



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e  
Ambiente

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

Il potenziale nutraceutico della rucola  
(*Eruca vesicaria*) sottoposta a fermentazione batterica

Relatore

Prof. Alessio Giacomini

Correlatore

Dott.ssa Sofia Massaro

Laureando

Manuel Chinello

Matricola n. 2092284

ANNO ACCADEMICO 2023 – 2024



## Indice

<b>RIASSUNTO</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>6</b>
<b>1 Introduzione</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 Alimenti probiotici</b> .....	<b>9</b>
1.1.1 Microrganismi probiotici .....	11
1.1.2 Meccanismo d'azione dei probiotici.....	16
1.1.3 Attività benefiche dei microrganismi probiotici .....	16
<b>1.2 Postbiotici</b> .....	<b>19</b>
1.2.1 Effetti e bioattività dei postbiotici.....	21
<b>1.3 Estratti vegetali fermentati</b> .....	<b>23</b>
1.3.1 Tecnologie produttive .....	24
1.3.2 Sostanze bioattive .....	26
1.3.3 Potenziale benefico sulla salute .....	27
<b>1.4 Rucola</b> .....	<b>28</b>
1.4.1 Tassonomia .....	28
1.4.2 Coltivazione .....	29
1.4.3 Sostanze di rilevanza nutrizionale all'interno delle foglie di rucola.....	30
1.4.4 L'impatto dei composti della rucola sulla salute umana .....	34
<b>1.5 Batteri lattici</b> .....	<b>36</b>
1.5.1 <i>Reservoir</i> naturale dei batteri lattici.....	37
1.5.2 Utilizzo dei batteri lattici negli alimenti fermentati.....	37
1.5.3 Batteri lattici utilizzati per la fermentazione dell'estratto di rucola .....	38
<b>1.6 Scopo della tesi</b> .....	<b>42</b>
<b>2 Materiali e metodi</b> .....	<b>43</b>
<b>2.1 Materia prima</b> .....	<b>43</b>
<b>2.2 Ottimizzazione del trattamento termico</b> .....	<b>43</b>
<b>2.3 Preparazione dell'estratto di rucola</b> .....	<b>43</b>
<b>2.4 Ceppi batterici</b> .....	<b>45</b>
<b>2.5 Prove di fermentazione</b> .....	<b>45</b>
<b>2.6 Conte microbiche</b> .....	<b>45</b>

2.7	Misura del pH .....	46
2.8	Determinazione del potere antiossidante .....	46
2.9	Quantificazione dei composti fenolici totali.....	46
2.10	Analisi statistica.....	47
3	<i>Risultati e discussione</i> .....	48
3.1	Ottimizzazione del trattamento termico .....	48
3.2	Conte microbiche.....	49
3.3	pH.....	53
3.4	Potere antiossidante .....	54
3.5	Composti fenolici totali .....	57
4	<i>Conclusioni</i> .....	60
5	<i>Bibliografia</i> .....	63

## RIASSUNTO

La fermentazione è una delle tecniche più utilizzate per incrementare la *shelf-life* degli alimenti e per migliorarne le caratteristiche sensoriali. Tuttavia, hanno recentemente assunto particolare importanza anche le caratteristiche benefiche che il processo di fermentazione è in grado di conferire alle materie prime di origine vegetale, soprattutto quando i ceppi fermentanti sono considerati probiotici. Inoltre, la capacità dei ceppi batterici di produrre sostanze nutrizionalmente interessanti a partire dai composti presenti all'interno della matrice fermentata è oggetto di particolare interesse. La tesi si propone di esaminare in dettaglio l'ottimizzazione del processo di fermentazione della rucola (*Eruca vesicaria*) utilizzando tre ceppi selezionati di batteri lattici, nello specifico *Lactiplantibacillus plantarum* 299V, *Pediococcus acidilactici* IRZ12B e *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG. L'obiettivo principale della ricerca è stato quello di mettere a punto un innovativo processo di fermentazione su un substrato vegetale da parte di batteri lattici solitamente utilizzati su matrici differenti, per valutare poi l'effetto della fermentazione stessa sul potenziale antiossidante e nutraceutico degli estratti fermentati. Inizialmente, sono state condotte conte microbiche totali sulla materia prima e, sulla base di tali risultati, è stato ottimizzato un processo termico al fine di ridurre tale carica microbica a valori accettabili, cercando di mantenere intatti i principali fitocomposti presenti nella rucola. Inoltre, è stato perfezionato un processo di ottenimento dell'estratto liquido di rucola a partire dalla materia prima fresca, determinando la quantità ottimale di acqua da aggiungere per ottenere la consistenza adeguata. Durante la fase dello studio in cui sono state effettuate le fermentazioni è stato misurato il pH dell'estratto di rucola prima e dopo il processo fermentativo stesso, allo scopo di constatare l'eventuale acidificazione provocata dalla fermentazione dei batteri lattici. Sono state effettuate delle conte batteriche sia al momento dell'inoculo che dopo ventiquattro ore di fermentazione, al fine di verificare l'effettiva crescita del ceppo inoculato. Gli estratti fermentati e non fermentati sono stati sottoposti ai saggi DPPH e Folin-Ciocalteu per determinarne rispettivamente il potere antiossidante e il contenuto di polifenoli totali. Sono state riscontrate differenze significative tra gli estratti fermentati con il ceppo *P. acidilactici* IRZ12B rispetto ai non fermentati in termini di contenuto di polifenoli totali; invece, a livello di potere antiossidante non sono state evidenziate differenze statisticamente significative. Questo studio fornisce ottime evidenze sulla possibilità impiegare come substrato della fermentazione anche dei prodotti vegetali solitamente non utilizzati a tal scopo, al fine di sviluppare nuovi integratori alimentari e comprendere meglio il ruolo della fermentazione nell'arricchimento nutrizionale degli alimenti.

## ABSTRACT

Fermentation is one of the most used techniques to increase the shelf life of food and improve its sensory characteristics. Recently, the beneficial characteristics that the fermentation process can impart to raw plant materials have gained particular importance, especially when the fermenting strains are considered probiotics. Moreover, the ability of bacterial strains to produce nutritionally interesting substances from the compounds present within the fermented matrix is of particular interest.

This thesis aims to examine in detail the optimization of the fermentation process of rocket (*Eruca vesicaria*) using three selected strains of lactic acid bacteria, specifically *Lactiplantibacillus plantarum* 299V, *Pediococcus acidilactici* IRZ12B, and *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG. The main objective of the research was to develop an innovative fermentation process on a vegetable substrate by lactic acid bacteria usually used on different matrices, to evaluate the effect of the fermentation on the antioxidant and nutraceutical potential of the fermented extracts.

Initially, total microbial counts were conducted on the raw material, and based on these results, a thermal process was optimized to reduce the microbial load to acceptable values while maintaining the main phytochemicals present in the rocket. Additionally, a process for obtaining the liquid extract from fresh rocket was refined, determining the optimal amount of water to add to achieve the desired consistency. During the study phase in which the fermentations were carried out, the pH of the rocket extract was measured before and after the fermentation process to ascertain the possible acidification caused by the lactic acid bacteria fermentation. Bacterial counts were performed at the time of inoculation and after twenty-four hours of fermentation to verify the effective growth of the inoculated strain.

The fermented and non-fermented extracts were subjected to DPPH and Folin-Ciocalteu assays to determine their antioxidant power and total polyphenol content, respectively. Significant differences were found between the extracts fermented with the *P. acidilactici* IRZ12B strain and the non-fermented extracts in terms of total polyphenol content; however, no statistically significant differences were observed in terms of antioxidant power.

This study provides substantial evidence on the possibility of using plant products, not usually employed as fermentation substrates, to develop new dietary supplements and better understand the role of fermentation in the nutritional enrichment of foods.



# 1 INTRODUZIONE

Gli estratti vegetali fermentati – conosciuti anche come *Fermented Plant Extract* (FPE) – sono considerati a tutti gli effetti degli alimenti funzionali, particolarmente diffusi nei paesi orientali. Vari substrati vegetali, tra cui cereali, legumi, frutta fresca, funghi e foglie di varia origine possono essere utilizzati per la produzione di FPE. Questi prodotti possono essere ottenuti grazie alla fermentazione di vari microrganismi, come lieviti, batteri lattici (LAB) e batteri acetici (AAB) (Blandino *et al.*, 2003). Alcuni estratti vegetali fermentati sono ottenuti attraverso una fermentazione di tipo spontaneo, anche se nella maggior parte dei casi i microrganismi vengono inoculati artificialmente. Gli estratti vegetali fermentati sono solitamente associati ad un elevato contenuto di nutrienti e di sostanze bioattive, oltre che a numerosi benefici sulla salute dell'organismo umano, come l'effetto antinfiammatorio, detossificante e antibatterico (Altay *et al.*, 2013; Erten *et al.*, 2008).

Come detto precedentemente, gli estratti vegetali fermentati possono essere considerati a tutti gli effetti come dei veri e propri alimenti funzionali, ovvero come alimenti con una dimostrata relazione tra la loro assunzione e uno specifico effetto benefico sulla salute dell'organismo umano (Feng *et al.*, 2017). Il termine “alimento funzionale” fu introdotto in Giappone negli anni '80 e si riferiva per lo più a prodotti trasformati contenenti ingredienti in grado di contribuire a specifiche attività fisiologiche, oltre ad apportare un certo numero di nutrienti. Tuttavia, a livello mondiale, nel corso degli anni si è assistito ad una crescente ricerca che ha portato alla riformulazione della definizione di “alimento funzionale”, tanto che se ne possono individuare varie a seconda dell'autorità che le ha proposte. Nonostante quest'elevato numero di definizioni, l'opinione generale è che un alimento funzionale sia in realtà un qualsiasi tipo di alimento apparentemente simile ad un alimento convenzionale e consumato come parte di una dieta usuale, che però presenta comprovati effetti benefici fisiologici oppure effetti preventivi nei confronti delle patologie (Kaur & Das, 2011). Alla parola “alimento funzionale” sono tuttavia associati altri termini, come:

- Composti bioattivi: composto chimico naturalmente presente oppure aggiunto ad un alimento, allo scopo di svolgere l'effetto benefico sulla salute desiderato (Hardy, 2000);
- Ingredienti funzionali: tutte quelle preparazioni, frazioni o estratti standardizzati e caratterizzati, contenenti i composti bioattivi a vario livello di purezza e utilizzati come ingredienti per la preparazione degli alimenti funzionali (Hardy, 2000);

- Nutraceutico: qualsiasi sostanza, come un alimento intero o parte di esso, in grado di apportare benefici medici o salutistici, tra cui la prevenzione e il trattamento di alcune patologie (Shahidi, 2009).

In accordo con quanto affermato da Holm, Sirò *et al.*, Klimas *et al.* e Saiz, è possibile classificare gli alimenti funzionali in varie classi:

- Prodotti alimentari fortificati con vari ingredienti in grado di apportare un effetto benefico sulla salute. In questo caso, vengono aggiunte sostanze che non erano presenti all'interno dell'alimento originale (ad es.  $\omega$ -3 nel pane, vitamina D nel succo d'arancia);
- Alimenti privati di fattori antinutrizionali originatisi durante la lavorazione, come composti tossici o allergeni alimentari;
- Materie prime migliorate attraverso l'aumento della concentrazione di specifiche sostanze, grazie all'implementazione dell'alimentazione degli animali (ad es. uova o carne con elevati contenuti di acidi grassi  $\omega$ -3, ottenuti grazie all'aggiunta di tali componenti a livello della dieta) oppure grazie all'utilizzo di determinati trattamenti post-raccolta nel caso di prodotti vegetali (ad es. uva con un maggior potere antiossidante a seguito dell'irraggiamento con raggi ultravioletti);
- *Novel food* caratterizzati da nuovi effetti benefici ottenuti mediante la manipolazione genetica oppure la selezione di nuove varietà non precedentemente consumate (ad es. riso con elevato contenuto di ferro o di vitamine del gruppo B, oli vegetali caratterizzati da una migliore composizione in acidi grassi saturi, frumento con un elevato contenuto di luteina oppure frutti di bosco con un maggior contenuto di antiossidanti).

Dunque, prodotti naturali contenenti componenti che presentano effetti benefici sulla salute non possono essere considerati alimenti funzionali quando vengono consumati come tali; tuttavia, nel momento in cui tali componenti vengono aggiunti in un nuovo alimento al fine di aumentare il suo effetto benefico sulla salute, quest'ultimo può essere considerato come alimento funzionale (Kaut & Das, 2011).

## 1.1 Alimenti probiotici

Una categoria di alimenti funzionali particolarmente rilevante è quella dei probiotici, i quali sono definiti come alimenti contenenti microrganismi vivi, che se consumati in adeguato numero sono in grado di conferire un effetto benefico sulla salute del consumatore. Il

termine “probiotico” deriva dalla parola greca *pro bios*, che letteralmente significa “per la vita” (Reid *et al.*, 2003); si tratta di un termine introdotto dallo studioso tedesco Werner Kollath nel 1953, allo scopo di descrivere “sostanze attive essenziali per un salutare sviluppo della vita”. Nel 1965, invece, tale termine fu utilizzato da Lilly and Stillwell al fine di individuare “sostanze secrete da un organismo, in grado di stimolare la crescita di un altro”. Nel 1992, invece, Fuller definì i probiotici come dei veri e propri integratori dell’alimentazione a base di microrganismi vivi, che influiscono positivamente l’organismo ospite incrementando e migliorando l’equilibrio della flora intestinale (McFarland, 2015). Secondo la FAO (*Food and Agriculture Organisation of the United Nations*) e l’Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), i probiotici sono definiti come microrganismi vivi e vitali che, somministrati in adeguate quantità, sono in grado di conferire dei benefici alla salute dell’ospite (FAO/WHO, 2011).

All’inizio del ventesimo secolo, Ilya Ilyich Metchnikoff, un biologo russo che vinse il premio Nobel per la Medicina nel 1908, fu il primo ad individuare gli effetti dei moderni probiotici. Infatti, egli osservò che gli abitanti della Bulgaria presentavano una maggiore aspettativa di vita rispetto al resto della popolazione, e la principale motivazione risiedeva nel fatto che i primi assumevano attraverso la dieta un’elevata quantità di microrganismi, nello specifico batteri, come *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, presenti per lo più in alimenti come gli yogurt. Nel libro “*The Prolongation of Life*”, pubblicato nel 1907, il biologo affermò infatti che è possibile influenzare la flora batterica dell’intestino attraverso l’alimentazione, sostituendo dunque i microbi dannosi con microbi utili all’organismo. Quanto appena affermato descrive in modo sostanziale e preciso il concetto di “probiotico”.

La storia dei probiotici è in realtà tanto vecchia quanto quella umana (Ozen & Dinleyici, 2015), in quanto è intimamente legata alla produzione degli alimenti fermentati. Infatti, si può ipotizzare che nel momento in cui l’allevamento e l’agricoltura hanno sostituito la raccolta e la caccia nella vita dell’uomo, più di 10.000 anni fa, abbiano iniziato ad essere prodotti i primi alimenti fermentati. Il popolo sumero fu il primo a cimentarsi effettivamente nell’allevamento degli animali allo scopo di produrne degli alimenti, anche se solamente negli antichi testi indiani si citava il legame tra il consumo di prodotti lattiero-caseari fermentati e una vita longeva e sana (Gasbarrini *et al.*, 2016). L’origine dei primi latticini fermentati può anche essere ricondotta agli antichi Egizi e ai Fenici, ma soprattutto ai popoli di pastori nomadi, i quali erano soliti conservare il latte di vacche, pecore, capre, cavalli e

cammelli all'interno di recipienti costituiti dalla pelle o dalla mucosa gastrica degli animali, dove il liquido entrava in contatto con i batteri, probabilmente gli antenati di *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, conosciuto e utilizzato oggi. La leggenda narra che uno di questi pastori nomadi in viaggio attraverso il deserto turco dimenticò il latte all'interno di una sacca costituita di pelle di capra per un certo lasso di tempo, il quale si trasformò in una crema densa e saporita, che più avanti venne definita "yogurt". Al di là delle origini, gli effetti benefici legati al consumo di tali alimenti fermentati è riconosciuto da tempi immemori, ovvero da molto prima rispetto la scoperta dell'esistenza dei batteri stessi. Anche le altre culture hanno sviluppato, nel corso degli anni, vari prodotti fermentati; infatti, gli archeologi hanno evidenziato che già nel 7000 a.C. in Cina e nel 5000 a.C. in Mesopotamia venivano prodotte le prime bevande fermentate di origine vegetale, principalmente a partire da riso, frutti e cereali maltati. Prove scritte e iconografiche evidenziano che, nel periodo compreso tra il 3000 e il 2000 a.C., anche gli indiani, gli egizi, i greci e i romani utilizzavano prodotti fermentati a base di latte, i quali furono menzionati anche nei libri sacri dell'induismo e nella Sacra Bibbia. Plinio il Vecchio, all'interno del suo trattato *Naturalis Historia*, affermò che assaggiò un denso e delizioso latte acido, del quale i barbari erano particolarmente ghiotti, e ne raccomandava l'utilizzo per il trattamento delle infezioni gastrointestinali.

Le proprietà salutistiche dei prodotti lattieri caseari sono state parte del folklore fino alla nascita del concetto di "alimento probiotico" e fino alla messa a punto di studi più sistematici circa il legame tra i microrganismi presenti all'interno di tali alimenti e il benessere dell'organismo umano che li assume.

### **1.1.1 Microrganismi probiotici**

I batteri lattici sono i microrganismi maggiormente utilizzati nella messa a punto di alimenti probiotici, ma sono anche i normali costituenti del microbiota intestinale. Tuttavia, oltre ai batteri lattici, anche i bifidobatteri e alcuni lieviti vengono utilizzati come probiotici (Didari *et al.*, 2014). È importante anche affermare che gli effetti biologici dei probiotici sono ceppo-specifici e che l'attività probiotica o meno di un ceppo non può essere estesa ad un altro ceppo della stessa specie. Dunque, è necessario effettuare un'identificazione specifica dei singoli ceppi attraverso l'utilizzo di nuove tecnologie molecolari (Azaïs *et al.*, 2010). L'identificazione delle varie specie può essere effettuata attraverso l'analisi del gene codificante per l'RNA 16S oppure attraverso l'ibridazione DNA-DNA. Invece, a livello di ceppo, si può procedere attraverso vari metodi molecolari (gel-elettroforesi a campo

pulsato) oppure attraverso l'individuazione di tratti fenotipici unici (fermentazione di determinati tipi di substrati zuccherini oppure la determinazione dei prodotti di fermentazione) (FAO/WHO, 2001). Un altro aspetto importante da tenere in considerazione è che l'effetto positivo sulla salute attribuibile ad un microrganismo probiotico dev'essere dimostrato attraverso studi *in vivo*; sebbene gli studi *in vitro* o i modelli animali non possano essere utilizzati per provare effettivamente un effetto probiotico sull'uomo, possono essere usati al fine di caratterizzare un possibile meccanismo probiotico oppure per ottenere più conoscenze in merito a tali ceppi (Fijan, 2014). Tradizionalmente, i batteri lattici sono classificati sulla base delle proprietà fenotipiche, come la morfologia, la tipologia di fermentazione del glucosio, la crescita a differenti temperature e la capacità di fermentazione di vari substrati del carbonio.

