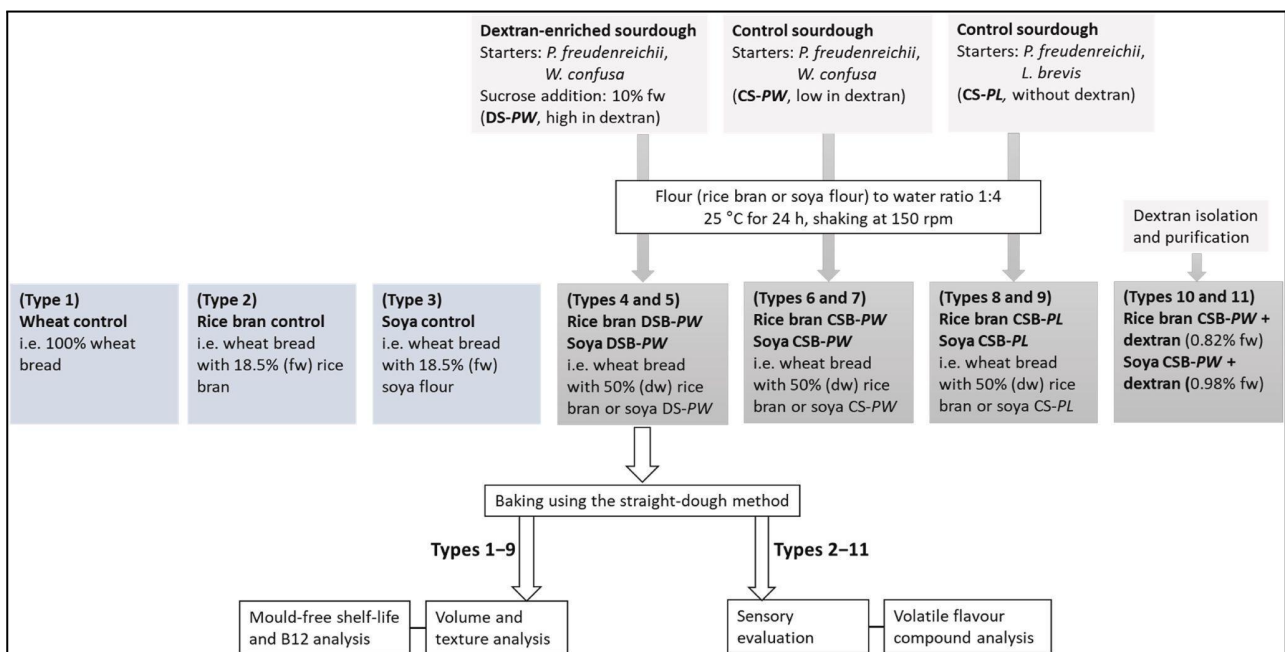


Fig. 11 Diagramma di flusso della preparazione dell'impasto madre e dei tipi di pane prodotti a pasta acida o con farine non fermentate in questo studio (Wang *et. al* 2022).

DS-PW, impasto acido fermentato con *P. freudenreichii* e *W. confusa* ad alto contenuto di destrano; CS-PW, impasto acido di controllo fermentato con *P. freudenreichii* e *W. confusa* a basso contenuto di destrano; CS-PL, i impasto acido di controllo fermentato con *P. freudenreichii* e *L. brevis* senza destrano; DSB-PW pane prodotto con DS-PW; CSB-PW pane prodotto con CS-PW; CSB-PL pane prodotto con CS-PL.

Con gli impasti descritti in precedenza, sono stati preparati nove tipi di pane (per abbreviazioni vedere legenda Fig. 11): Tipo 1, pane di controllo di frumento; Tipo 2, pane di controllo con riso (cioè pane di frumento con 18,5% di crusca di riso rispetto al peso della farina di frumento, FW); Tipo 3, pane di controllo con soia (cioè pane di frumento con 18,5% FW di farina di soia); Tipi 4 e 5, pane con farina di soia DSB-PW e con crusca di riso DSB-PW (cioè pane di frumento con 50% di peso secco, DW, di farina di soia e pane di frumento con 50% DW di crusca di riso ottenuto con pasta madre di *P. freudenreichii*/*W. confusa* ad alto contenuto di destrano); Tipi 6 e 7, pane di controllo con farina di soia CSB-PW e con crusca di riso CSB-PW (cioè pane di frumento con 50% DW di farina di soia e pane di frumento con 50% DW di crusca di riso ottenuto con pasta madre di *P. freudenreichii*/*W. confusa* a basso contenuto di destrano); Tipi 8 e 9, pane di controllo con farina di soia CSB-PL e di crusca di riso CSB-PL (cioè pane di frumento con 50% DW di farina di soia e pane di frumento con 50% DW di crusca di riso ottenuto con pasta madre di *P. freudenreichii*/*L. brevis*, senza destrano); Tipi 10 e 11, descritti in seguito.

Per preparare i campioni per l'analisi della vitamina B₁₂, i pani (due per ogni prova) sono stati tagliati in fette di 25 mm (spessore) dopo 1 ora di cottura. Sono state selezionate due fette di ogni pane e sono state rimosse le croste. Le fette di pane sono state tagliate in piccoli pezzi e liofilizzate. I campioni sono stati pesati e frullati fino a completa omogeneità. I campioni liofilizzati sono stati confezionati sottovuoto e conservati a -20 °C (al riparo dalla luce) prima dell'analisi.