Un microrganismo probiotico dovrebbe avere le seguenti caratteristiche ideali (Harmsen *et al.*, 2000):

- Elevata vitalità cellulare e resistenza al pH ridotto e agli acidi che caratterizzano il tratto gastro-intestinale;
- Capacità di resistere all'interno dell'intestino, anche qualora il ceppo probiotico non fosse in grado di colonizzare l'intestino;
- Capacità di aderire all'epitelio intestinale;
- Non-patogenicità;
- Capacità di resistere ai processi tecnologici.

Un'importante parte della definizione di "probiotico" afferma che il microrganismo in questione dev'essere "consumato in adeguate quantità" al fine di conferire un beneficio. Dunque, gli alimenti probiotici dovrebbero contenere specifici ceppi e dovrebbero mantenere un adatto numero di cellule microbiche vive e vitali durante la *shelf-life* del prodotto (Matti-Sandholm *et al.*, 2002). FAO/WHO (2002) affermano che ogni alimento venduto recante il claim probiotico deve contenere almeno  $10^6$ - $10^7$  UFC di batteri probiotici vivi e vitali per grammo. Inoltre, i microrganismi utilizzati per la preparazione degli alimenti probiotici dovrebbero essere generalmente riconosciuti come sicuri (GRAS), devono essere resistenti alla bile, all'acido cloridrico e ai succhi pancreatici, ovvero alle condizioni acide dello stomaco e a quelle alcaline del duodeno (Vimala & Kumar, 2006).

I microrganismi probiotici sono sottoposti alla corrente legislazione alimentare, la quale stabilisce che questi ultimi devono essere sicuri per la salute umana e animale. La sicurezza

di un ceppo è infatti definita come l'assenza di patogenicità e di antibiotico resistenza (EFSA, 2005), anche se recentemente è stato introdotto il termine QPS (*Qualified Presumption of Safety*) da parte dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA). Quest'ultimo concetto include alcuni criteri aggiuntivi in merito alla sicurezza dei microrganismi utilizzati nell'ambito alimentare, tra cui la storia di utilizzo sicuro e l'assenza di rischi legati all'acquisizione di antibiotico resistenze da parte del ceppo (EFSA, 2005). Inoltre, per definire effettivamente un ceppo come probiotico, gli aspetti di sicurezza devono includere altri dettagli, come l'origine del ceppo stesso; tuttavia, il report rilasciato dalla Commissione di Esperti per la Valutazione della Sicurezza e delle Proprietà Nutrizionali dei Probiotici (FAO/WHO, 2002) ha affermato che è particolarmente difficile identificare e confermare la fonte originale di un microrganismo. Inoltre, è stato dimostrato che l'abilità dei microrganismi di rimanere vivi e vitali e soprattutto efficaci dal punto di vista probiotico in un determinato sito è più importante rispetto all'origine di uno specifico ceppo, e queste proprietà dovrebbero essere verificate per ciascun ceppo probiotico (FAO/WHO, 2006).

Tra i principali probiotici utilizzati al giorno d'oggi è necessario citare i batteri lattici, i quali costituiscono il gruppo in assoluto più importante e più utilizzato per la produzione di tali alimenti. I batteri lattici ricoprono un ruolo estremamente importante nella fermentazione degli alimenti, tanto che molti ceppi sono quotidianamente utilizzati come colture starter per la produzione di prodotti lattiero-caseari e di prodotti fermentati a base di carne e di verdure (Chow, 2002). Il contributo più importante di questi ceppi nella produzione di tali prodotti fermentati è dato dalla preservazione delle principali qualità nutrizionali della materia prima e dall'estensione della *shelf-life* del prodotto attraverso l'inibizione dell'attività di microrganismi patogeni e alteranti. Ciò è permesso grazie alla competizione per i nutrienti messa in atto dalle colture starter, e dalla capacità di questi ultimi di produrre sostanze inibitrici nei confronti della crescita di altri ceppi, come acidi organici, perossido di idrogeno e batteriocine (O'Sullivan *et al.*, 2002).

Il gruppo dei batteri lattici comprende un ampio range di generi, a cui afferiscono varie specie. I batteri lattici sono microrganismi gram-positivi e catalasi negativi; alcuni ceppi sono strettamente anaerobi, mentre altri sono microaerofili. I generi più importanti afferenti alla categoria dei batteri lattici sono *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *tetragenococcus* e *Bifidobacterium*. Ad eccezione dei bifidobatteri, tutti i generi appena menzionati appartengono al

phylum caratterizzato da un basso contenuto di guanina e citosina ( $G + C < 50\%$ ) (Schleifer & Ludwig, 1995). Specie afferenti a questi generi possono essere riscontrate nel tratto gastro intestinale di uomini e animali, ma anche negli alimenti fermentati. I batteri lattici vengono solitamente suddivisi in due gruppi, a seconda del metabolismo dei carboidrati utilizzato:

- Batteri lattici omofermentanti: utilizzano la glicolisi (via di Embden-Meyerhof-Pharnas) per trasformare il glucosio in acido lattico. A questa categoria appartengono batteri afferenti ai generi *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*.
- Batteri lattici eterofermentanti: producono lattato, anidride carbonica, etanolo o acetato a partire dalla fonte carboniosa (glucosio), utilizzando la via della fosfochetolasi. A questa categoria appartengono batteri afferenti ai generi *Leuconostoc* e *Weissella*.

Ceppi utilizzati come probiotici afferiscono ai generi *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium*, in quanto sono considerati sicuri grazie alla loro naturale presenza all'interno dell'intestino umano e degli alimenti. Altre specie meno comuni e utilizzate come probiotici afferiscono ai generi *Streptococcus*, *Saccharomyces* (lievito), *Escherichia*, *Lactococcus* e *Enterococcus* (Tabella 1).

I lattobacilli sono microrganismi gram-positivi, non sporigeni, catalasi-negativi e caratterizzati da una morfologia a bastoncino oppure coccica. Presentano un *optimum* termico di crescita prossimo a 35-40°C e un *optimum* di pH prossimo a 4.5 – 6.5, anche se la crescita si arresta quando si raggiungono valori prossimi a 3.5 – 4.0. La maggior parte dei ceppi è in grado di resistere alle condizioni acide dello stomaco ed è inoltre in grado di aderire alle cellule intestinali. Al genere *Lactobacillus* afferiscono diverse specie: *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*. I lattobacilli sono ubiquitari in natura e si riscontrano in ambienti ricchi in carboidrati.

I bifidobatteri furono isolati e descritti per la prima volta nel 1899-1900 da Henry Tissier, uno studioso dell'istituto Pasteur, il quale descrisse microrganismi anaerobi a forma di bastoncino ricurvo isolati dalle feci di neonati allattati al seno; a causa della loro morfologia li denominò *Bacillus bifidus*. I bifidobatteri sono caratterizzati come anaerobi gram-positivi, non sporigeni, non mobili e catalasi negativi. Possono presentare varie forme, incluse quelle di bastoncini corti e curvi, bastoncini a forma di clava e bastoncini biforcati a forma

di Y. La crescita di tali microrganismi è massima in corrispondenza di un pH pari a 6.00 – 7.00, ma si arresta quando quest'ultimo si abbassa al di sotto di valori pari a 4.5 – 5.0 o supera valori pari a 8.0 – 8.5. La temperatura ottimale di crescita è pari a 37-41°C, con un tasso massimo in corrispondenza di temperature pari a 43-45°C. Si possono quindi definire meso-termofili.

*Tabella 1* – Specie probiotiche utilizzate all'interno degli alimenti probiotici (adattata da Holzapfel *et al.*, 2001)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Altri batteri lattici	Altre specie
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus fae-</i>	<i>Bacillus cereus</i> var.
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>calis</i>	<i>toyoi</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Enterococcus fae-</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>cium</i>	ceppo nissle
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium</i>
subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. lactis</i>	subsp. <i>lactis</i>	<i>freudenreichii</i>
<i>L. lactis</i>	<i>B. longum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>L. johnsonii</i>		subsp. <i>cremoris</i>	<i>cerevisiae</i>
<i>L. paracasei</i>		<i>Leuconostoc mes-</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>L. plantarum</i>		<i>enteroides</i>	<i>boulardii</i>
<i>L. reuteri</i>		<i>Pediococcus acidi-</i>	
<i>L. rhamnosus</i>		<i>lactici</i>	
<i>L. fermentum</i>		<i>Sporolactobacillus</i>	
		<i>inulinus</i>	
		<i>Streptococcus ther-</i>	
		<i>mophilus</i>	

Accanto ai probiotici è importante citare anche i prebiotici, sostanze non digeribili come gli amidi, fibre, oligosaccaridi e altri zuccheri non digeribili, che influiscono positivamente sulla salute dell'organismo stimolando la crescita o l'attività di uno o più ceppi all'interno del colon (Gibson *et al.*, 1995). Gli alimenti fortificati grazie all'aggiunta di probiotici e prebiotici assicurano dei benefici per la salute e, per questo, sono definiti alimenti funzionali.

### **1.1.2 Meccanismo d'azione dei probiotici**

I meccanismi di azione dei probiotici sono stati oggetto di numerosi studi, i quali hanno dimostrato che è importante collegare il meccanismo d'azione dei molti diversi probiotici allo specifico ceppo, alla quantità di probiotici consumata e al metodo di somministrazione. È pertanto importante notare che i meccanismi d'azione non possono essere generalizzati a tutti i probiotici.

Secondo Oelschlaeger (2010), gli effetti dei probiotici possono essere categorizzati in tre modalità d'azione:

- Modulazione delle difese dell'ospite, ovvero del sistema immunitario. Questa modalità d'azione è fondamentale soprattutto per la prevenzione e la terapia delle malattie infettive, ma anche per il trattamento dell'infiammazione cronica del tratto gastrointestinale;
- Effetto su altri microrganismi. Questa proprietà potrebbe essere di immenso beneficio e vitale nella prevenzione e nella terapia delle infezioni e nel ripristino complessivo dell'equilibrio microbico nell'intestino;
- Effetto sulle sostanze prodotte da altri microrganismi e dall'ospite, come le tossine o i sali biliari. Questa proprietà può portare all'inattivazione delle tossine e favorire la disintossicazione nel tratto gastrointestinale.

I microrganismi probiotici colonizzano l'intestino dei mammiferi, il quale è stato contrassegnato come l'ambiente favorevole alla proliferazione e all'esistenza di tali batteri. L'obiettivo fondamentale dell'applicazione clinica dei probiotici è prevalentemente la prevenzione e il trattamento delle infezioni e delle malattie gastrointestinali. Alcune applicazioni terapeutiche dei probiotici includono anche la prevenzione delle malattie urogenitali, il sollievo dalla stitichezza, la protezione contro la diarrea del viaggiatore, la riduzione dell'ipercolesterolemia, la protezione contro il cancro al colon e della vescica e la prevenzione dell'osteoporosi e delle allergie alimentari (Song *et al.*, 2012).

### **1.1.3 Attività benefiche dei microrganismi probiotici**

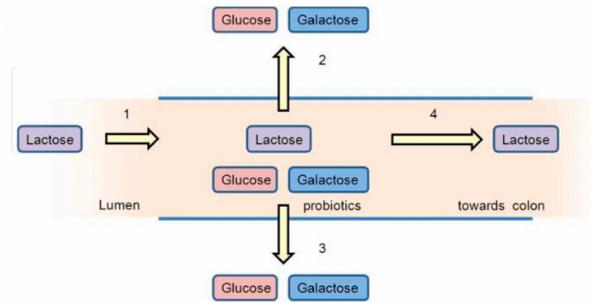
Come anticipato, ai microrganismi probiotici sono riconosciuti numerosi benefici, tra cui l'attività antimicrobica contro le infezioni gastrointestinali, il miglioramento del metabolismo del lattosio, le proprietà antimutagene e anticarcinogene, la riduzione del colesterolo, le proprietà antidiarroiche, la stimolazione del sistema immunitario, l'attività contro le infiammazioni intestinali e l'infezione da *Helicobacter pylori* (Kurmman & Rasic, 1991).

Alcuni dei benefici sono ben confermati e provati, mentre altri hanno portato a risultati promettenti nei modelli animali. Di conseguenza, sono richiesti ulteriori studi sui modelli umani al fine di confermare anche questi ultimi *claims*. I benefici legati ai probiotici sono ceppo specifici. Le principali attività benefiche dei microrganismi probiotici possono essere così riassunte:

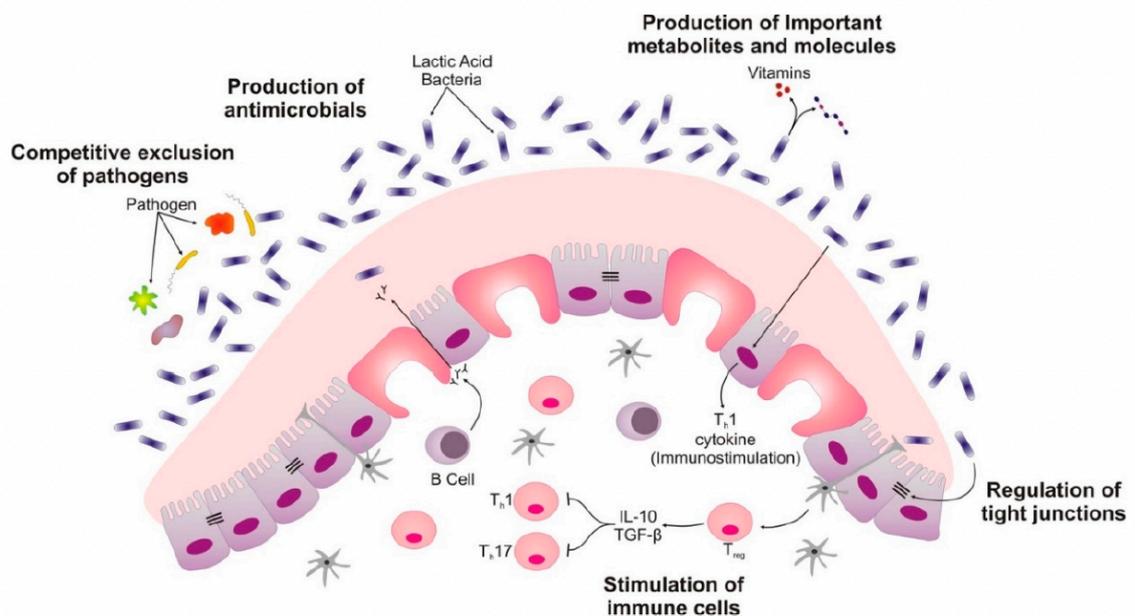
- Attività antimicrobica contro le infezioni gastrointestinali: grazie alla produzione di acidi organici, perossido di idrogeno e batteriocine, ovvero sostanze in grado di inibire la proliferazione di alcuni microrganismi patogeni. Inoltre, l'abbassamento del pH ottenuto grazie all'azione dei probiotici può avere un'azione battericida o comunque batteriostatica (Shah, 1999);
- Efficienza contro la diarrea causata da *Clostridium difficile*: uno dei principali problemi associati ai trattamenti antibiotici è la comparsa di sintomi diarroici, spesso causati da *C. difficile*. Nell'organismo sano tale batterio è presente in numero particolarmente ridotto; tuttavia, nel momento in cui la microflora intestinale subisce uno sconvolgimento a causa dell'assunzione di un antibiotico, tale microrganismo è in grado di crescere e produrre la sua tossina, che porta all'insorgenza di sintomi diarroici. Una dose giornaliera di *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG sembra essere efficace nei confronti di tali problematiche (Shah, 2006);
- Miglioramento del metabolismo del lattosio: tale beneficio è sicuramente quello più riconosciuto e permette di risolvere la problematica legata al malassorbimento del lattosio. Il malassorbimento del lattosio è una condizione in cui il lattosio non viene completamente idrolizzato in glucosio e galattosio a causa della carenza di uno specifico enzima, ovvero la  $\beta$ -galattosidasi. Quando il lattosio non viene idrolizzato dall'enzima, i microrganismi presenti a livello della microflora lo fermentano causando la formazione di gas idrogeno. I microrganismi probiotici presenti in alcuni alimenti sono in grado di idrolizzare il lattosio grazie alla presenza, nel loro corredo enzimatico, dell'enzima  $\beta$ -galattosidasi (Shah, 2000). Il metabolismo del lattosio a livello del piccolo intestino, grazie anche alla presenza dei probiotici, è schematizzata nella Figura 1.
- Proprietà antimutagene: l'effetto antimutageno nei confronti di agenti mutageni e promutageni è stato riscontrato in vari test effettuati su cellule microbiche e di mammiferi, dove gli organismi probiotici hanno dimostrato la capacità di legare tali agenti a livello della superficie cellulare (Orrhage *et al.*, 1994);

- Proprietà anticancerogene: alcuni prodotti del metabolismo batterico, come le nitrosammine e le ammine eterocicliche sono responsabili del cancro al colon-retto. Inoltre, alcuni ceppi presenti a livello del colon sono in grado di convertire alcune sostanze procancerogene in cancerogene, grazie all'azione di alcuni enzimi come le  $\beta$ -glucuronidasi, le azoreduttasi e la nitroreduccasi. Alcuni ceppi afferenti ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* sono in grado di ridurre l'azione di tali enzimi, prevenendo quindi il rischio di insorgenza di tali patologie (Yoon *et al.*, 2000);
- Riduzione del colesterolo a livello del sangue: alcuni batteri probiotici sono in grado di deconiugare i sali biliari, riducendone quindi la capacità di assorbire i lipidi. *Lactobacillus acidophilus* è inoltre in grado di utilizzare il colesterolo durante la crescita, rendendolo quindi non disponibile per l'assorbimento nel flusso sanguigno (Klaver & Meer, 1993);
- Attività contro l'infezione da *Helicobacter pylori*: *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus* sono efficacemente utilizzati contro l'infezione da *Helicobacter pylori* grazie alla loro capacità di inibirne la crescita (Cats *et al.*, 2003). Questa strategia può essere utile e sostitutiva all'impiego degli antibiotici;
- Modulazione del sistema immunitario: uno studio condotto da Galdeano *et al.* (2009) ha messo in evidenza l'effetto del latte fermentato contenente un ceppo di *Lactobacillus casei* sulla mucosa intestinale. Nello specifico, tale ceppo ha indotto una stimolazione immunitaria della mucosa, rafforzando la barriera non specifica e modulando la risposta immunitaria innata nell'intestino dell'ospite e il mantenimento dell'omeostasi intestinale. Ad esempio, uno studio di Shu & Gill (2001) ha dimostrato la capacità di un ceppo di *Lactococcus lactis* era in grado di ridurre la gravità della tossinfezione causata dal patogeno enteropatogeno *Escherichia coli* O157:H7. Questo effetto può essere associato alla migliore protezione immunitaria conferita dal probiotico.

Uno schema riassuntivo delle modalità attraverso cui i probiotici esercitano i loro ruoli benefici nel tratto gastrointestinale è illustrato nella Figura 2.



**Figura 1** – Metabolismo del lattosio a livello del piccolo intestino. Il lattosio entra nel piccolo intestino (1) e viene convertito dalla lattasi endogena dell'uomo (2) oppure da quella dei probiotici (3). L'eccesso di lattosio rimasto intatto passa invece al colon (4) (Vonk *et al.*, 2012).



**Figura 2** – Schema riassuntivo delle principali modalità attraverso cui i probiotici esercitano i loro ruoli benefici all'interno dell'intestino. I batteri lattici isolati dai prodotti lattiero-caseari sono responsabili dell'esclusione competitiva nei confronti dei patogeni, della secrezione di importanti metaboliti come le batteriocine. Questi probiotici sono in grado di creare una barriera mucosa attraverso la stimolazione delle cellule mucipare. L'interazione dei ceppi di *Lactobacillus* con l'epitelio intestinale è in grado, inoltre, di differenziare le cellule immunitarie e regolare la funzione difensiva delle cellule dell'epitelio intestinale (Ghosh *et al.*, 2019).

## 1.2 Postbiotici

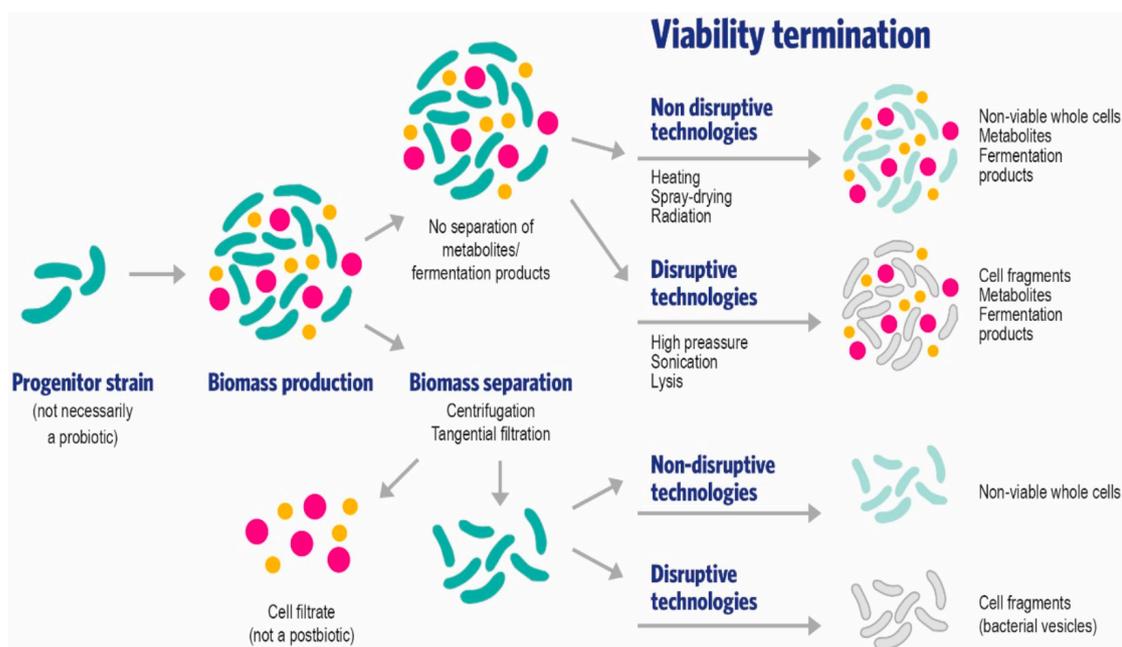
Come detto precedentemente, una delle caratteristiche fondamentali per definire i probiotici riguarda il fatto che i microrganismi devono essere vivi e vitali nel momento in cui vengono assunti dal consumatore, al fine di assicurare lo svolgimento dell'attività benefica associata. Tuttavia, si è riscontrato anche che i microrganismi non vitali, i loro componenti cellulari e i loro metaboliti possono impattare sulla salute del consumatore. Per definire gli

alimenti contenenti tali elementi, l'Associazione Scientifica Internazionale per i Probiotici e i Prebiotici (ISAPP), nel 2021, ha affermato che un postbiotico è “una preparazione di microrganismi non vivi e non vitali e/o loro componenti, che sono in grado di conferire dei benefici al consumatore” (Salminen *et al.*, 2021). Dunque, il termine postbiotico si riferisce a tutte quelle sostanze derivanti nel momento in cui i microrganismi non sono più vivi o, in altre parole, quando sono inanimati, morti o inattivati. All'interno di un postbiotico si possono riscontrare infatti cellule inanimate e intatte, oppure frammenti strutturali di microbi, come le loro pareti cellulari. Molte preparazioni di postbiotici mantengono anche sostanze prodotte dai microbi, come i metaboliti, le proteine o i peptidi, che possono contribuire all'effetto complessivo sulla salute conferito dal postbiotico stesso. Inoltre, un postbiotico dev'essere ottenuto a partire da un microrganismo ben definito, oppure da una combinazione di microrganismi di cui si conoscono le sequenze genomiche, e dev'essere preparato utilizzando un processo tecnologico delineato di produzione e inattivazione, o separazione, della biomassa, che può essere riprodotto in modo affidabile.

I postbiotici possono presentare dei vantaggi rispetto ai probiotici, in particolar modo in termini di sicurezza, in quanto le cellule microbiche non vitali possono ridurre il rischio di traslocazione batterica intestinale, infezioni o risposte infiammatorie potenziate, come dimostrato per alcuni probiotici in consumatori con sistemi immunitari sbilanciati oppure compromessi (Taverniti & Guglielmetti, 2011). L'inattivazione delle cellule batteriche può essere ottenuta mediante metodi fisici (disgregazione meccanica, trattamento termico, irraggiamento  $\gamma$  o UV, alta pressione idrostatica, liofilizzazione o sonicazione) o metodi chimici (inattivazione con acidi), i quali possono alterare le strutture delle cellule microbiche o le loro funzioni fisiologiche. Come detto precedentemente, il termine “postbiotico” si può riferire anche ai composti solubili (prodotti del metabolismo) che possono essere secreti dai batteri vivi, oppure che possono essere rilasciati a seguito della loro morte. Questi sottoprodotti possono conferire benefici fisiologici all'ospite, fornendo una bioattività aggiuntiva (Cicenia *et al.*, 2014). Tali fattori solubili possono essere ottenuti a partire da vari ceppi batterici e sono rappresentati prevalentemente da acidi grassi a catena corta, enzimi, peptidi, acidi teicoici, endo- ed eso-polisaccaridi, proteine di superficie, vitamine, batteriocine, etanolo, diacetile, acetaldeide e perossido di idrogeno (Konstantinov *et al.*, 2013).

La Figura 3 illustra vari modi attraverso cui una coltura potrebbe essere preparata prima di essere valutata come candidato postbiotico. Un microrganismo può essere considerato postbiotico solamente se è adeguatamente caratterizzato, preparato adeguatamente attraverso

un metodo riproducibile per l'inattivazione o la separazione e, inoltre, deve dimostrare il conferimento di un beneficio per la salute. Per questo, un microrganismo probiotico che perde gradualmente la vitalità cellulare durante la *shelf-life* dell'alimento non diventa gradualmente un postbiotico, ma è semplicemente un alimento probiotico che, se formulato correttamente, fornirà una dose efficace di cellule vive e vitali fino alla fine della *shelf-life*.



**Figura 3** – Possibili pathway per la produzione di preparazioni di colture inattivate, composte da cellule intere o dai loro frammenti, con o senza i metaboliti o i prodotti della fermentazione. Tali preparazioni devono essere sottoposte alla valutazione dell'efficacia nell'ospite prima di essere dichiarate postbiotiche (Vinderola *et al.*, 2022).

### 1.2.1 Effetti e bioattività dei postbiotici

Negli ultimi anni, un considerevole numero di studi ha fatto uso di modelli *in vitro* o *in vivo* per determinare il potenziale bioattivo o gli effetti sulla salute di vari postbiotici, tra cui i metaboliti intracellulari e i componenti cellulari. Nella maggioranza dei casi, i postbiotici derivano da ceppi afferenti ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*; tuttavia, anche *Streptococcus* e *Faecalibacterium* si sono dimostrati un'ottima fonte di postbiotici (Konstantinov *et al.*, 2013). È stato dimostrato che i postbiotici presentano un'attività antiipertensiva, con un meccanismo ancora non chiarito; tuttavia, si è ipotizzato che l'assunzione di postbiotici possa portare ad una modificazione del microbiota intestinale, il che si traduce in una variazione dei sottoprodotti metabolici che possono influenzare positivamente la pressione sanguigna (Robles-Vera *et al.*, 2017). Ulteriori evidenze effettuate *in vitro* hanno dimostrato che il soprannatante di una coltura di *Lactobacillus paracasei* può proteggere il tessuto sano dalle proprietà infiammatorie di *Salmonella* spp. in un espianto di mucosa

umana del colon (Tsilingiri *et al.*, 2012). Inoltre, è stato riscontrato che il soprannatante di una coltura di *Lactobacillus casei* può mitigare la risposta infiammatoria in culture di mucosa dell'ileo e del colon ottenute da pazienti affetti da sindrome del colon irritabile post-infettiva (Compare *et al.*, 2017). I postbiotici hanno dimostrato anche capacità inibitorie nei confronti di microrganismi patogeni come *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* ed enterococchi resistenti alla vancomicina; nello specifico, tali postbiotici sono stati ottenuti a partire da un soprannatante privo di cellule ottenuto da differenti ceppi di *Lactiplantibacillus plantarum* (Kareem *et al.*, 2014). È stata inoltre dimostrata la capacità antiossidante di alcuni esopolisaccaridi ottenuti da *Bifidobacterium animalis*; nello specifico, tali sostanze hanno dimostrato un'inibizione *in vitro* della perossidazione lipidica e la capacità di eliminare i radicali liberi, come il radicale idrossilico e il radicale superossido (Xu *et al.*, 2011).

Numerosi studi hanno dimostrato un effetto preventivo nei confronti dell'obesità, oltre al controllo del metabolismo lipidico. Ad esempio, Kim *et al.* (2021) hanno valutato l'effetto anti-adipogenico di *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum*, una volta separato dal soprannatante attraverso la centrifugazione e sottoposto a spray-drying. Gli autori hanno osservato che i postbiotici sono in grado di inibire l'accumulo di lipidi durante l'adipogenesi attraverso l'inibizione dei fattori chiave dell'attivazione di tale reazione. I risultati osservati suggeriscono che i postbiotici sono particolarmente interessanti dal punto di vista della prevenzione dell'obesità e dell'accumulo di lipidi, costituendo una valida alternativa per la produzione di alimenti funzionali. Inoltre, degli esperimenti effettuati su cavie hanno dimostrato che l'assunzione di postbiotici derivanti da *Lactobacillus brevis*, inattivato a seguito di un trattamento termico, è stata in grado di migliorare l'equilibrio del microbiota intestinale e a favorire una maggior sintesi di acidi grassi a catena corta (Silva *et al.*, 2020).

Altri studi *in vivo* hanno valutato l'impatto della somministrazione di postbiotici sull'infiammazione e sulle malattie correlate. Chung *et al.* (2019) hanno dimostrato l'effetto dei postbiotici di *Enterococcus faecalis*, inattivato attraverso riscaldamento, sull'infiammazione intestinale e sulla protezione contro le coliti nelle cavie. *E. faecalis* è in grado di ridurre la gravità dell'infiammazione intestinale, proteggere dalla colite indotta da solfato di sodio destrano (DSS) e proteggerli dal cancro al colon-retto.

I principali effetti positivi legati ai postbiotici sono elencati nella Figura 4; altri effetti riguardano il miglioramento dell'idratazione della pelle, dell'equilibrio del sistema immunitario e la prevenzione di malattie come il diabete (Pimentel *et al.*, 2023).

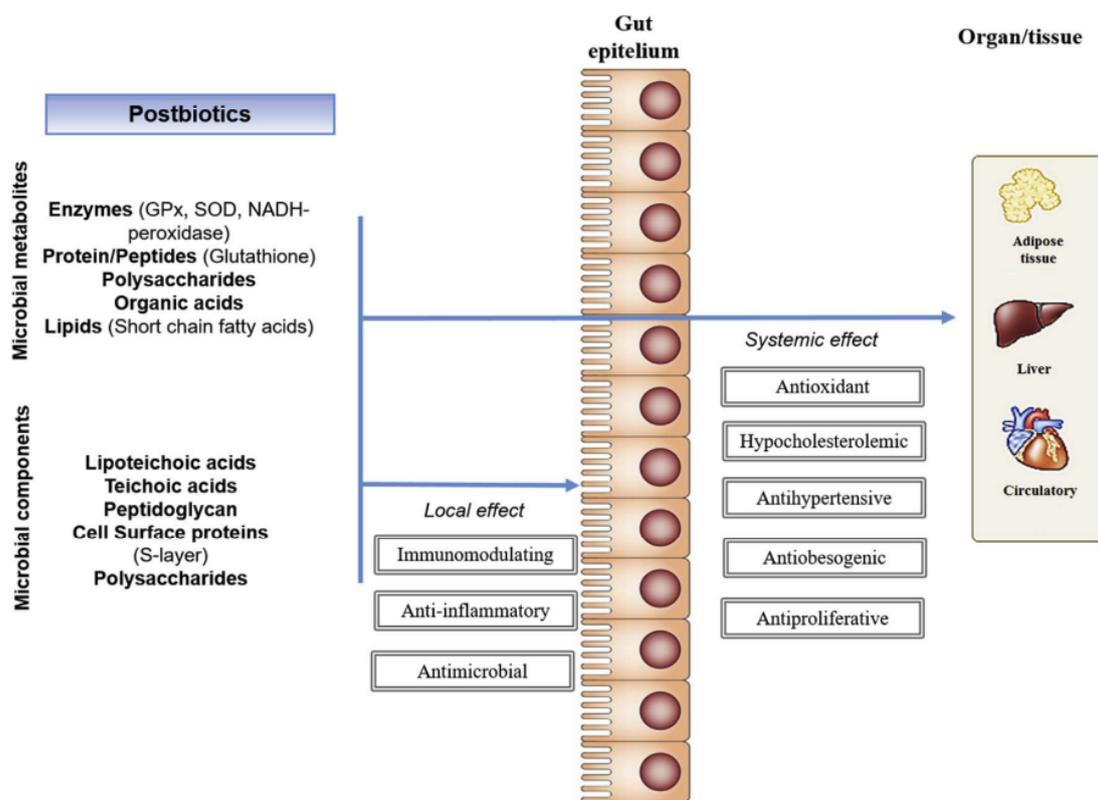


Figura 4 – Alcuni postbiotici e i loro potenziali effetti positivi sull'ospite (Aguilar-Toalá *et al.*, 2018).

### 1.3 Estratti vegetali fermentati

Come detto precedentemente, gli estratti vegetali fermentati possono essere considerati come degli alimenti liquidi funzionali ottenuti grazie alla fermentazione di piante ad opera di microrganismi, principalmente batteri e funghi. Grazie alla fermentazione, i microrganismi possono apportare benefici all'organismo umano in varie modalità. I principali vantaggi associati all'utilizzo dei microrganismi per fermentare gli estratti vegetali sono:

- *Shelf-life* prolungata: attraverso la produzione di metaboliti come gli acidi organici, etanolo, batteriocine, i microrganismi fermentanti sono in grado di inibire la crescita di eventuali microrganismi patogeni o degradare eventuali sostanze tossiche;
- Aumento del valore nutrizionale degli alimenti, attraverso la produzione di metaboliti come proteine, amminoacidi essenziali, acidi grassi essenziali e vitamine;
- Miglioramento del profilo sensoriale dell'alimento, attraverso la produzione di composti aromatici.

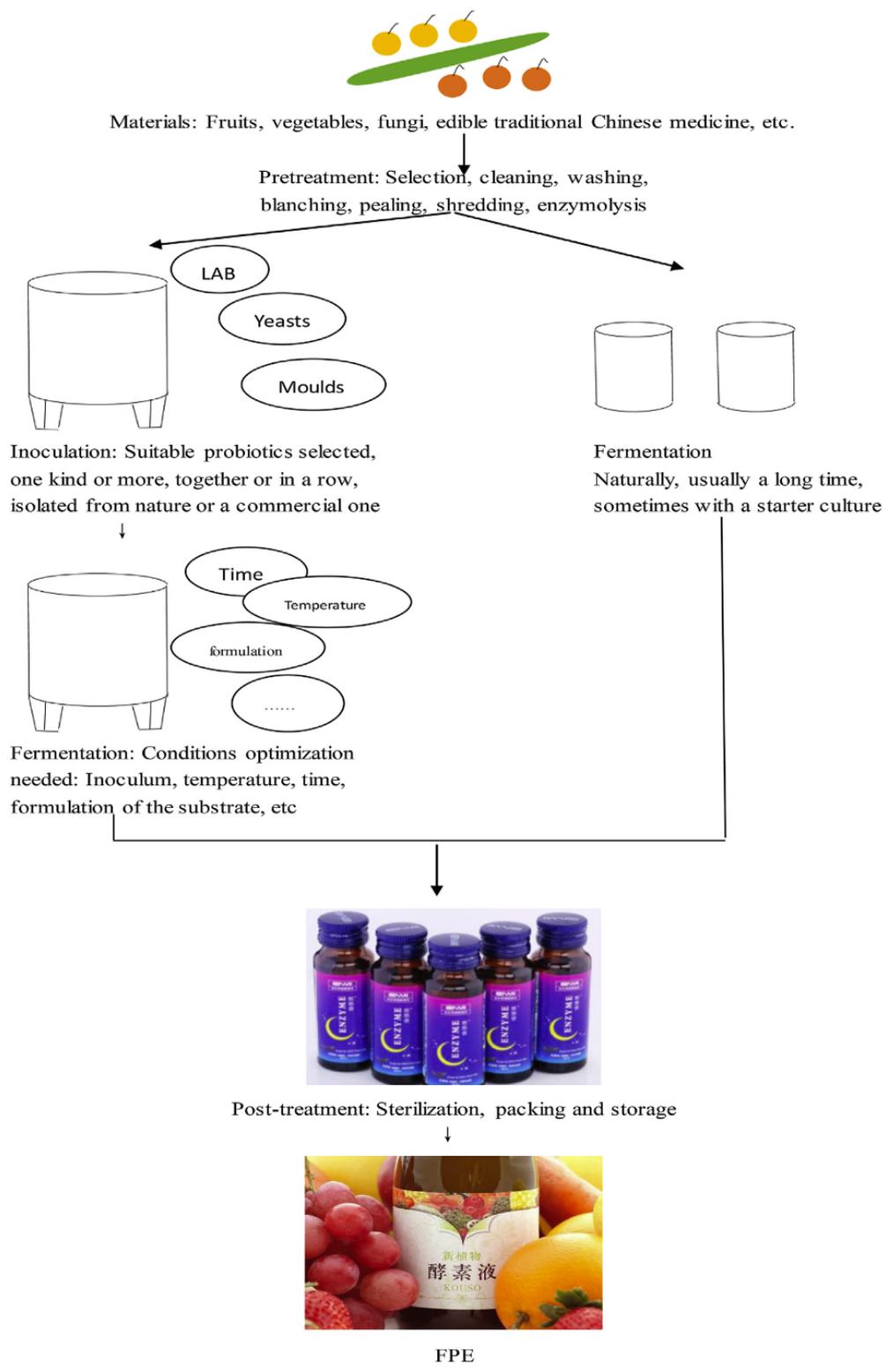
Gli estratti vegetali fermentati sono un'ottima fonte di antiossidanti, vitamine, minerali e polifenoli, oltre a proteine, fibre e microrganismi probiotici. Il miglioramento del contenuto

fitochimico e del potenziale bioattivo di tali prodotti dipende dai microbi utilizzati per la fermentazione e dalle condizioni di fermentazione; infatti, la scelta appropriata dei microrganismi e della pianta di partenza è essenziale al fine di ottenere il risultato desiderato in termini di contenuto di composti bioattivi. Infatti, la rottura della parete cellulare e l'attività idrolitica dei microrganismi fermentanti durante la fermentazione permettono la produzione e la liberazione di polifenoli, flavonoidi, acidi organici, proteine, amminoacidi, enzimi e antiossidanti (Majchrzak *et al.*, 2022).