La vitamina B₁₂ è stata determinata, nella pasta madre e nel pane, come CNCbl utilizzando la cromatografia liquida ad altissime prestazioni (UHPLC con colonna C-18).

All'analisi sensoriale descrittiva hanno partecipato tredici volontari (sei femmine e sette maschi di età compresa tra i 20 e i 50 anni), reclutati tra il personale e gli studenti del Dipartimento di Alimentazione e Nutrizione dell'Università di Helsinki, che sono stati formati per il panel test.

Nella valutazione sensoriale, oltre ai pani tipo 2-9, sono stati inclusi i pani tipo 10 e 11 (Fig. 11). I pani tipo 10-11, ovvero di controllo con farina di soia CSB-PW e con crusca di riso CSB-PW (cioè pane di frumento con 50% DW di farina di soia e pane di frumento con 50% DW di crusca di riso inoculati con *P. freudenreichii* e *W. confusa*) sono stati rispettivamente addizionati di destrano purificato al 0,98% di FW e al 0,82% FW. Il destrano alimentare è stato sintetizzato da *W. confusa* A16, isolato e utilizzato nella panificazione secondo le istruzioni tratte da esperimenti precedenti.

I pani sono stati cotti un giorno prima della valutazione da parte dei volontari e sono stati conservati sottovuoto a temperatura ambiente. Il giorno della valutazione, i campioni di pane sono stati tagliati in fette di 2,5 cm di spessore (senza crosta), serviti codificati con numeri casuali a 3 cifre. La valutazione sensoriale è riportata dettagliatamente nell'articolo (Wang *et. al* 2022).

Infine, i composti aromatici volatili dei pani, identificati approfonditamente mediante gas cromatografia associata a spettrometria di massa, sono stati associati ai dati descrittivi sensoriali del panel test prodotto dal gruppo addestrato di volontari.

Tra i diversi tipi di pasta madre, analizzati in questo studio, il contenuto più elevato di vitamina B₁₂ è stato riscontrato nei DS-PW e CS-PW di soia (8,9-9,1 µg/100 g di peso fresco), seguiti dai DS-PW e CS-PW di crusca di riso (7,7-7,9 µg/100 g) (Tab. 11). Livelli relativamente più bassi di vitamina (6,2-6,6 µg/100 g) sono stati prodotti nella soia e nella crusca di riso CS-PL.

Come previsto, la stessa tendenza in termini di contenuto di vitamina B₁₂ è stata osservata anche nei pani prodotti (Tab. 12). La soia DSB-PW e CSB-PW (4,8-4,9 µg/100 g di peso fresco) si sono classificate al primo posto per contenuto di vitamina, seguite dalla crusca di riso DSB-PW e CSB-PW (3,8 µg/100 g). La soia e la crusca di riso CSB-PL contenevano meno vitamina B₁₂ (3,0-3,6 µg/100 g).

	Vitamin B12 (µg/100 g fresh weight)
Rice bran CS-PL ^a	6.56 ± 0.20 ^{ab}
Rice bran CS-PW	7.66 ± 0.34 ^{abc}
Rice bran DS-PW	7.92 ± 0.38 ^{bc}
Soya CS-PL	6.20 ± 0.35 ^a
Soya CS-PW	9.13 ± 0.86 ^c
Soya DS-PW	8.91 ± 0.26 ^c

Tab. 11 Contenuto di vitamina B₁₂ nelle paste madri acide dopo 24 ore di fermentazione (Wang *et. al* 2022). Lettere apicali diverse nella stessa colonna indicano la significatività statistica (p < 0,05).

^a, abbreviazioni: DS-PW, impasto acido fermentato con *P. freudenreichii* e *W. confusa* ad alto contenuto di destrano; CS-PW, impasto acido di controllo fermentato con *P. freudenreichii* e *W. confusa* a basso contenuto di destrano; CS-PL, impasto acido di controllo fermentato con *P. freudenreichii* e *L. brevis* senza destrano; DSB-PW pane prodotto con DS-PW; CSB-PW pane prodotto con CS-PW; CSB-PL pane prodotto con CS-PL.

	Vitamin B12 ^a (µg/100 g fresh weight)
Wheat control	
Rice bran control	
Rice bran CSB- PL ^b	3.58 ± 0.17 ^b
Rice bran CSB- PW	3.81 ± 0.24 ^{bc}
Rice bran DSB- PW	3.81 ± 0.15 ^{bc}
Soya control	
Soya CSB-PL	2.98 ± 0.33 ^a
Soya CSB-PW	4.87 ± 0.58 ^c
Soya DSB-PW	4.81 ± 0.30 ^c

Tab. 12 Contenuto di vitamina B₁₂ dei pani (Wang *et. al* 2022).

Lettere apicali diverse nella stessa colonna indicano la significatività statistica (p < 0,05).

^a, la vitamina B₁₂ basata sul peso fresco del pane è stata calcolata come: B₁₂ su peso secco * (1 - perdita di umidità durante la liofilizzazione %).

^b, abbreviazioni: DS-PW, impasto acido fermentato con *P. freudenreichii* e *W. confusa* ad alto contenuto di destrano; CS-PW, impasto acido di controllo fermentato con *P. freudenreichii* e *W. confusa* a basso contenuto di destrano; CS-PL, impasto acido di controllo fermentato con *P. freudenreichii* e *L. brevis* senza destrano; DSB-PW pane prodotto con DS-PW; CSB-PW pane prodotto con CS-PW; CSB-PL pane prodotto con CS-PL.