L'applicazione dei microrganismi negli estratti vegetali è ben nota; infatti, la selezione di ceppi già utilizzati per le produzioni commerciali rappresenta una strategia per i produttori, i quali riescono a controllare più efficacemente il processo di fermentazione e, di conseguenza, la qualità finale del prodotto (Havas *et al.*, 2014). I microrganismi utilizzati includono infatti lieviti, batteri lattici e muffe (Wardhani *et al.*, 2010). La selezione dei microrganismi è un processo importante nella produzione degli estratti vegetali fermentati. Come detto precedentemente, si tende ad utilizzare microrganismi utilizzati normalmente per le fermentazioni alimentari, anche se comunque i criteri di selezione riguardano anche la produzione di composti bioattivi e la valutazione sensoriale. Ad esempio, nella fermentazione della bevanda *Yerba matè*, un'infusione preparata con le foglie verdi o tostate di un agrifoglio sempreverde, Lima *et al.* (2012) selezionarono un ceppo di *Lactobacillus acidophilus* basandosi proprio sulle caratteristiche sensoriali e salutistiche che il ceppo era in grado di apportare. A seguito della fermentazione sono state riscontrate nell'estratto sostanze come xantine, polifenoli e altre sostanze antiossidanti, associate a validi benefici per il consumatore.

### **1.3.1 Tecnologie produttive**

La storia della produzione industriale di estratti vegetali fermentati è particolarmente corta, anche se si sta sviluppando velocemente. Un tipico processo di produzione industriale di estratti vegetali fermentati è articolato nei seguenti passaggi: selezione della pianta; pre-trattamento; inoculo del ceppo microbico fermentante; fermentazione; post-trattamento. La Figura 5 schematizza un tipico processo di ottenimento di un estratto vegetale fermentato, anche se occorre considerare che le tipologie di fermentazione possono variare, in quanto queste ultime possono essere condotte in varie condizioni, ma anche nella configurazione *batch* o in continuo (Rollan *et al.*, 2015).



**Figura 5** – Rappresentazione schematica del processo di produzione degli estratti vegetali fermentati (Feng *et al.*, 2017).

Aspetti di particolare rilevanza nella messa a punto del processo sono:

- Selezione dei microrganismi: la selezione dei microrganismi è un importante processo nella produzione degli estratti vegetali fermentati. I microrganismi possono

essere prelevati da stock di laboratorio oppure possono essere isolati dall'ambiente. Tuttavia, occorre considerare anche che gli estratti vegetali fermentati tradizionali sono ottenuti grazie a fermentazioni spontanee ad opera dei microrganismi naturalmente presenti all'interno della matrice vegetale.

- Condizioni di fermentazione: le condizioni di fermentazione devono essere ottimizzate allo scopo di ottenere la maggior produzione di sostanze bioattive e il miglior risultato dal punto di vista sensoriale. Le principali condizioni di fermentazione da prendere in considerazione nella messa a punto del processo sono la temperatura, il tempo, concentrazione dell'inoculo e la presenza di sostanze inibitorie. Anche il pretrattamento del substrato è particolarmente importante nella produzione degli estratti vegetali fermentati; ad esempio, il livello di frammentazione del substrato vegetale può influire sulla crescita microbica, in quanto una maggior frammentazione corrisponde ad una maggiore superficie disponibile ai microrganismi per l'adesione e la fermentazione, ma anche ad una maggiore liberazione di nutrienti nel mezzo di crescita.
- Trattamenti post-fermentazione: per estendere ulteriormente la *shelf-life* degli estratti vegetali fermentati è possibile utilizzare varie strategie, come la pastorizzazione o la sterilizzazione, ma anche i trattamenti a raggi ultravioletti (Borcakli *et al.*, 2013).

### 1.3.2 Sostanze bioattive

Numerose sostanze bioattive sono state rilevate all'interno degli estratti vegetali fermentati, come zuccheri, peptidi, composti aromatici e sostanze antiossidanti (Tabella 2). Queste ultime rappresentano senza dubbio i composti bioattivi di maggior interesse all'interno degli estratti vegetali fermentati. Acido aminobutirrico, polifenoli, flavonoidi sono stati ad esempio riscontrati all'interno dell'estratto vegetale fermentato ottenuto a partire dalle foglie del pepe (Song *et al.*, 2014). Il prodotto ha inoltre dimostrato una capacità inibitoria molto spiccata nei confronti dell'enzima  $\alpha$ -glucosidasi, facendo sì che possa essere considerato a tutti gli effetti un *novel food* funzionale con capacità antiossidanti e antidiabetiche. Altre sostanze di particolare importanza prodotte dal metabolismo microbico all'interno degli estratti vegetali fermentati sono i peptidi; un esempio è la bevanda Boza, una bevanda fermentata turca che rappresenta un'ottima fonte di peptidi ACE-inibitori (ACE, ovvero Enzima di Conversione dell'Angiotensina), importanti per la regolazione della pressione sanguigna (Kancabas *et al.*, 2013).

Tabella 2 – Principali sostanze bioattive negli estratti vegetali fermentati (adattato da Feng *et al.*, 2017).

Sostanze bioattive	Prodotti fermentati	Attività benefica
Peptidi ACE-inibitori	Boza	Regolazione della pressione sanguigna attraverso la riduzione dell'enzima di conversione dell'angiotensina
Componenti aromatici (esteri, alcoli, chetoni, acidi)	Bevande fermentate a base di mela e uva	Aumento dell'aroma del prodotto
Esopolisaccaridi (destrano) e oligosaccaridi	Mosto di malto d'orzo fermentato	Miglioramento del profilo reologico del prodotto
Polifenoli	Vinacce fermentate	Antiossidante
Antociani	Vinacce fermentate	Antiossidante
Acido $\gamma$ -amminobutirrico, polifenoli, flavonoidi	Bevanda fermentata a base di foglie di pepe	Antiossidante

### 1.3.3 Potenziale benefico sulla salute

Grazie all'elevato contenuto di sostanze bioattive, gli estratti vegetali fermentati sono in grado di svolgere numerose funzioni benefiche, come la capacità antiossidante, antitumorale e di prevenzione nei confronti dell'obesità e delle patologie cardiovascolari.

- Capacità antiossidante: tale capacità degli estratti vegetali fermentati è stata testata sulla bevanda Damdusi, ottenuta a partire dalla fermentazione della soia. Nello specifico, sono stati condotti dei test sia su sistemi cellulari che non cellulari: nel primo caso, è stata dimostrata un'attività di inibizione dei radicali liberi e della perossidazione lipidica; nel secondo caso, invece, sono state dimostrate attività di inibizione nei confronti del radicale idrossido e perossido, oltre ad un'elevata attività chelante (Ahn & Je, 2011);
- Malattie cardiovascolari: Ahrén *et al.* (2015), attraverso uno studio *in vivo*, hanno dimostrato l'azione anti-ipertensiva e contro i disturbi cardiovascolari di un estratto vegetale a base di mirtillo e fermentato con *Lactiplantibacillus plantarum*;
- Controllo dell'obesità: Pyo & Seong (2009) hanno dimostrato come la somministrazione per via orale di un estratto fermentato a base di soia ha permesso di diminuire il tasso di colesterolemia e trigliceridemia a livello ematico.
- Miglioramento dell'equilibrio del microbiota: Bianchi *et al.* (2014) hanno studiato gli effetti di quattro bevande fermentate a base di quinoa e soia sul microbiota

intestinale umano. I risultati hanno dimostrato che la bevanda ha permesso di migliorare l'equilibrio del microbiota soprattutto a livello della porzione del colon ascendente, stimolando la crescita di microrganismi come *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., riducendo al contempo le popolazioni di *Clostridium* spp. ed *Enterococcus* spp.

Tuttavia, nonostante gli aspetti positivi appena menzionati, è importante affermare anche l'esistenza di effetti negativi, come ad esempio l'accumulo di ammine biogene, sostanze derivanti dal catabolismo proteico e molto comuni a livello dei prodotti fermentati. Ad esempio, la concentrazione dell'ammina biogena tiramina è particolarmente rilevante (13-65 mg/kg) all'interno della bevanda fermentata Boza, con possibili effetti negativi per la salute del consumatore.

## 1.4 Rucola

La rucola (*Eruca* spp.) è una pianta erbacea annuale che afferisce alla famiglia delle *Brassicaceae* (crucifere) e viene attualmente impiegata sia nell'ambito culinario che in quello medico/erboristico. È importante affermare che si utilizza la parola "rucola" per riferirsi ad un gruppo di piante erbacee al quale afferiscono due generi, ovvero *Eruca* e *Diplotaxis*, entrambi importanti nel mercato mondiale delle insalate (Pasini *et al.*, 2011).

Si tratta di una pianta originaria delle aree mediterranee (Martinez-Sanchez *et al.*, 2006), che viene attualmente coltivata in vari paesi, come USA, UK, Italia, Spagna, Marocco, Israele, India e Australia (Bozokalfa *et al.*, 2011). Le foglie della pianta di rucola vengono comunemente consumate crude e sono caratterizzate da un sapore pungente e leggermente piccante (Bell *et al.*, 2017).

Vari studi hanno dimostrato le potenzialità nutraceutiche della rucola, la quale può essere considerata come una fonte di glucosinolati (Kim *et al.*, 2004), composti bioattivi derivanti principalmente dal metabolismo secondario della pianta, che li utilizza come meccanismo di difesa (Schranz *et al.*, 2009).

### 1.4.1 Tassonomia

Come detto, il termine "rucola" si riferisce ad un vegetale a foglia largamente consumato, appartenente ai generi *Diplotaxis* ed *Eruca*, i quali afferiscono alla famiglia delle *Brassicaceae*. Le specie più comunemente utilizzate a scopo alimentare sono *Eruca vesicaria* subsp. *sativa* (rucola da insalata o annuale) e *Diplotaxis tenuifolia* (rucola selvatica o

perenne). Le specie afferenti al genere *Eruca* presentano fiori bianchi, foglie lobate e si diffondono naturalmente come infestanti nei campi di mais e lino, nei luoghi incolti e talvolta lungo le strade (Bianco, 1995). L'olio estratto dai semi è principalmente utilizzato come lubrificante e per la produzione di sapone (Miyazawa *et al.*, 2002). Al contrario *Diplotaxis tenuifolia* è presente naturalmente sia in aree coltivate che non coltivate, su terreni sabbiosi e calcarei, ai bordi delle strade, in aree abbandonate e nelle fessure delle rocce (Bianco, 1995). Presenta fiori gialli e foglie seghettate e può essere coltivata con successo in ambienti ostili; inoltre, la rucola selvatica è considerata una pianta alofila e può essere potenzialmente utilizzata come coltura vegetale per l'agricoltura salina (un particolare tipo di agricoltura effettuato a livello di terreni caratterizzati da un'elevata salinizzazione) (de Vos *et al.*, 2013).

Solitamente, ci si riferisce alla *Eruca vesicaria* subsp. *sativa* semplicemente come *Eruca sativa*. Il genere *Eruca* è caratterizzato da un'elevata diversità genetica, tanto che la piattaforma Med-Checklist (un inventario delle piante vascolari dei paesi mediterranei) ne riconosce quattro specie (Long *et al.*, 2008): *Eruca vesicaria*, *Eruca loncholoma*, *Eruca pinnatifida*, *Eruca setulosa*. *Eruca vesicaria* subsp. *sativa*, assieme a tutte le altre specie, sono piante diploidi contenenti undici paia di cromosomi (Tabella 3).

**Tabella 3** – Specie di rucola, ploidia, aree geografiche di origine, secondo la piattaforma Med-Checklist (Long *et al.*, 2008)

Nome della specie	Ploidia	Origine geografica
<i>Eruca vesicaria</i>	2n = 22	Algeria, Turchia, Spagna, Bulgaria, Francia, Grecia, Cipro, Israele, Italia, Libia, Libano, Siria, Portogallo, Marocco.
<i>Eruca loncholoma</i>		Algeria, Spagna, Marocco
<i>Eruca pinnatifida</i>		Algeria, Spagna, Marocco, Tunisia
<i>Eruca setulosa</i>		Algeria, Marocco

#### 1.4.2 Coltivazione

Storicamente, *Eruca sativa* è sempre stata coltivata nei paesi e nelle regioni confinanti con il Mar Mediterraneo, e il suo uso può essere fatto risalire all'epoca romana. Inizialmente, si credeva che tale pianta avesse un effetto afrodisiaco, tanto che tale proprietà viene citata anche nei testi antichi (Hall *et al.*, 2012), anche se al giorno d'oggi non esistono ancora

evidenze scientifiche che confermino tale teoria. La distribuzione della pianta copre l'Europa meridionale, il Nord Africa, l'Iran, l'India e il Pakistan, ed è tradizionalmente coltivata come coltura invernale nelle aree più aride. Nel corso dell'evoluzione ha sviluppato un sistema radicale rapido ed efficiente ed è in grado di resistere anche a condizioni di siccità particolarmente spiccata. Tale proprietà la rende un alimento particolarmente importante nelle zone più aride (Garg & Sharma, 2014). Le foglie di rucola, che possono essere utilizzate in insalata oppure come guarnizione, vengono vendute soprattutto a livello del mercato ortofrutticolo fresco, dove tale coltura sta acquisendo un'importanza significativa anche dal punto di vista economico (Hall *et al.*, 2012). In India e Pakistan, le specie afferenti al genere *Eruca* vengono utilizzate come colture oleaginose e foraggere; infatti, le radici, i fiori e i semi vengono consumati e lavorati in modo molto simile a come la senape viene lavorata e utilizzata nei paesi occidentali (Garg & Sharma, 2014).

### **1.4.3 Sostanze di rilevanza nutrizionale all'interno delle foglie di rucola**

#### *1.4.3.1 Glucosinolati*

È importante caratterizzare le varietà di rucola dal punto di vista del consumatore. Si è osservata la particolare importanza dei glucosinolati (GLS) e dei prodotti derivanti dalla loro idrolisi, oltre alle sostanze flavonoliche, all'interno delle foglie di rucola. Tuttavia, occorre comprendere anche gli impatti che la lavorazione post-raccolta e le condizioni di conservazione sul contenuto e sulla disponibilità di tali sostanze. Infatti, la diversità e/o l'abbondanza di glucosinolati e altri composti fitochimici in una data varietà possono influenzare notevolmente le varie specie di rucola; inoltre, è evidente da recenti risultati che non è sufficiente caratterizzare le varietà di rucola in un singolo momento dello sviluppo, a causa della natura dinamica della biosintesi e del turnover dei glucosinolati (Bell *et al.*, 2017). Questo aspetto ha reso difficile raggiungere un consenso comune circa la composizione rappresentativa esatta dei GLS all'interno della rucola in un momento rilevante per il commercio, ovvero in corrispondenza del consumo da parte del consumatore oppure della lavorazione.

Determinare il contenuto di GLS in qualsiasi punto del ciclo di vita della rucola e del trattamento post-raccolta offre dunque una visione su come i cambiamenti metabolici possono influenzare gli effetti benefici per la salute del consumatore al momento del consumo.

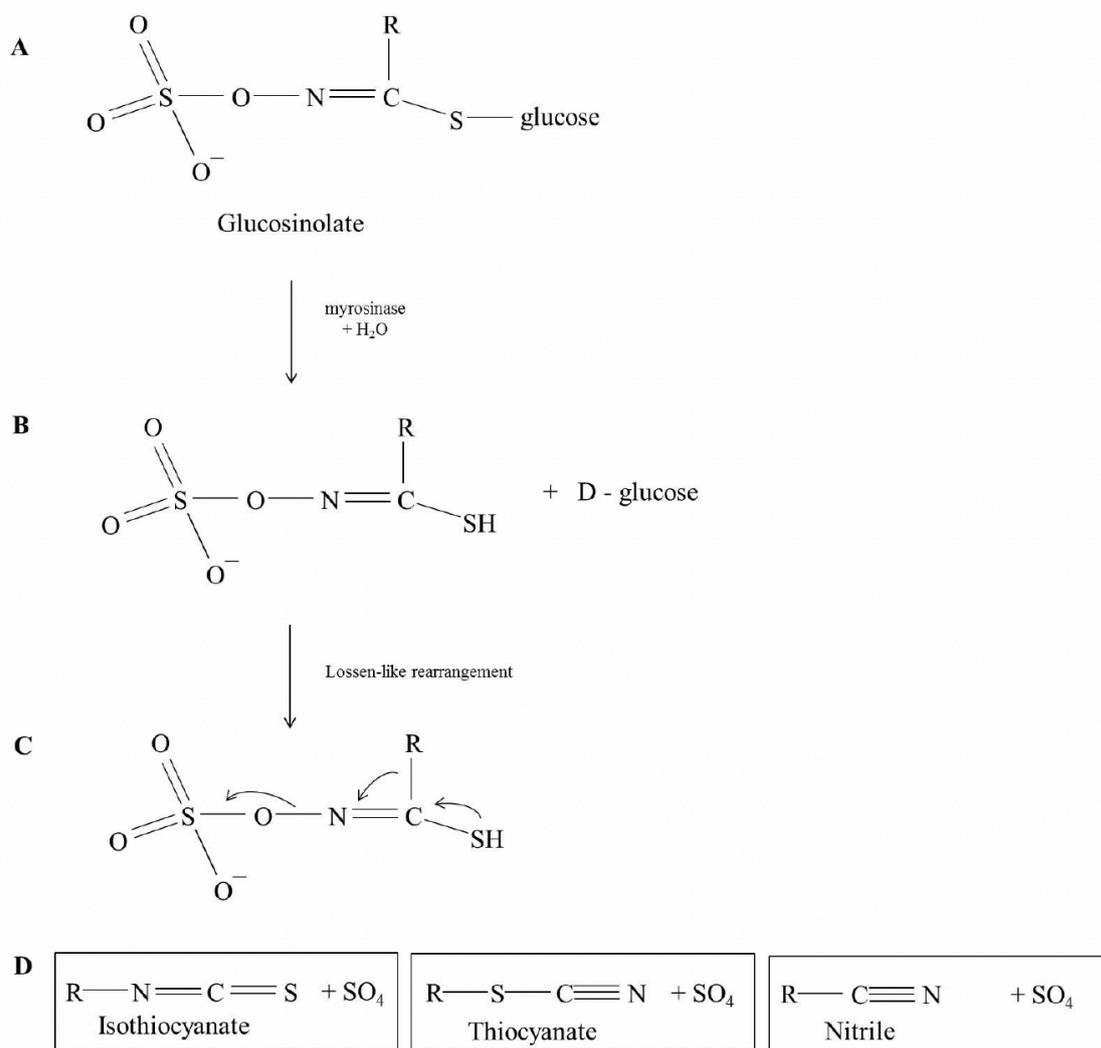
I glucosinolati sono metaboliti secondari anionici caratterizzati dalla presenza di azoto (N) e zolfo (S) e possono essere essenzialmente in due parti:

- Porzione centrale fissa, che contiene lo zolfo;
- Porzione laterale variabile, che contiene l'aglicone derivante da differenti tipi di amminoacidi precursori.

Dipendentemente dall'origine della porzione laterale variabile, i glucosinolati vengono divisi in alifatici, aromatici e indolici. I glucosinolati sono localizzati nel vacuolo delle piante e possono essere idrolizzati dall'enzima mirosinasi, presente nelle cellule vegetali e nel corredo enzimatico dei microrganismi che costituiscono la flora intestinale umana. A seguito della rottura dei tessuti causata dalla masticazione, la mirosinasi è in grado di idrolizzare i glucosinolati in  $\beta$ -D-glucosio e aglicone (Helminger *et al.*, 1983), i cui riarrangiamenti (ad es. il riarrangiamento di *Lossen*) portano alla formazione di isotiocianati, tiocianati, nitrili e solfati (Figura 6). Tutti questi composti legati al metabolismo dei glucosinolati sono responsabili del particolare aroma e odore dei vegetali a foglia appartenenti alla famiglia delle *Brassicaceae* (Chin *et al.*, 1994).

Negli ultimi anni, numerose tipologie di glucosinolati sono state isolate a partire dai semi, dai germogli e dalle foglie di varie specie di rucola. Glucorafanina, glucoerucina e mercaptobutil-glucosinolato sono largamente presenti a livello delle foglie (D'Antuono *et al.*, 2008), mentre a livello dei semi e delle radici è presente prevalentemente glucoerucina; invece, a livello dei fiori è presente principalmente la glucosativina. In *Eruca vesicaria* subsp. *sativa*, il contenuto di glucoerucina è pari a  $108 \pm 5 \mu\text{mol g}^{-1}$  di peso secco, e costituisce rispettivamente il 95% e il 79% del totale dei glucosinolati presenti all'interno dei semi e dei germogli (Barillari *et al.*, 2005). La progoitrina, l'epiprogoitrina e la glucosativina sono associate all'amarrezza e alla piccantezza, mentre l'intensità dell'aroma è inversamente correlato al contenuto di glucoalissina.

I livelli e le forme chimiche dei glucosinolati presenti all'interno della pianta sono fortemente dipendenti dalla specie e dalla varietà, nonché dalle condizioni ambientali, nutrizionali e di crescita. Alcuni studi hanno invece dimostrato che il contenuto di glucosinolati viene alterato durante la conservazione e a causa delle condizioni post-raccolta, in termini di temperatura, tempo di conservazione e intensità luminosa (Kim & Ishii, 2007). Nelle foglie di *Eruca vesicaria* subsp. *sativa*, il totale di glucosinolati è aumentato fino al terzo giorno di conservazione sia a 4°C che a 15°C, per poi diminuire (Force *et al.*, 2017). Tra i glucosinolati, la glucoerucina ha dimostrato una riduzione significativa durante la conservazione sia in *E. sativa* che in *D. tenuifolia*, mentre la glucorafanina è aumentata durante il periodo di conservazione (Jin *et al.*, 2009).



**Figura 6** – L'enzima mirosinasi catalizza l'idrolisi dei glucosinolati (A) portando alla formazione del β-D-glucosio e dell'aglicone (B). Dipendentemente dalle condizioni, l'aglicone va incontro al riarrangiamento di Lossen (C), che porta alla formazione di solfati, isotiocianati, tiocianati e nitrili (D) (Cavaiuolo & Ferrante, 2014).

In *E. sativa*, la fertilizzazione a base di azoto sotto forma di ammonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) hanno influenzato significativamente il contenuto di glucosinolati: i contenuti più elevati di GLS sono stati osservati con una fertilizzazione in cui il rapporto NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> era pari a 1, mentre i valori più bassi sono stati registrati con una fermentazione con solo NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Kim & Ishii, 2006). Nella stessa specie, le fertilizzazioni con azoto fino a 1,04 g di azoto per pianta hanno aumentato la crescita e la biomassa durante il primo mese di coltivazione, dimostrando però effetti negativi in termini di biosintesi di glucosinolati di tipo alifatico. Al contrario, i glucosinolati di tipo indolico hanno mostrato un aumento generale (Omirou *et al.*, 2012). Sono tuttavia necessari ulteriori studi al fine di chiarire quali meccanismi regolatori controllino effettivamente la preferenza verso la biosintesi di glucosinolati

alifatici e/o indolici. In ogni caso, è chiaro che l'azoto e la fertilizzazione delle piante influenzano le concentrazioni di glucosinolati, favorendo o sfavorendo la biosintesi e il catabolismo delle suddette sostanze. Una nutrizione equilibrata, quindi, potrebbe essere utile per ottimizzare il contenuto di glucosinolati.

#### 1.4.3.2 Altri nutrienti e composti antiossidanti

Oltre ai glucosinolati, la rucola contiene elevati livelli di fibre, minerali nutrizionalmente rilevanti e altre sostanze come acido ascorbico, flavonoidi e carotenoidi, ovvero sostanze antiossidanti. I composti antiossidanti derivanti dalle piante presentano attività inibitorie nei confronti dei radicali liberi e sono altamente presenti a livello dei fiori e delle foglie in risposta allo stress ossidativo e ai processi degenerativi di senescenza (Cavaiuolo *et al.*, 2013). Le quantità di proteine e minerali nelle foglie e nei semi delle specie di rucola sono state riportate in pochi studi; inoltre, è stato dimostrato che le foglie di rucola presentano concentrazioni più elevate di fibre grezze, minerali totali e carboidrati, mentre i semi sono più ricchi di proteine grezze e grassi. Tra tutti gli elementi, Mg, Ca, Fe e K sono i minerali più abbondanti nelle foglie, mentre Ca, Na, P e Cr prevalgono nei semi (Bukhsh *et al.*, 2007). Tra i carboidrati presenti a livello delle foglie, il glucosio è lo zucchero predominante, rappresentando più del 70% dei carboidrati totali (Jirovetz *et al.*, 2002). Tra le verdure a foglia appartenenti alla famiglia delle *Brassicaceae*, la rucola è quella che presenta il contenuto più elevato di acido ascorbico, con quantità prossime a 110 mg/100 g di foglie (Cavaiuolo & Ferrante, 2014). Tuttavia, il contenuto di acido ascorbico è influenzato dal periodo di semina della rucola e dalle condizioni di raccolta, in particolare per quanto riguarda luce e temperatura. Infatti, diversi studi hanno mostrato che il contenuto di acido ascorbico è maggiore quando la rucola viene seminata in autunno rispetto a quando viene seminata in primavera, con valori registrati pari a rispettivamente 58,13 mg/100 g di peso secco e 57,41 mg/100 g di peso secco (Esiyok *et al.*, 2006). Questi risultati sono in accordo con i lavori di Francke *et al.* (2004) e di Fraszczak *et al.* (2006), dov'è stato riscontrato che giornate più corte e temperature più basse (tipiche della stagione autunnale) hanno determinato un più elevato contenuto di acido ascorbico nel prodotto finito.

Semi, radici, foglie e fiori di *E. sativa* e *D. tenuifolia* presentano profili diversi di flavonoidi (Bennet *et al.*, 2006). Queste sostanze sono state quantificate in tutti i tessuti della rucola, soprattutto a livello delle foglie, dove sono stati riscontrati contenuti variabili da 4,68 a 19,81 g per kg di peso secco (Pasini *et al.*, 2011). I principali flavonoidi sono quelli derivanti dalla quercetina, come la quercetina metossicafeoyl triglucoside, la quercetina

caffeoyl triglucoside, acido metossicafeico e dicaffeico, composti isolati per la prima volta nella rucola selvatica (*D. tenuifolia*) (Martinez-Sanchez *et al.*, 2007). Al contrario, i derivati del kaempferolo sono il principale gruppo di fenoli presenti all'interno delle foglie di *E. sativa*, variando da 8,47 a 26 g per kg di sostanza secca (77%-88% dei fenoli totali). Il principale fenolo è il kaempferolo-3,4-diglucoside, seguito da isoramnetina (Pasini *et al.*, 2011).

Tra i carotenoidi, la luteina e il  $\beta$ -carotene sono quelli maggiormente presenti a livello delle foglie di rucola. Alcuni studi hanno determinato un contenuto di luteina pari a  $5,82 \pm 0,51$  mg per 100 grammi di peso fresco nella rucola selvatica, mentre pari a  $7,44 \pm 0,78$  mg per 100 grammi di peso fresco nella *Eruca sativa*; invece, il  $\beta$ -carotene è stato quantificato pari a  $7,01 \pm 1,04$  mg per 100 grammi di peso fresco nella rucola selvatica e pari a  $7,96 \pm 1,43$  mg per 100 grammi di peso fresco nella *E. sativa* (Moser *et al.*, 2010).

Per quanto riguarda i pigmenti, la clorofilla è logicamente quella più abbondante, con livelli variabili da  $359,62 \pm 48,16$  mg/100 g di peso fresco in *E. sativa* a  $303,23 \pm 36,67$  mg/100 g di peso fresco in *D. tenuifolia* (Znidarcic *et al.*, 2011).  $\beta$ -criptoxantina, violaxantina e neoxantina sono state quantitativamente identificate in *E. sativa* (Jirovetz *et al.*, 2002).

A livello dei semi di rucola, l'analisi fitochimica ha rilevato la presenza di alcaloidi, glicosidi, flavonoidi, composti fenolici, acido ascorbico, saponine e tannini. Inoltre, le aliquote dei principali componenti sono risultate pari a: 6,02%  $\pm$  0,5% di umidità; 27,67%  $\pm$  1,8% di grassi; 29,83%  $\pm$  0,8% di proteine; 2,60%  $\pm$  0,5% di ceneri; 3,09%  $\pm$  0,4% di carboidrati e 1,60%  $\pm$  0,7% di fibra (Gulfraz *et al.*, 2011). Le analisi gas-cromatografiche hanno invece permesso di rilevare la composizione relativa degli acidi grassi a livello della frazione grassa dei semi di rucola; nello specifico, l'acido erucico rappresenta il 51,2% del totale, l'acido oleico il 15% e l'acido linoleico il 6,9% (Brock *et al.*, 2006). Inoltre, le analisi spettrofotometriche hanno rilevato elevati livelli di calcio e potassio, con valori rispettivamente pari a 1186 mg/100 g di seme intero e 1116 mg/100 g di seme intero (Flanders & Abdulkarim, 1985). La presenza di nutrienti e acidi grassi suggerisce che i semi possano essere utilizzati per scopi alimentari o comunque all'interno del comparto mangimistico.

#### **1.4.4 L'impatto dei composti della rucola sulla salute umana**

Gli effetti positivi e benefici sulla salute umana dei composti fitochimici della rucola sono stati riportati da numerosi studi. I glucosinolati, gli isotiocianati e gli altri composti antiossidanti non solo sono in grado di svolgere un ruolo difensivo nei confronti dei predatori

naturali della rucola (erbivori, insetti e microrganismi), ma anche di proteggere contro le malattie degenerative che colpiscono gli animali superiori, attraverso la regolazione degli enzimi che metabolizzano i composti carcinogeni (Quattrini *et al.*, 2008). In particolare, gli isotiocianati inducono l'attività del sulforafano, ovvero un composto solforato in grado di proteggere dallo stress ossidativo (Fahey *et al.*, 1999).

Le attività antimicrobiche degli estratti delle foglie, delle radici e dell'olio ottenuto dai semi di *Eruca sativa* sono state dimostrate, nello specifico contro i batteri Gram-negativi (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*) e Gram-positivi (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*) (Gulfraz *et al.*, 2011). Nello specifico, l'olio ottenuto dai semi ha mostrato il più elevato tasso di inibizione sia nei confronti dei Gram-positivi che dei Gram-negativi, sebbene *K. pneumoniae* e *S. epidermidis* fossero meno sensibili. Quest'inibizione era principalmente dovuta agli acidi erucico e oleico, nonché ad alcuni isotiocianati come il bis-isotiocianato butil-disolfuro. Un altro esempio di composto antimicrobico è stato ottenuto da *D. tenuifolia*, dove l'erucina è stata riscontrata come il composto più efficace contro i funghi patogeni post-raccolta (Rodriguez *et al.*, 2006).

In generale, *E. sativa* ha mostrato attività antiulcera, antiinfiammatoria, epatoprotettiva e anticancerogena. Ad esempio, l'estratto di foglie di rucola hanno dimostrato capacità di ridurre la secrezione basale di acido gastrico, la sua acidità titolabile e l'ulcerazione gastrica (Alqasoumi *et al.*, 2009).

Il lavoro di Melchini *et al.* (2009) ha dimostrato gli effetti antiproliferativi dell'erucina estratta da *E. sativa* e *D. tenuifolia* su cellule di carcinoma polmonare umano. Sia l'erucina che il sulforafano hanno dimostrato il loro coinvolgimento nella prevenzione e nella terapia della psoriasi e delle malattie infiammatorie della pelle tramite la regolazione delle citochine correlate alla psoriasi (Yehuda *et al.*, 2012).

Oltre agli isotiocianati, anche altri fitochimici derivanti dalla rucola sono stati segnalati per la loro capacità anticancerogena. Ad esempio, gli estratti polifenolici di *D. tenuifolia* hanno dimostrato effetti citotossici e antiproliferativi nei confronti delle cellule di carcinoma del colon umano (Jakubikova *et al.*, 2005). Infatti, nello studio di Jakubikova *et al.* (2005), gli estratti polifenolici di rucola hanno dimostrato la capacità di ridurre la vitalità delle cellule di carcinoma fino al 71%.

## 1.5 Batteri lattici

I batteri lattici sono importanti microrganismi che producono principalmente acido lattico come sottoprodotto durante le attività metaboliche. Essi ricoprono ruoli particolarmente importanti nei settori agricolo, alimentare e clinico. La fermentazione attraverso i batteri lattici è una delle tecniche più convenzionali e riconosciute al fine di aumentare la *shelf-life* degli alimenti. Poiché tali microrganismi sono fondamentali in molte applicazioni, l'industria alimentare ricerca continuamente ceppi con caratteristiche sempre migliori, al fine di incrementare la qualità sensoriale del prodotto. Durante la fermentazione, i batteri lattici sono in grado di produrre acidi organici e altri metaboliti che migliorano il sapore del prodotto e ne migliorano la conservazione, inibendo sia microrganismi patogeni che deterioranti. Il settore lattiero-caseario, in particolare, beneficia immensamente dell'uso dei batteri lattici come colture starter, le quali sono in grado di modificare drasticamente la qualità nutrizionale e sensoriale del prodotto finito. L'uso dei batteri lattici per la conservazione degli alimenti è definito "bio-conservazione" e riguarda per lo più l'applicazione delle batteriocine, ovvero sostanze antimicrobiche in grado di inibire la crescita di batteri patogeni e deterioranti.

I batteri lattici sono microrganismi Gram-positivi, non sporigeni, aerotolleranti, che producono acido lattico come uno dei principali prodotti della fermentazione, utilizzando carboidrati durante il processo fermentativo. Questi batteri producono acido lattico come prodotto finale del catabolismo dei carboidrati e producono anche sostanze organiche che contribuiscono al sapore, alla consistenza e all'aroma, conferendo caratteristiche organolettiche uniche (Quinto *et al.*, 2014). Orla Jensen (1919) ha pubblicato per la prima volta un trattato che ha gettato le basi per la classificazione dei batteri lattici, basato principalmente su fattori che includevano le caratteristiche di fermentazione del glucosio, la morfologia cellulare, la capacità di utilizzare gli zuccheri e l'optimum termico ottimale di crescita. Questo sistema di classificazione riconosceva solamente quattro generi di batteri lattici: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*. Successivamente, i batteri lattici vennero classificati in diverse specie/generi in base alle loro caratteristiche di produzione di acidi attraverso la fermentazione degli zuccheri e la loro crescita a temperature specifiche (Parvez *et al.*, 2006). Inoltre, i batteri lattici possono essere classificati anche come microrganismi omofermentativi oppure eterofermentativi in base alla loro capacità di fermentare i carboidrati. I batteri lattici omofermentativi, come *Lactococcus* e *Streptococcus*, sono in grado di produrre due molecole di lattato a partire da una molecola di glucosio, mentre i batteri lattici

eterofermentativi come *Leuconostoc*, *Weissella* e alcuni *Lactobacillus* generano lattato, etanolo e anidride carbonica a partire da una molecola di glucosio (Salminen *et al.*, 1998). L'approccio convenzionale alla classificazione dei batteri lattici era basato su caratteristiche fisiologiche e biochimiche; tuttavia, più recentemente, la caratterizzazione molecolare è diventata uno strumento importante per la classificazione e l'identificazione dei batteri lattici. La caratterizzazione molecolare è effettuata attraverso l'amplificazione di segmenti casuali di DNA (RAPD, *Random Amplification of Polymorphic DNA*), ma anche attraverso il sequenziamento del gene codificante per l'rRNA 16S (Sharma *et al.*, 2019).

### **1.5.1 Reservoir naturale dei batteri lattici**

I batteri lattici sono un gruppo batterico ubiquitario ampiamente diffuso in natura; nel corso della storia, l'ecologia dei batteri lattici ha subito una transizione, a partire da un habitat prevalentemente incentrato sul suolo e sulle piante, per arrivare fino all'intestino dei mammiferi. L'intestino dei mammiferi è un serbatoio di circa 100 trilioni di microrganismi definito microbiota (Hooper & Macpherson, 2010). Il microbiota colonizza il tratto gastrointestinale ed è essenziale per la salute in quanto migliora il metabolismo, la digestione e potenzia il sistema immunitario. Il microbiota è ben adattato all'intestino dei mammiferi e si basa principalmente su tre fattori che includono: adesione alle cellule intestinali, resistenza alle barriere dell'ospite e la fermentazione dei substrati presenti nell'intestino (Lebeer *et al.*, 2008). L'adesione dei batteri lattici alle cellule intestinali è facilitata dall'azione della peristalsi, associata alla lubrificazione fornita dalle mucine che proteggono e rivestono le cellule epiteliali intestinali. Questa coordinazione assicura un'incrementata capacità di adesione dei batteri lattici alle cellule intestinali. Le mucine intestinali sono dunque molto importanti, in quanto la loro produzione continua impedisce e previene l'adesione dei batteri patogeni alle cellule epiteliali intestinali, promuovendo così l'attività dei batteri intestinali naturalmente presenti.

### **1.5.2 Utilizzo dei batteri lattici negli alimenti fermentati**

I batteri lattici rivestono un ruolo cruciale in numerosi processi di fermentazione degli alimenti, migliorando significativamente la qualità del prodotto e aumentando l'attrattiva per i consumatori. Essi sono fondamentali nello sviluppo di molti alimenti tradizionali, conferendo loro caratteristiche uniche e offrendo benefici significativi per la salute, in particolare nel mantenimento di un sistema gastrointestinale sano. Tra i prodotti alimentari fermentati derivati dai batteri lattici si possono citare il formaggio, il kefir, lo yogurt, i

crauti, il tofu, il kumis, i salumi e varie bevande. I batteri lattici principalmente presenti nel latte afferiscono a generi come *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium* e *Bifidobacterium*, che vivono in nicche ecologiche simili e sono in grado di interagire simbioticamente. Esistono circa 400 prodotti lattiero-caseari tradizionali e fermentati, ognuno caratterizzato da una popolazione microbica diversificata, che contribuisce alle loro peculiari proprietà sensoriali.