Per quanto riguarda le analisi microbiologiche condotte dallo studio, l'inoculo di *W. confusa* A16 è stato in grado di inibire la crescita di potenziali patogeni endogeni delle matrici vegetali non trattate. L'effetto inibitorio ha raggiunto livelli accettabili (secondo l'EFSA) di *Enterobacteriaceae* (≤4 log UFC/g) e *B. cereus* (≤2 log UFC/g). Oltre alla riduzione del pH, i possibili meccanismi d'azione contro i microrganismi patogeni includono l'esclusione competitiva e la secrezione di composti antimicrobici, tra cui l'acido lattico, propionico e acetico.

La destransucasi di *W. confusa* catalizza la scissione del legame glicosidico del saccarosio e il trasferimento dell'unità glucosidica a una catena di destrano per la polimerizzazione, liberando fruttosio. Il saccarosio nelle paste madri di farina di soia o di crusca di riso contenenti *W. confusa* A16 (cioè DS-PW, con anche saccarosio aggiunto, e CS-PW) è stato completamente consumato e il fruttosio liberato è stato quasi inutilizzato durante le 24 ore di fermentazione.

In questo studio, il pH iniziale della farina di soia e della crusca di riso era di circa 6,8 (ottimale per la crescita dei LAB e la produzione di destransucasi) ed è sceso a 5,6-6,0 (ottimale per l'attività della destransucasi) dopo 24 ore di fermentazione. Ciò può spiegare l'elevata conversione del saccarosio in destrano nella farina di soia e nella crusca di riso.

Inoltre, l'assenza di maltosio nella farina di soia e nella crusca di riso può spiegare l'elevato tasso di conversione, poiché il maltosio (ad esempio nel grano) è fortemente trasformato dalla destransucrase e quindi compete con la produzione di destrano.

Il pH elevato della farina di soia e della crusca di riso forniva condizioni favorevoli alla crescita di *P. freudenreichii* (pH ottimale circa 7,0) e alla biosintesi di vitamina B₁₂ (pH ottimale 6,5-7,0).

Nelle matrici fermentate dalla coltura mista di *P. freudenreichii* con *W. confusa* (DS-PW e CS-PW) sono state prodotte quantità maggiori di acido propionico e acetico rispetto a quelle co-fermentate con *L. brevis* (CS-PL). *P. freudenreichii* può utilizzare lattato (fonte di carbonio preferita), glucosio e fruttosio, con conseguente produzione di propionato, acetato e CO₂. Il glucosio liberato dal saccarosio dall'attività della destransucrase di *W. confusa* ha probabilmente facilitato la produzione di acido propionico e acetico. Inoltre, la vitamina B₁₂ è un coenzima nel percorso di produzione dell'acido propionico in *P. freudenreichii*. Questo può spiegare la maggiore resa di vitamina nelle paste madri fermentate da *P. freudenreichii* e *W. confusa* rispetto a *L. brevis*.

La forma di vitamina B₁₂ prodotta durante la fermentazione è stata riconosciuta essere quella attiva. Ciò è stato determinato attraverso l'analisi UHPLC-MS/MS che ha permesso l'individuazione di 5,6-dimetilbenzimidazolo (DMBI) come ligando inferiore, presente proprio nella forma attiva. È importante ricordare che lo studio, al fine di osservare la capacità intrinseca di produzione della vitamina di *P. freudenreichii*, non ha previsto l'aggiunta alle materie prime precursori (come ad esempio cobalto e riboflavina) importanti per la biosintesi di vitamina B₁₂.

L'incorporazione del 50% (DW) della farina di soia fermentata e della crusca di riso nel processo di panificazione ha permesso di ottenere una quantità notevole di vitamina B₁₂, che ha mostrato un'elevata stabilità anche durante la cottura del pane. Il contenuto della vitamina attiva nei pani (cotti) prodotti con soia o riso fermentati da *P. freudenreichii* e *W. confusa* (DSB-PW e CSB-PW) era di 3,8-4,9 µg/100 g di peso fresco (Tab. 12); concentrazioni superiori a quelle naturalmente presenti nella maggior parte di carne, uova e prodotti lattiero-caseari. Il consumo di 100 g di questi pani soddisferebbe quindi ampiamente il fabbisogno giornaliero di vitamina B₁₂.

Oltre ai citati ottimi risultati in termini di biofortificazione, importanti dal punto di vista nutrizionale, il lavoro scientifico di Wang e collaboratori (2022) ha tratto conclusioni positive anche per quanto riguarda gli aspetti organolettici.

Come previsto, la sostituzione del frumento con il 18,5% FW di farina di soia o crusca di riso (pane tipo 2 e 3) ha portato alla riduzione qualitativa della texture del pane. Il pane tipo 8 e 9 prodotto con l'impasto madre di soia o di riso co-fermentato con *L. brevis* (CSB-PL, senza destrano) presentava un volume e una consistenza invariate rispetto al controllo di farina di soia o di crusca di riso (pane tipo 2 e 3). Al contrario, il destrano prodotto *in situ* negli impasti madre di farina di soia o di crusca di riso fermentati da *P. freudenreichii* e *W. confusa* (DSB-PW e CSB-PW) ha migliorato il volume del pane e la morbidezza della mollica. Un ulteriore miglioramento è stato ottenuto nel DSB-PW (0,6% di destrano, peso del pane) rispetto alla sua controparte di controllo CSB-PW (0,1-0,2% di destrano), indicando un effetto positivo dose-risposta del destrano sulla consistenza del pane.