### 1.5.3 Batteri lattici utilizzati per la fermentazione dell'estratto di rucola

#### 1.5.3.1 *Lactiplantibacillus plantarum* 299V

*Lactiplantibacillus plantarum* 299V è un ceppo probiotico che afferisce al *phylum* Firmicutes e appartiene al gruppo dei batteri lattici. Si trova comunemente coinvolto nelle fermentazioni lattiche di materie prime di origine vegetale, come i crauti, le olive in salamoia, cetriolini salati e impasti acidi. È stato dimostrato che questo ceppo è in grado di colonizzare la mucosa intestinale umana quando somministrato per via orale; infatti, il microrganismo è in grado di tollerare bene il basso pH dello stomaco e quindi transitare fino all'intestino, dove può influenzare il microbiota intestinale. Inoltre, il ceppo è in grado di resistere alle condizioni di pH più elevate presenti a livello del duodeno e dovute alla presenza dei sali biliari. Queste caratteristiche lo rendono dunque particolarmente interessante dal punto di vista della produzione di alimenti probiotici (Kazmierczak-Siedlecka *et al.*, 2020).

È stato dimostrato che *Lactiplantibacillus plantarum* 299V è in grado di influenzare la sopravvivenza di altri microrganismi, patogeni e non, presenti a livello dell'intestino, quando viene somministrato per via orale. Johansson *et al.* (1993) hanno infatti dimostrato che a seguito del consumo di una miscela di batteri lattici (incluso *L. plantarum* 299V), i livelli di LAB a livello delle feci umane e nella mucosa del digiuno aumentano. Inoltre, la quantità di clostridi solfito riduttori, batteri anaerobi Gram-positivi e batteri anaerobi Gram-negativi a livello della mucosa rettale diminuisce significativamente dopo la somministrazione del formulato contenente *L. plantarum* 299V.

*L. plantarum* 299V è inoltre in grado di influenzare l'immunità innata del tessuto linfoide associato all'intestino, noto anche come GALT (acronimo dell'inglese *Gut-Associated Lymphoid Tissue*), aumentando sia la trascrizione dei geni che codificano le mucine (MUC2 e MUC3) che la loro secrezione a livello delle cellule mucipare caliciformi. Le mucine sono glicoproteine che forniscono protezione alle superfici mucose intestinali, interrompendo la colonizzazione da parte di potenziali patogeni e influenzando la replicazione virale. Proprio

grazie a questi aspetti, *L. plantarum* 299V può inibire indirettamente l'adesione di *E. coli* enteropatogeni alle cellule epiteliali intestinali (Mack *et al.*, 1999). L'attività repressiva di *L. plantarum* 299V è anche associata alla produzione di composti inibitori la crescita, come gli acidi organici. Johansson *et al.* (1993) hanno dimostrato che la somministrazione di tale ceppo ha contribuito ad aumentare significativamente la concentrazione fecale totale di acido acetico e propionico. Trattandosi entrambi di acidi grassi a corta catena, sono in grado di influenzare il pH locale dell'intestino, controllando quindi la proliferazione dei patogeni. Nello studio appena citato, come effetto della produzione di acidi organici è stata osservata una diminuzione della quantità di clostridi solfito riduttori, mentre i numeri di anaerobi e aerobi totali è rimasto invariato. Ciò suggerisce che *L. plantarum* 299V è in grado di influenzare l'attività metabolica di altri batteri presenti nel colon e può inibire la crescita di batteri potenzialmente patogeni come *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter cloacae* ed *Enterococcus faecalis*.

Alcuni studi confermano il potenziale ruolo di *Lactiplantibacillus plantarum* 299V nella prevenzione dalle infezioni a carico di *Clostridium difficile*. Infatti, quest'ultimo è in grado di causare fenomeni di diarrea tra i pazienti che sono soggetti all'infezione da parte di tale microrganismo e sono sottoposti ad una cura antibiotica. Kujawa-Szewieczek *et al.* (2015) hanno esaminato l'effetto dell'uso routinario di *Lactiplantibacillus plantarum* 299V nella prevenzione delle infezioni da *C. difficile*. Questo studio ha incluso 3533 pazienti ospedalizzati, ai quali è stata somministrata una capula di *Sanprobi IBS®* ( $10^9$  UFC di *L. plantarum* 299V) al giorno. I pazienti che hanno ricevuto tale trattamento hanno mostrato una significativa diminuzione dell'incidenza della patologia. Questo studio suggerisce che l'uso di tale ceppo probiotico durante il trattamento con antibiotici può prevenire l'insorgenza della patologia stessa.

Uno studio ha invece confermato l'efficacia di *Lactiplantibacillus plantarum* 299V contro i sintomi della sindrome dell'intestino irritabile (Nobaek *et al.*, 2000). Tale patologia è un disturbo gastrointestinale che porta ad una sintomatologia caratterizzata da dolore addominale, flatulenza e irregolarità dell'intestino; uno dei fattori che contribuisce maggiormente all'aumento dei sintomi di tale patologia sono le alterazioni del microbiota intestinale. I risultati dello studio hanno dimostrato che l'assunzione di *L. plantarum* 299V attraverso una bevanda fermentata a base di rosa canina, contenente  $5 \cdot 10^7$  UFC/mL del ceppo, ha permesso di ridurre i sintomi di dolore addominale e flatulenza. Questi benefici sono stati attribuiti alla capacità del probiotico di modulare la microflora intestinale, ridurre

l'infiammazione e migliorare la funzione della barriera intestinale. Inoltre, è stato osservato che il ceppo può influenzare positivamente la motilità intestinale, contribuendo così a ridurre i sintomi associati alla sindrome dell'intestino irritabile.

#### 1.5.3.2 *Pediococcus acidilactici* IRZ12B

*Pediococcus acidilactici* è una specie appartenente al gruppo dei batteri lattici e si caratterizza principalmente per la tolleranza nei confronti degli acidi e per il metabolismo strettamente fermentativo (omofermentativo), con produzione di acido lattico come principale prodotto (Holzapfel *et al.*, 2006). Questa specie ha attirato particolare attenzione per la sua capacità di produrre agenti antimicrobici, come le pediocine, ovvero batteriocine in grado di inibire la crescita di microrganismi patogeni e deterioranti, come *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Inoltre, è stato scoperto che alcuni ceppi di tale specie sono in grado di prevenire la colonizzazione da parte di patogeni come *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Clostridium difficile* ed *Escherichia coli* a livello dell'intestino tenue, suggerendo il loro potenziale uso sotto forma di integratori probiotici.

È stato inoltre dimostrato che alcuni ceppi di *Pediococcus acidilactici* sono in grado di ridurre i livelli di colesterolo sierico e migliorare la digeribilità dei nutrienti; inoltre, è stato provato che altri ceppi sono in grado di ridurre i trigliceridi a livello del siero inibendo l'assorbimento dei grassi e migliorando simultaneamente la degradazione e il metabolismo dei grassi. Tutte queste proprietà rendono *P. acidilactici* un probiotico promettente, suscitando sempre più attenzione su tale specie. Tali attività sono state riscontrate anche nel caso di *P. acidilactici* IRZ12B, grazie alla presenza di geni associati a tale attività all'interno del genoma del microrganismo, i quali codificano proteine associate alla membrana che possono legare le molecole di colesterolo e favorirne l'assunzione all'interno della cellula batterica (Lee *et al.*, 2010). Inoltre, lo studio genomico condotto su *P. acidilactici* IRZ12B ha rivelato l'assenza di caratteristiche negative come i geni di virulenza e i geni di antibiotico-resistenza trasmissibili. I risultati delle analisi genetiche, assieme ai risultati dei test fenotipici, rendono *Pediococcus acidilactici* IRZ12B un promettente candidato probiotico da considerare per un possibile utilizzo nella produzione di nuovi alimenti funzionali (Pakroo *et al.*, 2022).

#### 1.5.3.3 *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG

*Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (LGG), conosciuto anche come *Lactobacillus rhamnosus* prima della riclassificazione del genere *Lactobacillus*, fu il primo ceppo afferente a tale

genere ad essere brevettato nel 1989, grazie alla sua capacità di sopravvivere alle condizioni acide dello stomaco, in un mezzo contenente bile e ad aderire agli enterociti. Ulteriormente, *L. rhamnosus* GG è in grado di produrre un biofilm che è in grado di proteggere meccanicamente la mucosa intestinale, oltre ad altri elementi solubili benefici per l'intestino, migliorando la sopravvivenza delle cellule intestinali, riducendo l'apoptosi dell'epitelio intestinale e preservando l'integrità citoscheletrica. *L. rhamnosus* GG è un batterio non sporigeno, non motile, eterofermentante facoltativo, anaerobico e catalasi negativo (Liptakova *et al.*, 2008). È stato dimostrato, inoltre, che *L. rhamnosus* GG è in grado di resistere in ambienti acidi, come il tratto gastrointestinale, il che è di fondamentale importanza per la sua efficacia dal punto di vista probiotico. Il ceppo è associato a numerosi benefici per la salute, tra cui la prevenzione e il trattamento delle infezioni gastrointestinali e la diarrea, grazie alle sue proprietà antimicrobiche. Di conseguenza, vari studi si sono concentrati sull'inclusione di GG all'interno di prodotti alimentari fermentati e non fermentati, come yogurt, lattici fermentati, latte, bevande a base di frutta, condimenti e formaggi.

Il ceppo è stato utilizzato in diversi casi grazie ai suoi effetti benefici per la salute, soprattutto per quanto riguarda l'efficacia contro le infezioni e contro le diarree causate dalla somministrazione di antibiotici.

L'elevata persistenza del microrganismo a livello dell'intestino è considerata un aspetto di rilevante importanza per *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG. Tale capacità è attribuita a delle appendici a livello della superficie cellulare del batterio, definite pili. Inoltre, il batterio è in grado di produrre esopolisaccaridi, utili per l'adesione intestinale.

## **1.6 Scopo della tesi**

Lo scopo della presente tesi è quello di capire e investigare le potenzialità legate all'uso di tre ceppi batterici probiotici in una matrice vegetale come la rucola fresca. Nello specifico, uno degli obiettivi principali è quello di mettere a punto un trattamento termico che permetta di ridurre ad un livello accettabile la carica microbica indigena in modo tale da poter utilizzare un inoculo microbico adeguato e allo stesso tempo prevenire la degradazione delle sostanze nutrizionalmente rilevanti presenti all'interno della rucola. Inoltre, è risultato di particolare importanza investigare la capacità dei tre ceppi microbici probiotici di crescere all'interno di un substrato vegetale non solitamente utilizzato a scopo fermentativo, il che rappresenta una valida prospettiva per il futuro di tale settore e per mettere a punto integratori alimentari probiotici e postbiotici totalmente vegetali.

Inoltre, grazie all'analisi del contenuto di polifenoli totali e del potere antiossidante, è stato possibile capire come la fermentazione sia in grado di influenzare i principali composti presenti a livello della rucola fresca e come questi possano influenzare positivamente la salute del consumatore.

## 2 MATERIALI E METODI

### 2.1 Materia prima

La rucola utilizzata per l'esperimento è stata acquistata settimanalmente fresca e non lavata presso un banco ortofrutticolo del mercato rionale di Legnaro (PD). Nello specifico, la rucola utilizzata è stata coltivata presso l'azienda agricola "La Marostegana" (Piazzola sul Brenta (PD), Italia).

### 2.2 Ottimizzazione del trattamento termico

Le foglie fresche di rucola sono state frullate nel frullatore Blendforce glass (Moulinex, Écully, Francia), diluite 10% p/v in acqua e sottoposte a tre differenti trattamenti termici:

- 65°C per 15 minuti;
- 70°C per 15 minuti;
- 70°C per 10 minuti.

Tali trattamenti termici sono stati condotti all'interno di un bagnetto termostato da laboratorio e sono stati seguiti da un raffreddamento tempestivo in ghiaccio.

I campioni di rucola prima e dopo i trattamenti termici sono stati analizzati su piastre di *Plate Count Agar* (PCA) (Merck, Darmstadt, Germania) con le tecniche *microdrop* e per inclusione (*pour plate*). Le piastre sono state incubate a 30°C per 48 ore. Tutte le analisi dei campioni sono state effettuate in triplicato.

### 2.3 Preparazione dell'estratto di rucola

Il primo passaggio nella preparazione dell'estratto di rucola a partire dalla materia prima fresca riguarda il processo di triturazione meccanica di quest'ultima. Per il primo step di preparazione, condotto all'interno del frullatore Moulinex Blendforce Glass, sono state pesate acqua e rucola in rapporto pari a 1:3 (70 mL di acqua ogni 200 g di rucola). L'acqua è necessaria affinché la rucola non si riscaldi troppo durante il processo di triturazione e per favorire l'ottenimento di un pesto omogeneo. Nello specifico, tutta la rucola è stata inserita all'interno del frullatore, mentre l'acqua è stata gradatamente aggiunta man mano che il processo di triturazione avveniva (Figura 7). Questo processo è di fondamentale importanza non solo per ottenere un estratto liquido dove inoculare i ceppi microbici, ma anche per aumentare la resa in estrazione di componenti nutrizionali attraverso l'aumento della superficie di scambio della pianta.

Successivamente, il pesto ottenuto è stato sottoposto al trattamento termico scelto di 70°C per un tempo di 10 minuti. Al termine del processo di pastorizzazione, il pesto di rucola è stato raffreddato tempestivamente in ghiaccio.

Successivamente, il pesto di rucola è stato sottoposto ad un passaggio attraverso l'estrattore alimentare Estraggo Pro (Siquir Salute S.r.l., Vigonza, Italia), in grado di separare minuziosamente la porzione solida da quella liquida di differenti matrici vegetali. Il risultato ottenuto è stato un estratto di rucola liquido e caratterizzato da un colore verde intenso brillante.

Una parte di estratto di rucola, non destinata alla fermentazione, è stata sottoposta ad una doppia centrifugazione (Neya 16 R, Bormac, Carpi, Italia) a 5300 rpm per 10 minuti, al fine di separare la porzione più solida dal sopranatante liquido e limpido. Quest'ultimo è stato conservato attraverso congelamento a -20°C al fine di osservarne successivamente le differenze rispetto al sopranatante ottenuto a seguito del processo di fermentazione.



*Figura 7* – Processo di triturazione della rucola all'interno del frullatore Moulinex Blendforce Glass.

## 2.4 Ceppi batterici

Per il processo di fermentazione, i ceppi batterici probiotici *Lactiplantibacillus plantarum* 299V, *Pediococcus acidilactici* IRZ12B e *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG sono stati prelevati da stock congelato a -80°C presso il Dipartimento di Agronomia, Alimenti, Risorse Naturali, Animali e Ambiente (DAFNAE), situato presso il campus di Agripolis dell'Università degli Studi di Padova, Legnaro (PD). In seguito a coltivazione in brodo MRS (Merck, Darmstadt, Germania), le colture sono state sottoposte a isolamento su piastra, al fine di individuare le singole colonie. Il preinoculo di ciascun ceppo è stato preparato stemperando una colonia singola in brodo MRS e incubando per 18 ore. Successivamente, la coltura è stata inoculata nell'estratto di rucola.

## 2.5 Prove di fermentazione

L'estratto acquoso di rucola è stato inoculato separatamente con *Lactiplantibacillus plantarum* 299V e *Pediococcus acidilactici* IRZ12B a concentrazione di  $10^5$  UFC/mL e con *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG a concentrazione di  $10^6$  UFC/ml. Tali concentrazioni degli inoculi sono state standardizzate in modo che fossero circa dieci (nel caso dei primi due ceppi) o cento (nel caso dell'ultimo ceppo) volte maggiori rispetto alla carica microbica indigena presente a seguito del trattamento termico a cui è stato sottoposto l'estratto di rucola.

L'estratto è stato incubato 24 ore a 37°C. Un tubo privo di inoculo è stato ugualmente incubato come controllo.

Al termine dell'incubazione, l'estratto fermentato è stato sottoposto due passaggi di centrifugazione a 5300 rpm per 10 minuti, al fine di separare la frazione più solida dal soprannatante più liquido e limpido, che è stato opportunamente conservato attraverso congelamento a -20°C.

## 2.6 Conte microbiche

La conta microbica degli estratti di rucola è stata eseguita attraverso semina per spatolamento (*spread plate*) su piastre di *De Man, Rogosa and Sharpe* (MRS) in due differenti momenti:

- $t_0$ : corrisponde al momento in cui viene effettuato l'inoculo con i tre differenti ceppi batterici;

- t24: corrisponde al momento in cui la fermentazione degli estratti viene interrotta a seguito dell'incubazione.

In questo modo è stato dunque possibile determinare sia l'inoculo che l'effettiva crescita a seguito dell'incubazione, verificando l'efficienza della fermentazione. Nel caso del controllo non inoculato, le conte microbiche degli estratti al tempo 0 e al tempo 24 sono state effettuate sia su terreno colturale MRS che PCA, attraverso tecniche di semina sia per spatolamento che *microdrop*. Tutte le analisi dei campioni sono state effettuate in triplicato.

## 2.7 Misura del pH

Il pH degli estratti di rucola è stato misurato prima e dopo le fermentazioni attraverso il pH-metro da banco HI5521 (Hanna Instruments Inc., Woonsocket, United States). Tutte le misurazioni dei campioni sono state effettuate in triplicato.

## 2.8 Determinazione del potere antiossidante

L'attività antiossidante dell'estratto di rucola fermentato e non fermentato è stata determinata grazie al metodo spettrofotometrico che fa uso del reagente DPPH (2,2-difenil-1-picrylidrazil), in accordo con il metodo di Brand-Williams *et al.* (1995) con alcune modifiche. 5 µl di campione sono stati miscelati con 2 mL di reagente DPPH precedentemente preparato ad una concentrazione di 25 µg/mL di etanolo 96%. Tutti i reagenti sono stati acquistati presso Merck (Darmstadt, Germania). La soluzione è stata incubata al buio per 30 minuti e successivamente filtrata con un filtro PTFE 0,22 µm (Sartorius, Göttingen, Germania), prima di procedere alla lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro Onda UV-21 (Giorgio Bormac S.r.l., Carpi, Italia) ad una lunghezza d'onda di 515 nm.

L'attività antiossidante degli estratti è stata espressa in termini di percentuale di inibizione, attraverso l'applicazione della seguente formula:

$$\% \text{ di inibizione} = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \cdot 100$$

Dove: A0 rappresenta l'assorbanza del reagente DPPH a 515 nm senza il campione all'interno; As rappresenta l'assorbanza della soluzione ottenuta dall'unione tra il reagente DPPH e il campione. Tutte le misurazioni dei campioni sono state effettuate in triplicato.

## 2.9 Quantificazione dei composti fenolici totali

Il contenuto di composti fenolici totali degli estratti di rucola è stato determinato attraverso il saggio di Folin-Ciocalteu, in accordo con Singleton *et al.* (1999), con alcune modifiche.

Il campione è stato diluito 1:10 in acqua distillata. 1 mL di campione diluito è stato unito a 0,5 mL di soluzione 1:3 di reattivo di Folin (Merck, Darmstadt, Germania) e a 5 mL di soluzione 10% di sodio carbonato in NaOH. La miscela così ottenuta è stata fatta reagire al buio a temperatura ambiente per un'ora; successivamente, si è provveduto ad effettuare una filtrazione attraverso un filtro PTFE 0,22  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Göttingen, Germania) e alla lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda pari a 650 nm. La quantificazione dei composti fenolici totali è stata effettuata utilizzando una retta di taratura ( $y = 3,6807x - 0,0004$ ;  $R^2 = 0,9956$ ) predisposta utilizzando una soluzione standard di acido gallico, con concentrazioni da 0,4 a 200  $\mu\text{g/mL}$ . La quantificazione dei composti fenolici totali è stata effettuata in triplicato e i risultati sono stati espressi come mg di acido gallico equivalenti per mL di estratto di rucola (mg GAE/mL).