I parametri di consistenza misurati strumentalmente erano altamente correlati con la percezione sensoriale dei volontari panelisti. La morbidezza, l'umidità e la coesione della mollica percepite sono risultate più elevate nel DSB-PW alla farina di soia o alla crusca di riso. L'effetto di miglioramento della sensazione in bocca è stato ulteriormente confermato dall'aggiunta di destrano purificato alla soia o alla crusca di riso CSB-PW (pane tipo 10 e 11).

I meccanismi della funzionalità del destrano sono probabilmente legati alla sua elevata capacità di legare l'acqua e alle interazioni intermolecolari (ad esempio, il legame a idrogeno tra il destrano e le proteine del glutine che rafforza la rete del glutine).

Inoltre, il DSB-PW a base di soia o crusca di riso aveva una durata di conservazione prolungata di 2-4 giorni rispetto ai pani di controllo. La durata di conservazione (assenza di muffa) è stata correlata positivamente con le concentrazioni di metaboliti antimicotici dell'impasto madre, in particolare l'acido propionico.

I pani di controllo alla soia e alla crusca di riso (tipo 2 e 3) erano rispettivamente caratterizzati da un elevato punteggio (panel test) di odore e sapore di mela/erba e riso cotto, non del tutto opportuni o gradevoli. In tali pani, la misurazione della componente volatile (tramite GC-MS) ha mostrato la presenza di prodotti di ossidazione lipidica. Questa, considerando l'elevato contenuto di grassi (20%) della farina di soia o della crusca di riso, ha rappresentato quindi la più probabile causa dell'odore di mela o di erba del pane di controllo.

L'utilizzo di impasti fermentati da una coltura mista di *P. freudenreichii* e LAB (CSB-PL, CSB-PW e DSB-PW) ha portato a una sensibile diminuzione dei composti volatili associati alla mela, all'erba o al riso cotto nel pane tipo 4-9 rispetto al pane di controllo con soia o riso.

La diminuzione di questi odori sgradevoli con la fermentazione a pasta acida è probabilmente dovuta all'attività enzimatica (come quella dell'aldeide deidrogenasi), che converte molecole aromatiche nei corrispondenti alcoli o acidi.

Come contro, i pani a pasta acida (CSB-PL, CSB-PW e DSB-PW) sono stati percepiti come più acidi e caseosi, con un retrogusto più forte. L'analisi della componente volatile ha rivelato una maggiore quantità di aromi acidi e/o associati al formaggio nei pani a pasta acida (ad esempio, acido acetico e acido propionico derivati dall'attività metabolica delle colture starter).

Il destrano prodotto *in situ* ha avuto un impatto significativo sulle proprietà aromatiche dei pani a base di pasta madre. Il DSB-PW (fermentato da *P. freudenreichii* e *W. confusa* con aggiunta di saccarosio) ha esibito il più forte sapore di formaggio tra tutti i pani testati, coerentemente con il suo più alto contenuto di acido propionico. Nonostante il livello di acidità più elevato, il DSB-PW alla soia o alla crusca di riso è stato giudicato meno intenso nell'odore e nel gusto di mela o di riso cotto rispetto al rispettivo controllo CSB-PW, fermentato senza l'aggiunta di saccarosio (precursore del destrano). Il DSB-PW conteneva una maggiore quantità di fruttosio residuo, che può servire come precursore per la reazione di Maillard e contribuire al gusto dolce del pane. Ad alti livelli, il gusto dolce copre generalmente altri gusti di base. Tuttavia, il panel test non ha discriminato l'intensità della dolcezza del DSB-PW da quella del CSB-PW, ma entrambi i pani sono stati descritti come "lievemente dolci". Il destrano sintetizzato è risultato infatti responsabile della ridotta percezione degli off-flavours (mela/ erba, riso cotto e formaggio) del DSB-PW. Ciò è stato evidenziato dall'aggiunta di destrano purificato nel CSB-PW di soia o di crusca di riso (CSB-PW + destrano), che ha mostrato un effetto soppressivo su tutti gli odori e i sapori valutati rispetto al CSB-PW semplice.

L'effetto di mascheramento del sapore del destrano dipende quindi dalla sua concentrazione nei pani. Essendo un polimero lineare a catena lunga, il destrano può intrappolare i composti aromatici attraverso interazioni molecolari come il legame a idrogeno, le interazioni di van der Waals, le interazioni steriche o una loro combinazione. Questo fenomeno di legame con gli aromi potrebbe spiegare i livelli più bassi di composti volatili rilevati dalla GC-MS.

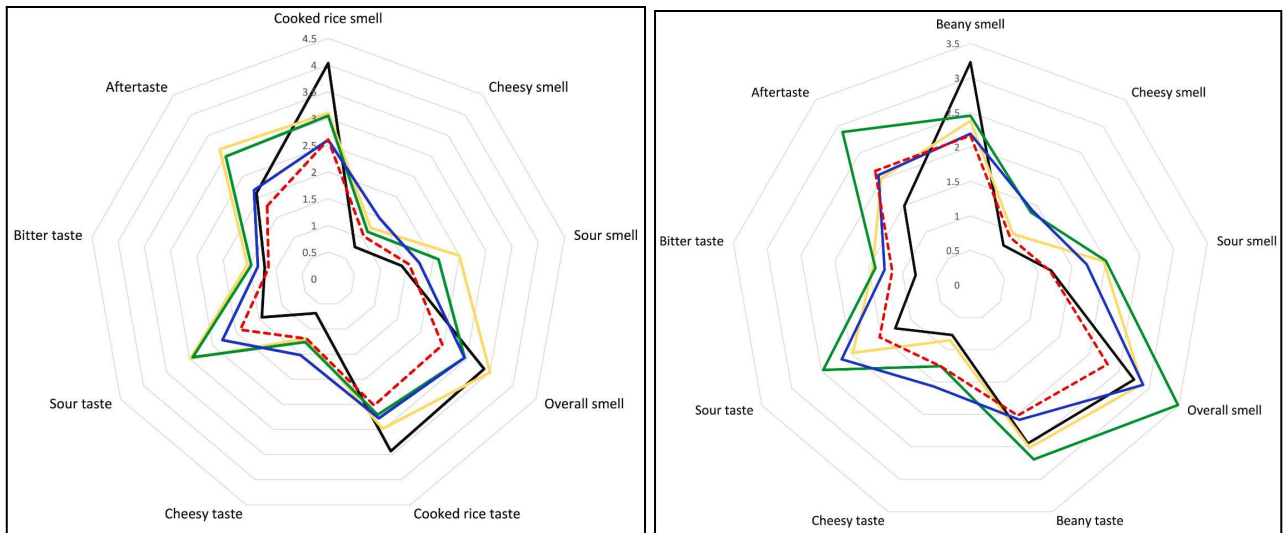


Fig. 12 Profili di gusto (dal panel test) dei pani di crusca di riso (a sinistra) e di soia (a destra) (Wang et. al 2022).

La linea nera continua rappresenta il pane di controllo alla crusca di riso o alla soia; la linea gialla continua rappresenta il pane alla crusca di riso o alla soia CSB-PL; la linea verde continua rappresenta il pane alla crusca di riso o alla soia CSB-PW; la linea blu continua rappresenta il pane alla crusca di riso o alla soia DSB-PW; la linea rossa tratteggiata rappresenta il pane alla crusca di riso o alla soia CSB-PW con l'aggiunta di destrano puro (vedere la Fig. 11 per le abbreviazioni dei campioni).

I grafici derivati dal panel test descrivono, partendo dall'alto e in senso orario (pane riso/ pane soia): odore di riso cotto (cooked rice smell)/ odore di fagiolo (beany smell); odore di formaggio (cheesy smell); odore acido (sour smell); odore complessivo (overall smell); gusto di riso cotto (cooked rice taste)/ gusto di fagiolo (beany taste); gusto di formaggio (cheesy taste); gusto acido (sour taste); gusto amaro (bitter taste); retrogusto (aftertaste).

Gli esperimenti e le analisi svolte da Wang *et. al* nel 2022 rivelano quindi che la fermentazione con coltura mista di *P. freudenreichii* e *W. confusa* è un esempio di prodotto "clean-label" più che promettente per la biofortificazione della vitamina B₁₂. In particolare la sintesi di vitamina B₁₂ è favorita, per i motivi esposti da Xie *et. al* (2021), in matrici leguminose o di crusca di cereali. Per aumentare l'accettabilità sensoriale e organolettica dei prodotti di panificazione ottenuti con crusche o farine di legumi è risultata efficace l'attività tecnologica del destrano. Nello studio tale molecola, prodotta da *W. confusa*, ha infatti migliorato la consistenza del pane a pasta acida e ridotto la percezione degli off-flavours caratteristici dell'uso di farina di soia e di crusca di riso. Inoltre la fermentazione mista ha portato alla formazione di acidi organici che hanno ridotto l'attività microbica alterante e prolungato la durata di conservazione del pane.

CAPITOLO IV

Conclusioni

La vitamina B₁₂ è un micronutriente essenziale per l'uomo, molecola che, quindi, deve essere assunta attraverso la dieta o in altra maniera. La sua carenza può portare a scompensi metabolici e a patologie con gravi risvolti anche permanenti. Ciò è dovuto al ruolo esclusivo che tale vitamina ha in importanti reazioni biochimiche nell'organismo umano. La ridotta assunzione prolungata di vitamina B₁₂ (tale da esaurire le riserve epatiche) può portare, ad esempio, ad alterazione del ciclo della metionina con decremento della produzione di mielina e conseguente demielinizzazione neuronale.

Detto ciò, la carenza di vitamina B₁₂ non è rara. Patologie come l'anemia perniciosa, che riducono l'efficienza di assorbimento della vitamina, sono frequenti negli anziani. In generale, questo gruppo di popolazione presenta normalmente un ridotto assorbimento dei nutrienti e ridotte assunzioni alimentari, quindi risulta essere particolarmente a rischio.

Individui che seguono una dieta a ridotto o a nullo contenuto di prodotti di origine animale, non necessariamente vegetariani o vegani, rappresentano un altro gruppo di popolazione che è particolarmente soggetto a tale carenza. Questo fatto è causato dall'unicità della vitamina B₁₂. Tale molecola è la sola vitamina ad essere prodotta esclusivamente da microrganismi, soprattutto batteri. Ceppi batterici produttori di vitamina B₁₂ abitano normalmente l'apparato gastro-intestinale animale, conferendo alle carni (anche del pesce) e al latte la vitamina. La maggior parte della popolazione mondiale soddisfa il proprio fabbisogno giornaliero di vitamina B₁₂ (attestato a 2,4 µg per gli adulti) basandosi su tale fonte alimentare naturale della vitamina. Nell'uomo, la vitamina sintetizzata dal microbiota intestinale non è significativa nutrizionalmente, questo perché è scarsamente assorbita.