## **2.10 Analisi statistica**

Le analisi sono state effettuate in triplicato e, per la valutazione statistica, i dati sono stati elaborati attraverso l'analisi della varianza (ANOVA) con test Tukey come analisi *post-hoc*, utilizzando il software GraphPad Prism 8.0.2. Le differenze sono state considerate statisticamente significative con un *p-value* < 0.05.

### 3 RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1 Ottimizzazione del trattamento termico

Come detto precedentemente, prima di procedere alle fermentazioni attraverso i tre ceppi microbici, è stato necessario mettere a punto un trattamento termico di pastorizzazione al fine di ridurre la carica microbica indigena ad un livello accettabile per l'inoculo all'interno dell'estratto di rucola. Nello specifico, la popolazione indigena iniziale è risultata pari a circa  $6 \cdot 10^7$  UFC/mL, in linea con quanto dimostrato da Mantegazza *et al.* (2024). Ciò implica la necessità di provvedere ad un opportuno trattamento termico al fine di ottenere una riduzione microbica pari ad almeno tre cicli logaritmici, fino ad arrivare ad un ordine di grandezza pari a  $10^4$  UFC/mL, sufficiente a permettere la crescita dei ceppi microbici inoculati in quantità pari a circa  $10^5$  UFC/mL. I risultati ottenuti a seguito dei vari trattamenti termici del pesto di rucola sono dimostrati nella Tabella 4.

**Tabella 4** – Popolazione microbica indigena iniziale (UFC/mL) della rucola fresca e popolazione microbica presente nell'estratto di rucola al termine delle prove di trattamento termico a differenti condizioni di tempo e temperatura.

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Conta microbica (UFC/ml)</b>
Popolazione indigena iniziale		$6,13 \times 10^7 \pm 1,31 \times 10^7$
65	15	$2,66 \times 10^4 \pm 3,51 \times 10^3$
70	10	$1,21 \times 10^4 \pm 8,55 \times 10^3$
70	15	$2,15 \times 10^4 \pm 2,19 \times 10^3$

Tutti i dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard di triplicati.

Si osserva che tutti e tre i trattamenti termici eseguiti hanno permesso di ottenere il risultato desiderato, per cui si è preferito selezionare il trattamento a 70°C per 10 minuti, in modo tale da rispettare l'approccio HTST (*High Temperature – Short Time*), che ha lo scopo di inattivare la popolazione microbica salvaguardando le sostanze di interesse nutrizionale all'interno della matrice alimentare (Indumathy *et al.*, 2022).

Il trattamento termico di un substrato vegetale può ovviamente contribuire a cambiamenti dal punto di vista chimico e nutrizionale; nello specifico, dal punto di vista dei substrati fermentativi utilizzati dai batteri lattici, come gli zuccheri, non si osservano differenze significative a seguito del trattamento termico. Infatti, N.J. Gardner *et al.* (2001) hanno messo in evidenza che i trattamenti termici di pastorizzazione (65°C per 30 minuti) e di sterilizzazione (110°C per 10 minuti) di un estratto di cavolo, carota e rapa rossa non modificano significativamente il contenuto di glucosio e fruttosio del prodotto, mantenendoli

disponibili per la successiva fermentazione da parte dei microrganismi. Dunque, si può generalmente concludere che i trattamenti termici non influiscono sui composti zuccherini all'interno degli estratti vegetali.

Per quanto riguarda le sostanze chimiche nutrizionalmente interessanti come i polifenoli, Oliveira *et al.* (2015) hanno dimostrato che le temperature di pastorizzazione pari a 75°C sono in grado di incrementare il contenuto totale di polifenoli all'interno dei succhi vegetali, il che potrebbe essere correlato ad un miglioramento dell'efficienza di estrazione di tali composti dalle matrici sottoposte a trattamento termico. È inoltre necessario affermare che la pastorizzazione è in grado di rilasciare acidi fenolici a seguito della rottura delle cellule vegetali indotta proprio dalle elevate temperature; tuttavia, tale processo potrebbe rappresentare un problema poiché la rottura delle membrane cellulari provoca anche il rilascio degli enzimi ossidativi e idrolitici che potrebbero idrolizzare i composti antiossidanti presenti nella frutta e nei vegetali (Dewanto *et al.*, 2002).

Nello studio di Dewanto *et al.* (2002), tuttavia, è stato anche dimostrato che un trattamento termico a 88°C per 2, 15 e 30 minuti sono in grado di incrementare il potere antiossidante totale di un estratto acquoso di pomodori.

### **3.2 Conte microbiche**

La Tabella 5 elenca i conteggi relativi alla popolazione microbica dei tre differenti ceppi inoculati negli estratti di rucola, al momento dell'inoculo (tempo 0) e dopo la fermentazione (tempo 24).

- *L. plantarum* 299V: a partire da un inoculo pari a  $3,43 \cdot 10^5$  UFC/mL si è passati ad una conta finale pari a  $1,75 \cdot 10^8$  UFC/mL, evidenziando quindi una crescita quasi pari a tre cicli logaritmici;
- *P. acidilactici* IRZ12B: a partire da un inoculo pari a  $3,01 \cdot 10^5$  UFC/mL si è passati ad una conta finale pari a  $2,81 \cdot 10^8$  UFC/mL, evidenziando anche in questo caso una crescita pari a circa 3 cicli logaritmici;
- *L. rhamnosus* LGG: a partire da un inoculo pari a  $6,57 \cdot 10^6$  UFC/mL si è passati ad una conta finale pari a  $1,33 \cdot 10^7$ , evidenziando una crescita prossima a mezzo ciclo logaritmico.

**Tabella 5** – Popolazione microbica (UFC/mL) nell’estratto di rucola al momento dell’inoculo (t0) e dopo la fermentazione (t24) a carico dei tre ceppi.

<b>Ceppo</b>	<b>Inoculo t0 (UFC/ml)</b>	<b>Fermentato t24 (UFC/ml)</b>
<i>L. plantarum</i> 299V	$3,43 \times 10^5 \pm 2,52 \times 10^4$	$1,75 \times 10^8 \pm 1,91 \times 10^{7b}$
<i>P. acidilactici</i> IRZ12B	$3,01 \times 10^5 \pm 7,01 \times 10^4$	$2,81 \times 10^8 \pm 8,10 \times 10^{7b}$
<i>L. rhamnosus</i> LGG	$6,57 \times 10^6 \pm 1,98 \times 10^6$	$1,33 \times 10^7 \pm 3,51 \times 10^{6c}$
Controllo MRS	<10	<10
Controllo PCA	$1,00 \times 10^4 \pm 5,00 \times 10^3$	$2,27 \times 10^7 \pm 2,44 \times 10^{7a}$

\*Controllo si riferisce ad un tubo non inoculato e incubato over night.

Tutti i dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard di triplicati.

Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0.05$ ).

Il “controllo” riportato nella Tabella 5 si riferisce ad un tubo non inoculato e incubato per 24 ore; si può osservare che, a seguito della semina su terreno MRS, non si assiste ad alcun tipo di crescita microbica da parte di batteri lattici, segno che a livello di tale matrice non sono naturalmente presenti a tale gruppo.

Nella Figura 8 è possibile notare delle differenze visive nell’estratto di rucola prima e dopo la fermentazione a carico di *P. acidilactici* IRZ12B.

I risultati ottenuti permettono di dimostrare che i ceppi microbici *L. plantarum* 299V e *P. acidilactici* IRZ12B presentano una crescita particolarmente efficiente e rapida all’interno dell’estratto di rucola, divenendo rispettivamente le specie predominanti all’interno degli estratti fermentati. Ciò permette dunque di affermare la loro potenziale efficacia come ceppi probiotici anche all’interno di matrici di tipo vegetale non comunemente utilizzate come substrato fermentativo, come nel caso della rucola. Anche Jablonska-Rys *et al.* (2016) hanno confermato il potenziale probiotico di *L. plantarum* 299V come microrganismo fermentante a livello di un substrato vegetale, nello specifico *Agaricus bisporus*, ovvero funghi champignon. In questo studio, l’inoculo iniziale di *L. plantarum* 299 V era pari a  $10^5$  UFC/g di prodotto, mentre la conta batterica al termine della fermentazione della durata di 24 ore si attestava pari a  $10^8$  UFC/g, in linea con quanto dimostrato dal presente lavoro.

In uno studio di Yang *et al.* (2018) sono stati sottoposti a fermentazione degli estratti vegetali ottenuti da mele, pere e carote, utilizzando due specifici ceppi di *Lactiplantibacillus plantarum*, nello specifico *L. plantarum* 115 (Du Pont, USA) e *L. plantarum* Vege Start 60 (Chr. Hansen, Danimarca). È stato evidenziato che i due ceppi appena riportati sono risultati in grado di crescere all’interno degli estratti vegetali, dimostrando una crescita molto rapida nelle prime 24 ore di incubazione a 37°C, passando da un inoculo pari a  $10^8$  UFC/mL ad

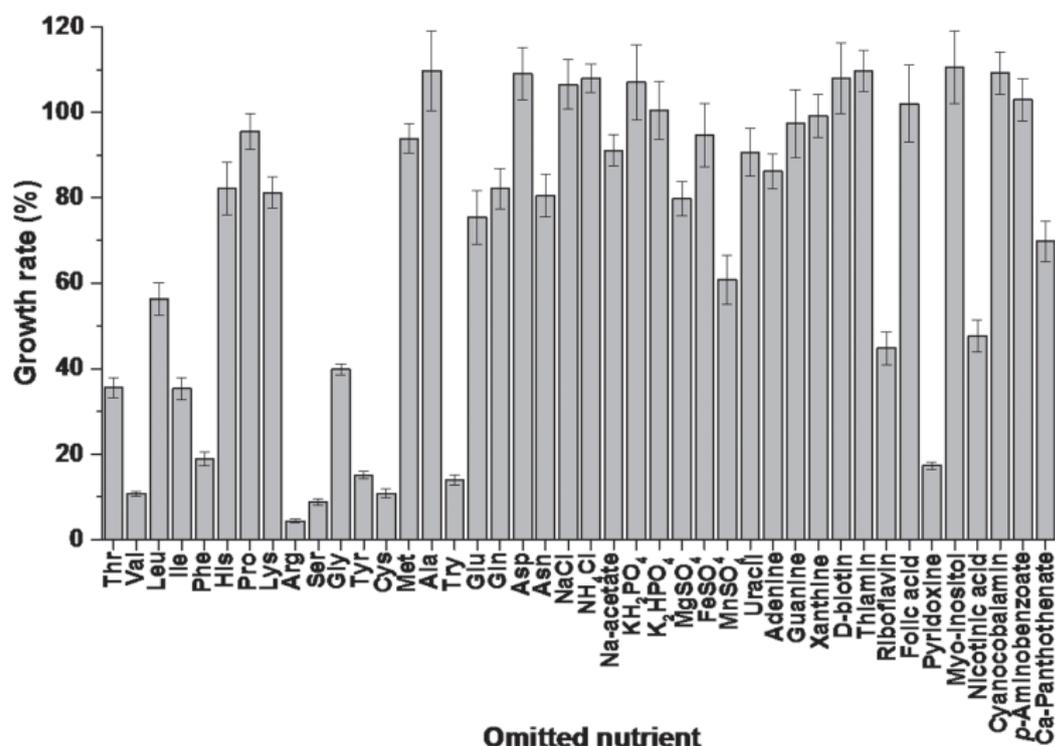
una concentrazione massima di  $10^9$  UFC/mL, per poi decrescere nei restanti giorni di fermentazione soprattutto a causa dell'accumulo di acido lattico all'interno del mezzo.

Per quanto riguarda la specie *Pediococcus acidilactici*, uno studio di N.J. Gardner *et al.* (2001) ha messo in evidenza la capacità di tale microrganismo di fermentare dei substrati vegetali, come i succhi di *Brassica oleracea*, dimostrando una capacità di crescita pari a due cicli logaritmici, in linea con quanto dimostrato dal presente studio. Nello specifico, il ceppo di *P. acidilactici* utilizzato nello studio di N.J. Gardner *et al.* (2001), inoculato nel succo di *B. oleracea* in quantità pari a circa  $10^6$  UFC/mL, ha mostrato una crescita fino a raggiungere valori pari a  $10^8$  UFC/mL, evidenziando peraltro una buona capacità di abbassamento del pH del prodotto.



**Figura 8** – Differenza visiva tra l'estratto fermentato a carico di *P. acidilactici* IRZ12B (a destra) e l'estratto non fermentato (a sinistra).

*L. rhamnosus* GG, invece, non ha dimostrato una crescita spiccata all'interno dell'estratto di rucola; ciò potrebbe essere dovuto al fatto che si tratta di un ceppo maggiormente affine ai substrati di origine animale per la fermentazione. Ad esempio, Rubio *et al.* (2013) hanno dimostrato che tale ceppo è particolarmente efficace nell'applicazione come coltura starter per la produzione di salsicce e insaccati, dove un inoculo pari a  $10^6$  UFC/g è riuscito a raggiungere valori prossimi a  $10^8$  UFC/g, evidenziando una crescita pari a 2 cicli logaritmici. Inoltre, *L. rhamnosus* GG è particolarmente utilizzato come coltura starter in prodotti insaccati tipici del nord-Europa (Klingberg *et al.*, 2005). Sun *et al.* (2019) hanno dimostrato che *L. rhamnosus* GG riesce a fermentare in tempi particolarmente lunghi quando viene utilizzato come unico ceppo fermentate. Infatti, lo studio appena citato ha dimostrato come i singoli nutrienti siano in grado di impattare sul tasso di crescita di *L. rhamnosus* GG; nello specifico, i risultati hanno dimostrato che gli amminoacidi arginina, valina, isoleucina, fenilalanina, glicina, tirosina e cisteina sono essenziali per la crescita del ceppo batterico. Invece, altri fattori come leucina, calcio, magnesio e manganese presentano un effetto stimolatorio della crescita del ceppo. La Figura 9 mostra come l'omissione di alcuni nutrienti influenzi il tasso di crescita del batterio all'interno di una matrice di origine animale come il latte.

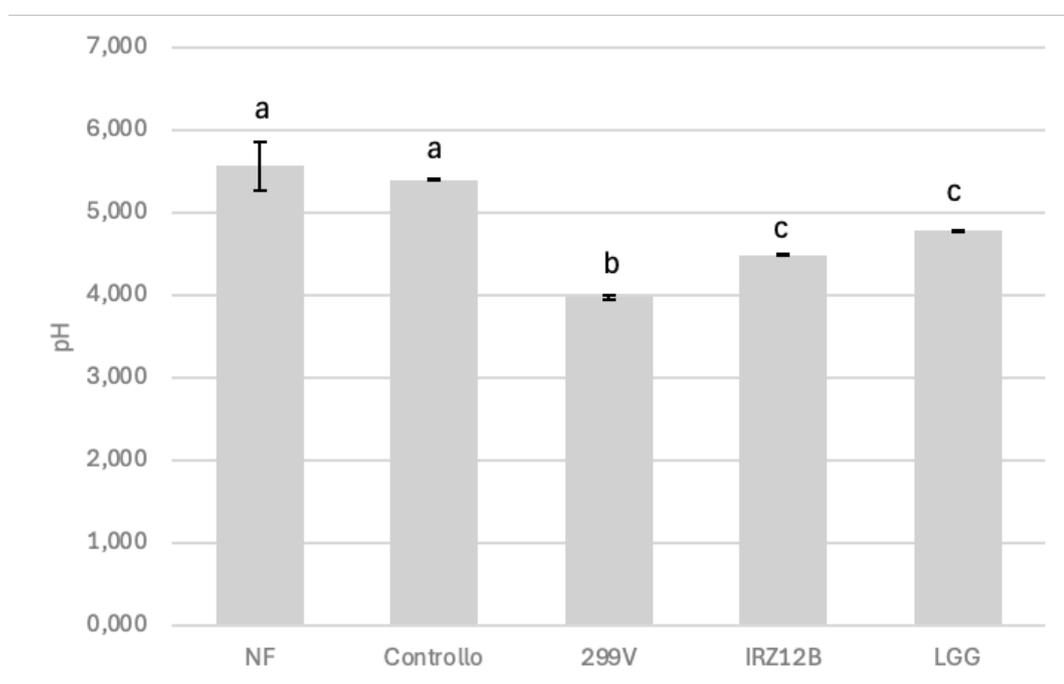


**Figura 9** – Effetto della rimozione dei nutrienti all'interno del mezzo di crescita sul tasso di crescita di *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG. Nell'asse delle ordinate, il tasso di crescita è espresso come percentuale tra il tasso di crescita quando un nutriente è omesso dal mezzo di crescita e il tasso di crescita quando il microrganismo viene fatto crescere in un mezzo di crescita completo (Sun *et al.*, 2019).

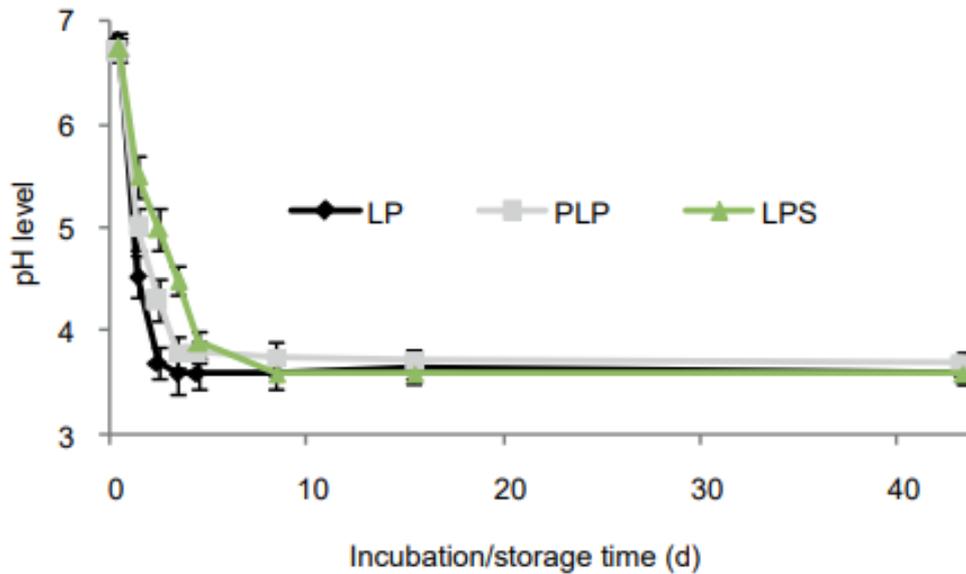
### 3.3 pH

Il grafico riportato nella Figura 10 dimostra il valore di pH dell'estratto di rucola non fermentato e le variazioni degli estratti sottoposti a fermentazione spontanea (controllo) e da parte dei tre diversi ceppi microbici. L'estratto di rucola appena ottenuto a partire dalla rucola fresca presenta un pH pari a circa 5.56; la fermentazione da parte di *L. plantarum* 299V porta ad un abbassamento del pH fino a 3.98, mentre le fermentazioni ad opera di *P. acidilactici* IRZ12B e *L. rhamnosus* GG portano rispettivamente ad un abbassamento dei pH degli estratti a 4.49 e 4.78. Come si può osservare, tutti e tre i ceppi portano ad una acidificazione della matrice, anche se il più efficiente da questo punto di vista sembra essere *Lactiplantibacillus plantarum* 299V; invece, *Pediococcus acidilactici* IRZ12B e *Lactica-seibacillus rhamnosus* GG portano ad una riduzione del pH meno spinta.