Al di fuori degli alimenti di origine animale esistono rare fonti di vitamina B₁₂. Forme pseudovitaminiche sono diffuse in vari vegetali, ma solo alcune specie di funghi e alghe commestibili contengono la vitamina in forma biologicamente attiva per l'organismo umano.

Inoltre, gli alimenti possono subire importanti perdite di vitamina B₁₂ a seguito di un trattamento termico.

Da questo contesto emergono quindi varie problematiche inerenti all'assunzione adeguata della vitamina. Per gli individui vegetariani, più o meno stretti, e gli anziani è complesso reperire fonti alimentari certe, pratiche ed economiche di vitamina B₁₂. Per il resto della popolazione risulta talvolta comunque non banale avere, e mantenere nel tempo, assunzioni che soddisfino il fabbisogno giornaliero di tale vitamina del gruppo B. Anche in questo caso sarebbe quindi importante la presenza di una fonte di vitamina B₁₂ alternativa (per avere libertà di diversificare la dieta) e concentrata (relativamente alle dosi consumate; ad esempio i formaggi molto stagionati sono una fonte concentrata di vitamina, ma le normali porzioni consumate sono contenute).

Gli integratori alimentari di vitamina B₁₂ rappresentano una soluzione comoda e sicura per evitare di incorrere in stati carenziali. Sono sempre più frequentemente assunti in condizioni fisiologiche particolari, come, per le donne, nel periodo pre-concezionale e durante la gravidanza. Il fatto che, secondo le attuali evidenze scientifiche, non esista un UL (livello massimo tollerabile di assunzione) per la vitamina B₁₂ permette anche di eccedere con le assunzioni giornaliere della vitamina senza incorrere in rischi per la salute.

Attualmente l'industria alimentare non propone valide fonti di vitamina B₁₂ alternative agli integratori alimentari, se non quelle che prevedono la trasformazione di materie prime che contengono già naturalmente la vitamina. E' il caso di preparati a base di carne o prodotti della caseificazione, che possono talvolta concentrare il contenuto di vitamina della materia prima trasformata (come formaggi, yogurt e altri latticini fermentati).

Eppure, il fatto che la sintesi della vitamina B₁₂ sia puramente microbica potrebbe essere altamente sfruttato dalla tecnologia alimentare. La produzione del tempeh è uno dei rari casi in cui si può verificare la sintesi batterica di vitamina B₁₂ in alimenti di origine vegetale trasformati. In questo caso, la vitamina può essere prodotta da batteri contaminanti di processo. Tale peculiarità del tempeh, prodotto tradizionale indonesiano, ha portato ad una sua rivalutazione. Nella letteratura scientifica recente si trovano infatti vari studi a riguardo.

Alcuni lavori scientifici miravano a capire in dettaglio come, quando e in quali concentrazioni la vitamina B₁₂ venisse sintetizzata durante la fermentazione dei semi di soia per produrre il tempeh.

Mo e collaboratori nel 2013 hanno ottenuto un tempeh con concentrazioni di vitamina B₁₂ insoddisfacenti dal punto di vista nutrizionale (0,106 µg/100 g di peso secco), mentre Kustyawati *et al.* (2020) hanno misurato contenuti estremamente migliori nel loro tempeh prodotto sperimentalmente (fino 3,15 µg/ 100 g di peso umido).

Tali risultati quantitativamente molto diversi sono stati perlopiù attribuiti alle diverse condizioni di processo di produzione del tempeh seguite dai due studi. Ciò ha portato a diversi livelli di contaminazione batterica, vera causa della differente concentrazione di vitamina B₁₂ nel prodotto finito. Proprio a causa di tale elevata variabilità delle condizioni di processo del tempeh, ben rappresentata dal confronto dei due lavori analizzati, e all'evidente mancanza di realtà produttive che abbiano standardizzato il processo, questo tipico prodotto asiatico, ormai in commercio da anni, non è stato ancora riconosciuto come fonte attendibile di vitamina B₁₂.

Al fine di ottenere un tempeh con contenuto certo e riproducibile di vitamina B₁₂, Wolkers-Rooijackers e coautori (2018) hanno co-inoculato (assieme ai normali ceppi fungini fermentati) *Propionibacterium freudenreichii*, noto grande produttore di vitamina B₁₂. Con le più opportune condizioni di fermentazione (concentrazioni dell'inoculo, temperatura, pH) il tempeh "migliorato" prodotto dallo studio conteneva vitamina B₁₂ in concentrazioni molto rilevanti (0,97 µg/100 g di peso umido), attribuite al ceppo batterico inoculato.

Similmente a quanto studiato per il miglioramento del tempeh, una via innovativa per ottenere prodotti alimentari contenenti vitamina B₁₂ è la biofortificazione di materie prime vegetali naturalmente prive della vitamina. Tale biotecnologia innovativa si basa sull'inoculazione di ceppi batterici che, sostenendo direttamente o indirettamente un processo di fermentazione, sintetizzano la vitamina B₁₂ *in situ*.

Un recente lavoro scientifico (Xie *et. al* 2021) ha studiato l'inoculo di *P. freudenreichii* per la biofortificazione di undici matrici vegetali, al fine di determinare quali fossero le più promettenti per tale processo tecnologico. La crusca di cereali e la farina di legumi, per la loro composizione, hanno favorito la crescita e l'attività biosintetica di *P. freudenreichii*. Soprattutto in tali matrici, con un elevato inoculo iniziale del batterio, sono stati ottenuti semilavorati ad alto contenuto di vitamina B₁₂ (fino a 74 µg/100 g di peso secco).

Sulla base di questi promettenti risultati, nel 2022 Wang e coautori si sono posti l'ambizioso obiettivo di sviluppare un prodotto finito biofortificato di vitamina B₁₂ che fosse anche organoletticamente gradevole. In questo studio è stato prodotto del pane a pasta acida, con crusca di riso o con farina di soia, a partire da impasti co-inoculati con due specie batteriche. *P. freudenreichii* ha permesso un alto contenuto di vitamina B₁₂ nel pane cotto (4,8 µg/100 g di peso umido), mentre *Weissella confusa* ha prodotto del destrano. Tale molecola ha ridotto la percezione

degli off-flavours causati dalla fermentazione acida batterica, facendo risultare sensorialmente gradevole il pane biofortificato di vitamina B₁₂.

Il risultato complessivo che emerge dallo studio di Wang *et. al* (2022), nell'ambito della panificazione, è generalizzabile e rappresentato dalla reale possibilità di produrre alimenti di origine vegetale biofortificati di vitamina B₁₂ che presentino, anche, caratteristiche organolettiche paragonabili ai normali prodotti in commercio (non biofortificati).

I lavori scientifici di biofortificazione presentati sono solo due esempi tra quelli più promettenti della recente letteratura scientifica. Tra questi l'articolo di Gu *et. al* (2015) tratta la biofortificazione dello yogurt di soia con *Lactobacillus reuteri*; Chamlagain *et. al* (2020) hanno anch'essi studiato tale processo su matrici di cereali con l'inoculo di *Propionibacterium freudenreichii*; il lavoro di Muzi *et. al* (2022) prevedeva il coinoculo di *Propionibacterium freudenreichii* e *Bacillus amyloliquefaciens* per ottenere latte di semi di girasole contenente vitamina B₁₂.

La standardizzazione del processo di biofortificazione per specifiche matrici vegetali potrebbe quindi dare vita a nuove realtà produttive industriali e, di conseguenza, ad alimenti di carattere innovativo sul mercato. Tale biotecnologia potrebbe addirittura risultare economicamente vantaggiosa rispetto alla produzione degli integratori di vitamina B₁₂. Oltre a ciò, il consumatore potrebbe preferire, agli integratori, i prodotti alimentari biofortificati per mantenere un buono stato di salute con un'alimentazione varia ed equilibrata senza la necessità di integrare la vitamina.

I prodotti biofortificati potrebbero, inoltre, essere riconosciuti da enti autorevoli come valide fonti di vitamina B₁₂ biologicamente attiva per l'organismo umano. Infine, non risulterebbe così remota la possibilità di stipulare dei claims salutistici *ad doc* (approvati dall'EFSA), che rendano nota la correlazione tra il consumo di tali ipotetici prodotti biofortificati di vitamina B₁₂ e la prevenzione delle patologie causate dalla sua carenza.

Bibliografia

- Agnoli, C.; Baroni, L.; Bertini, I.; Ciappellano, S.; Fabbri, A.; Papa, M.; Pellegrini, N.; Sbarbati, R.; Scarino, ML.; Siani, V.; Sieri, S. Position paper on vegetarian diets from the working group of the Italian Society of Human Nutrition. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 2017, 27(12), 1037-1052.
- Agostoni, C.; Canani, RB.; Fairweather-Tait, S.; Heinonen, M.; Korhonen, H.; La Vieille, S.; Marchelli, R.; Martin, A.; Naska, A.; Neuhauser-Berthold, M.; Nowicka, G.; Sanz, Y.; Siani, A.; Sjodin, A.; Stern, M.; Strain, S.; Tetens, I.; Tome, D.; Turck, D.; Verhagen, H. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for cobalamin (vitamin B12). *EFSA JOURNAL*. 2015, 13(7).
- Bito, T.; Bito, M.; Asai, Y.; Takenaka, S.; Yabuta, Y.; Tago, K.; Ohnishi, M.; Mizoguchi, T.; Watanabe, F. Characterization and Quantitation of Vitamin B 12 Compounds in Various *Chlorella* Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016, 64(45), 8516-8524.
- Bito, T.; Bito, M.; Hirooka, T.; Okamoto, N.; Harada, N.; Yamaji, R.; Nakano, Y.; Inui, H.; Watanabe, F. Biological Activity of Pseudovitamin B(12) on Cobalamin-Dependent Methylmalonyl-CoA Mutase and Methionine Synthase in Mammalian Cultured COS-7 Cells. *Molecules*. 2020, 25(14).
- Butola, LK.; Kute, PK.; Anjankar, A.; Dhok, A.; Gusain, N.; Vagga, A. Vitamin B12 - Do You Know Everything?. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences JEMDS*. 2020, 9(42), 3139-3146.
- Chamlagain, B.; Sugito, TA.; Deptula, P.; Edelmann, M.; Kariluoto, S.; Varmanen, P.; Piironen, V. In situ production of active vitamin B12 in cereal matrices using *Propionibacterium freudenreichii*. *Food Science & Nutrition*. 2020, 6(1), 67-76.
- Deptula, P.; Kylli, P.; Chamlagain, B.; Holm, L.; Kostianen, R.; Piironen, V.; Savijoki, K.; Varmanen, P. BluB/CobT2 fusion enzyme activity reveals mechanisms responsible for production of active form of vitamin B-12 by *Propionibacterium freudenreichii*. *Microbial Cell Factories*. 2015, 14.
- Edelmann, M.; Aalto, S.; Chamlagain, B.; Kariluoto, S.; Piironen, V. Riboflavin, niacin, folate and vitamin B12 in commercial microalgae powders. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2019, 82, 103226.
- Gille, D.; Schmid, A. Vitamin B-12 in meat and dairy products. *Nutrition Reviews*. 2015, 73(2), 106-115.

- Green, R.; Allen, LH.; Bjorke-Monsen, AL.; Brito, A.; Gueant, JL.; Miller, JW.; Molloy, AM.; Nexo, E.; Stabler, S.; Toh, BH.; Ueland, PM.; Yajnik, C. Vitamin B₁₂ deficiency. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017, 3.
- Gu, Q.; Zhang, C.; Song, DF.; Li, P.; Zhu, X. Enhancing vitamin B-12 content in soy-yogurt by *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Microbiology*. 2015, 206, 56-59.
- Kustyawati, ME.; Subeki.; Murhadi.; Rizal, S.; Astuti, P. Vitamin B-12 production in soybean fermentation for tempeh. *AIMS Agriculture and Food*. 2020, 5(2), 262-271.
- Martens, JH.; Barg, H.; Warren, MJ.; Jahn, D. Microbial production of vitamin B₁₂. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, 58(3), 275-285.
- Mo, HZ.; Kariluoto, S.; Piironen, V.; Zhu, Y.; Sanders, MG.; Vincken, JP.; Wolkers-Rooijackers, J.; Nout, MJR. Effect of soybean processing on content and bioaccessibility of folate, vitamin B12 and isoflavones in tofu and tempe. *Food Chemistry*. 2013, 141(3), 2418-2425.
- Raux, E.; Schubert, HL.; Warren, MJ. Biosynthesis of cobalamin (vitamin B₁₂): a bacterial conundrum. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2000, 57(13-14), 1880-1893.
- Romulo, A.; Surya, R. Tempe: A traditional fermented food of Indonesia and its health benefits. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 2021, 26.
- Scott, JM. Folate and vitamin B-12. *Proceedings of the Nutrition Society*. 1999, 58(2), 441-448.
- Sela, I.; Meir, AY.; Brandis, A.; Krajmalnik-Brown, R.; Zeibich, L.; Chang, DB.; Dirks, B.; Tsaban, G.; Kaplan, A.; Rinott, E.; Zelicha, H.; Arinos, S.; Ceglarek, U.; Isermann, B.; Lapidot, M.; Green, R.; Shai, I. *Wolffia globosa*-Mankai Plant-Based Protein Contains Bioactive Vitamin B-12 and Is Well Absorbed in Humans. *Nutrients*. 2020, 12(10), 3067.
- Tangyu, M.; Fritz, M.; Ye, L.; Borner, RA.; Morin-Rivron, D.; Campos-Gimenez, E.; Bolten, CJ.; Bogicevic, B.; Wittmann, C. Co-cultures of *Propionibacterium freudenreichii* and *Bacillus amyloliquefaciens* cooperatively upgrade sunflower seed milk to high levels of vitamin B-12 and multiple co-benefits. *Microbial Cell Factories*. 2022, 21(1).
- Wang, YQ.; Xie, C.; Pulkkinen, M.; Edelman, M.; Chamlagain, B.; Coda, R.; Sandell, M.; Piironen, V.; Maina, NH.; Katina, K. In situ production of vitamin B12 and dextran in soya flour and rice bran: A tool to improve flavour and texture of B12-fortified bread. *LWT - Food Science and Technology*. 2022, 161, 113407.
- Watanabe, F. Vitamin B-12 sources and Bioavailability. *Experimental Biology and Medicine*. 2007, 232(10), 1266-1274.

- Watanabe, F.; Bito, T. Vitamin B-12 sources and microbial interaction. *Experimental Biology and Medicine*. 2018, 243(2), 148-158.
- Watanabe, F.; Yabuta, Y.; Bito, T.; Teng, F. Vitamin B-12-Containing Plant Food Sources for Vegetarians. *Nutrients*. 2014, 6(5), 1861-1873.
- Watanabe, F.; Yabuta, Y.; Tanioka, Y.; Bito, T. Biologically Active Vitamin B-12 Compounds in Foods for Preventing Deficiency among Vegetarians and Elderly Subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, 61(28), 6769-6775.
- Wolkers-Rooijackers, JCM.; Endika, MF.; Smid, EJ. Enhancing vitamin B-12 in lupin tempeh by in situ fortification. *LWT - Food Science and Technology*. 2018, 96, 513-518.
- Xie, C.; Coda, R.; Chamlagain, B.; Edelmann, M.; Varmanen, P.; Piironen, V.; Katina, K. Fermentation of cereal, pseudo-cereal and legume materials with *Propionibacterium freudenreichii* and *Levilactobacillus brevis* for vitamin B12 fortification. *LWT - Food Science and Technology*. 2021, 137, 110431.

Sitografia

- Http1. Tabelle LARN (2014): <https://sinu.it/tabelle-larn-2014/>
- Http2. Tabelle di Composizione degli Alimenti del CREA Centro Alimenti e Nutrizione (2019): <https://www.alimentinutrizione.it/sezioni/tabelle-nutrizionali>
- Http3. Banca Dati di Composizione degli Alimenti per Studi Epidemiologici in Italia (BDA): <https://www.bda-ieo.it/wordpress/>