Il potenziale del ceppo *L. plantarum* 299V nell'abbassamento del pH è stato documentato anche da Jablonska-Rys *et al.* (2016), dove la preparazione a base di funghi champignon ha raggiunto un pH pari a 3.75 partendo da un pH iniziale pari a 7 (Figura 11). Anche lo studio di Yang *et al.* (2018) ha documentato un abbassamento spiccato del pH durante le prime 24 ore di fermentazione a carico di *L. plantarum* degli estratti vegetali ottenuti da mele, pere e carote; nello specifico, è stato documentato un abbassamento di pH da un valore pari a 6.75 a 4.5 nelle prime 24 ore di fermentazione.



**Figura 10** – pH degli estratti di rucola a seguito della fermentazione batterica ad opera dei tre differenti ceppi fermentanti. RNF si riferisce all'estratto di rucola non fermentato. Controllo si riferisce ad un tubo non inoculato e incubato overnight. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ).



**Figura 11** – Evoluzione del pH della preparazione di funghi champignons fermentati: LP – funghi fermentati utilizzando *L. plantarum* Ib; PLP – funghi fermentati utilizzando il ceppo probiotico *L. plantarum* 299V; LPS – funghi fermentati utilizzando *L. plantarum* Ib con spezie (Jablonska-Rys *et al.*, 2016).

Per quanto riguarda il ceppo *P. acidilactici* IRZ12B, invece, lo studio di N.J. Gardner *et al.* (2001) ha evidenziato la capacità della specie *P. acidilactici* di abbassare considerevolmente il pH di un succo di *Brassica oleracea* di un valore pari a 1.5. L'abbassamento del pH è principalmente dovuto all'aumento della concentrazione di acidi organici, principalmente acido lattico, prodotti dalla fermentazione lattica a carico dei batteri inoculati.

Nonostante non si sia osservata una spiccata riduzione del pH dell'estratto di rucola fermentato con il ceppo *L. rhamnosus* GG, lo studio di Rubio *et al.* (2013) ha evidenziato la capacità di tale ceppo di portare ad una spinta acidificazione di prodotti come salsicce e insaccati. Ciò potrebbe essere dovuto alla maggior crescita del ceppo riscontrata in tali prodotti, grazie soprattutto alla maggiore disponibilità di nutrienti.

### 3.4 Potere antiossidante

Il grafico riportato in Figura 12 riassume i livelli di potere antiossidante degli estratti di rucola sottoposti a fermentazione, oltre a quello dell'estratto di rucola non fermentato. Come si può evincere dal grafico, non si osservano differenze significative in termini di potere antiossidante tra l'estratto di rucola non fermentato e gli estratti di rucola ottenuti a seguito della fermentazione con i tre ceppi microbici. Nello specifico, la percentuale di inibizione calcolata a livello dell'estratto di rucola non fermentato è risultata pari al  $22,08 \pm 2,65\%$ , mentre per quanto riguarda gli estratti fermentati è risultata pari al  $12,74 \pm 8,34\%$ ,

10,21 ± 2,50% e 17,97 ± 0,99%, rispettivamente per *L. plantarum* 299V, *P. acidilactici* IRZ12B e *L. rhamnosus* GG.

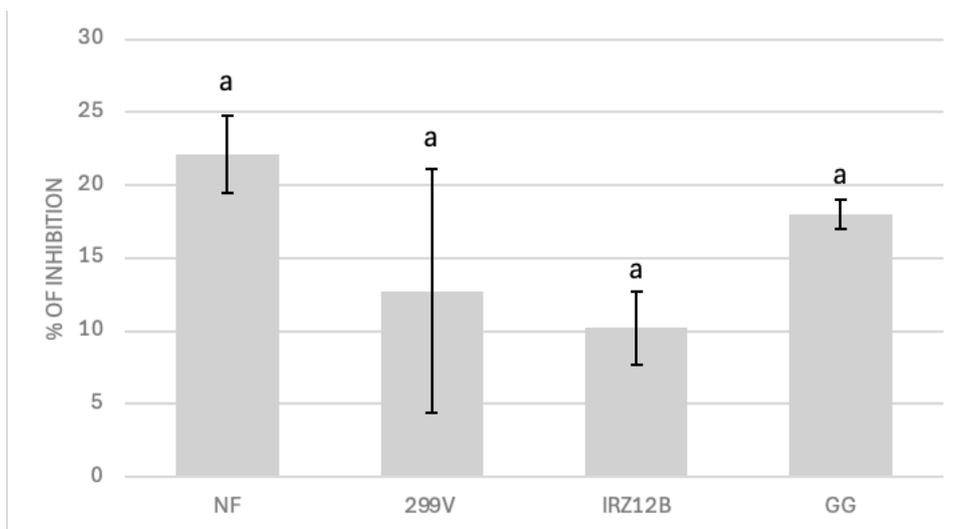
I risultati relativi agli estratti non fermentati sono abbastanza in linea con quelli ottenuti dallo studio di Abbasi *et al.* (2013), che si è particolarmente concentrato sul potere antiossidante delle varie componenti della pianta di *E. sativa*. Lo studio appena menzionato ha evidenziato valori di percentuale totale di potere antiossidante prossimi al 50% per le foglie di rucola fresca; questi risultati sono stati ottenuti applicando la seguente formula, differente da quella applicata nel presente progetto di tesi:

$$\% \text{ potere antiossidante} = \frac{As}{Ab} \cdot 100$$

Dove: As, indica l'assorbanza del campione; Ab, indica l'assorbanza del bianco, ovvero della soluzione DPPH in etanolo, senza aggiunta di campione.

Il metodo utilizzato da Abbasi *et al.* (2013) per la determinazione del potere antiossidante prevedeva l'utilizzo di matrice vegetale essiccata, disciolta poi in etanolo e unita alla soluzione DPPH precedentemente preparata (1 mM). Come si può osservare, il metodo utilizzato differisce leggermente da quello applicato nel presente progetto di tesi; tuttavia, al netto di tali differenze, i risultati ottenuti possono essere comparabili.

Uno studio di Yang *et al.* (2018) ha invece indagato l'effetto della fermentazione sul potere antiossidante totale di estratti di frutta e verdura (mele, pere e carote), applicando il saggio DPPH in modo molto simile a quello utilizzato nel presente progetto di tesi. In questo caso, l'estratto ottenuto dalle materie prime appena menzionate è stato sottoposto a fermentazione attraverso l'aggiunta di *L. plantarum* 115 e *L. plantarum* Vege Start 60. Il saggio DPPH è stato effettuato in diversi momenti della fermentazione, la quale ha avuto luogo in un periodo pari a 14 giorni a 35 °C, evidenziando un andamento crescente del potere antiossidante fino all'ottavo giorno di fermentazione, per poi decrescere fino al quattordicesimo giorno. Tuttavia, si è osservato che in corrispondenza dei primi giorni di fermentazione non vi è stata una crescita considerevole del potere antiossidante degli estratti vegetali fermentati, in linea con quanto osservato nel presente progetto di tesi relativamente agli estratti di rucola.



**Figura 12** – Percentuale di inibizione determinata grazie all’analisi DPPH sui differenti estratti di rucola fermentati. NF corrisponde all’estratto di rucola non fermentato. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0.05$ ).

Alcuni studi hanno evidenziato la capacità dei ceppi di *L. plantarum* e *P. acidilactici* di produrre enzima superossido dismutasi (SOD), uno dei più importanti enzimi con azione antiossidante, in quanto in grado di rimuovere efficacemente l’ossigeno reattivo nei sistemi catalitici. Alcuni batteri sono dunque in grado di produrre superossido dismutasi durante la fermentazione, quando quest’ultima viene fatta perdurare per più giorni. Ad esempio, lo studio di Yang *et al.* (2018) ha evidenziato una crescita della concentrazione dell’enzima SOD dopo il secondo giorno di fermentazione di estratti di frutta e verdura fermentati, fino all’ottavo giorno, in corrispondenza del quale si è osservato il livello massimo. L’enzima SOD è di tipo intracellulare e viene dunque rilasciato a seguito della lisi cellulare dei microrganismi, cosa che avviene nel momento in cui la crescita microbica entra nella fase stazionaria, durante la quale un certo numero di cellule va incontro a morte e, quindi, anche a lisi cellulare. Questo è dunque il motivo per cui dopo 24 ore di fermentazione, ovvero quando poche cellule sono andate incontro a lisi cellulare, il potere antiossidante totale dell’estratto di rucola potrebbe non essere differente da quello dell’estratto non fermentato. Nello studio di Yang *et al.* (2018), l’andamento generale osservato per l’enzima SOD è in linea con il trend del potere antiossidante totale ottenuto dal saggio DPPH.

Lo studio di Yan *et al.* (2019) effettuato su un estratto di frutti rossi sottoposto a fermentazione batterica ad opera di *L. rhamnosus* GG ha dimostrato un aumento significativo del potere antiossidante dell’estratto a seguito del processo fermentativo. Questo incremento può essere dovuto all’aumento della concentrazione di alcuni composti caratterizzati da spiccata attività antiossidante, come  $\beta$ -carotene, polifenoli e flavonoidi. Questo andamento

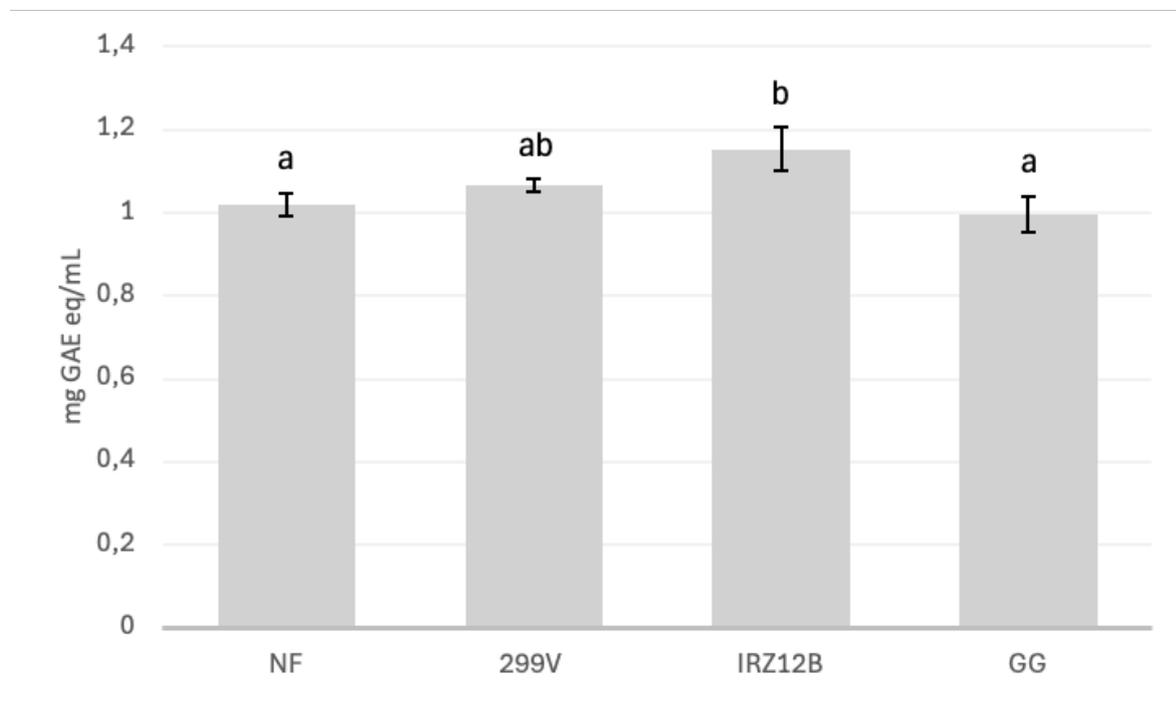
conferma quanto riscontrato qualche anno prima da Ng et al. (2011), i quali hanno confermato che l'incremento dell'attività antiossidante degli estratti vegetali a seguito della fermentazione è dovuto all'aumento della concentrazione di composti fenolici; infatti, è stato dimostrato che la fermentazione è in grado di indurre la degradazione strutturale delle pareti cellulari delle cellule vegetali, il che può portare al rilascio o alla biosintesi di vari composti bioattivi. Ceppi afferenti al genere *Lactobacillus* sono stati inoltre caratterizzati da una spiccata capacità antiossidante grazie ai loro meccanismi di tipo enzimatico in grado di minimizzare la produzione di specie reattive dell'ossigeno (Lee et al. 2006).

### 3.5 Composti fenolici totali

Il grafico riportato nella Figura 13 illustra i risultati dei polifenoli totali, espressi in termini di mg GAE/mL, degli estratti di rucola fermentati e non. Nello specifico, il contenuto di polifenoli totali presenti all'interno dell'estratto di rucola non fermentato è stato quantificato pari a  $1,02 \pm 0,03$  mg GAE/mL di estratto; invece, nel caso degli estratti fermentati, i quantitativi rilevati sono risultati pari a  $1,06 \pm 0,02$ ,  $1,15 \pm 0,05$  e  $0,99 \pm 0,04$  mg GAE/mL, rispettivamente per *L. plantarum* 299V, *P. acidilactici* IRZ12B e *L. rhamnosus* GG. Si osservano delle differenze statisticamente significative dal punto di vista quantitativo solamente per quanto riguarda l'estratto di rucola fermentato con il ceppo *Pediococcus acidilactici* IRZ12B. Al contrario, gli estratti fermentati dai ceppi *Lactiplantibacillus plantarum* 299V e *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG non dimostrano differenze significative rispetto al non fermentato. L'aumento di polifenoli riscontrato nei campioni fermentati da *L. plantarum* 299V e *P. acidilactici* IRZ12B potrebbe essere dovuto essenzialmente al fatto che i due ceppi hanno dimostrato una crescita molto più spiccata all'interno dell'estratto di rucola, il che potrebbe aver portato ad un miglior rilascio di composti fenolici all'interno della matrice.

Un andamento crescente per quanto riguarda il contenuto di composti fenolici totali è stato osservato nello studio di Yang et al. (2018), il quale evidenziava gli effetti della fermentazione lattica a carico di *L. plantarum* a livello di estratti vegetali ottenuti da matrici come mele, pere e carote. Nello specifico, a partire da un contenuto totale iniziale di fenoli pari a 96,8 mg/L a livello dell'estratto non fermentato, sono stati raggiunti valori particolarmente elevati in corrispondenza dell'ottavo giorno di fermentazione (121 mg/L), pari a 1,25 volte il livello iniziale della matrice non fermentata. Inoltre, si è evidenziato che la depolimerizzazione microbica dei composti presenti all'interno degli estratti potrebbe spiegare l'aumento del contenuto fenolico totale che si verifica durante la fermentazione (Chu & Chen,

2006). Peraltro, durante la fermentazione, una certa concentrazione di fenoli all'interno della matrice può causare batteriostasi, tanto da indurre i batteri lattici stessi alla degradazione di tali composti al fine di proseguire con la crescita. Questo comportamento può ovviamente portare alla diminuzione del contenuto fenolico totale (Rodriguez *et al.*, 2009).



**Figura 12** – Polifenoli totali determinati dall'analisi Folin-Ciocalteu, espressi in mg GAE eq/mL, sui differenti estratti di rucola fermentati. NF corrisponde all'estratto di rucola non fermentato. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0.05$ ).

Lo studio di Xiao *et al.* (2015) ha inoltre riportato che *Lactiplantibacillus plantarum* è in grado di aumentare significativamente il contenuto totale di flavonoidi durante la fermentazione di una bevanda a base di soia. Inoltre, studi precedenti hanno riportato che i batteri lattici sono in grado di facilitare il rilascio di flavonoidi all'interno delle matrici vegetali in fase di fermentazione (Katina *et al.*, 2007). Pertanto, si può generalmente affermare che la fermentazione delle matrici vegetali può migliorare il contenuto totale di polifenoli e flavonoidi all'interno dei prodotti finiti.



## 4 CONCLUSIONI

Gli estratti vegetali fermentati rappresentano una prospettiva di crescita di particolare interesse sia nell'ambito alimentare che della cosmetica; infatti, l'utilizzo di ceppi di batteri lattici probiotici per la fermentazione di matrici vegetali rappresenta una novità di particolare interesse, soprattutto grazie alla capacità dei batteri di crescere e di convertire in sostanze nutrizionalmente interessanti e caratterizzate da proprietà nutraceutiche i substrati naturalmente presenti all'interno di tali prodotti vegetali.

Il presente lavoro ha comparato le potenzialità di tre differenti ceppi batterici probiotici, ovvero *Lactiplantibacillus plantarum* 299V, *Pediococcus acidilactici* IRZ12B e *Lactiseibacillus rhamnosus* GG, nel fermentare una matrice vegetale non convenzionalmente utilizzata a tal scopo, ovvero un estratto ottenuto a partire da rucola (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa*). La necessità di inoculare secondo una concentrazione batterica ben precisa ha richiesto la messa a punto di un trattamento in grado di ridurre la carica microbica della rucola fresca, cercando allo stesso tempo di preservare il più possibile le sostanze nutrizionali presenti nella materia prima, soprattutto per quanto riguarda i composti antiossidanti. Due dei tre ceppi, ovvero *L. plantarum* 299V e *P. acidilactici* IRZ12B, hanno dimostrato un'efficiente capacità fermentativa in tale substrato, in quanto si è osservata una crescita batterica pari a circa tre cicli logaritmici rispetto all'inoculo. Tale crescita, dovuta essenzialmente a fermentazione lattica, ha ovviamente portato anche ad un abbassamento del pH dell'estratto; nello specifico, a partire da valori prossimi a 5.5, *L. plantarum* 299V ha dimostrato un abbassamento del pH fino a valori pari a 3.98.

Uno dei principali obiettivi del presente progetto è stato quello di osservare le eventuali differenze, in termini di quantitativi di polifenoli e potere antiossidante totale, tra l'estratto di rucola non fermentato e quello sottoposto a fermentazione grazie ai tre differenti ceppi microbici. Sebbene dal punto di vista del potere antiossidante non si siano osservate differenze tra l'estratto non fermentato e quello fermentato, dal punto di vista del contenuto totale di polifenoli le differenze riscontrate sono state particolarmente rilevanti nel caso del ceppo di *Pediococcus acidilactici* IRZ12B, il cui estratto fermentato ha riportato un aumento significativo rispetto al non fermentato. Quest'ultimo ceppo rappresenta dunque quello maggiormente promettente dal punto di vista della messa a punto di integratori alimentari o comunque alimenti funzionali a base di rucola. Rimane comunque da studiare l'impatto di eventuali tecnologie di trasformazione e/o conservazione degli estratti sulle

potenzialità post-biotiche o probiotiche dell'estratto fermentato. Ovviamente, non è esclusa la possibilità di mantenere la presenza dei LAB all'interno dell'estratto, rendendo così probiotico l'eventuale alimento ottenuto successivamente. Infatti, la concentrazione di microrganismi vivi e vitali presenti al termine del processo fermentativo e le caratteristiche dei ceppi stessi permettono a tutti gli effetti di considerare come probiotico tale estratto di rucola.

Le prospettive future della ricerca sulla fermentazione della rucola e altri prodotti vegetali con batteri lattici sono promettenti e ricche di potenziali sviluppi; tuttavia, è necessario porre l'attenzione soprattutto sullo *scale-up* a livello industriale. Infatti, un passo fondamentale sarà il trasferimento del processo di fermentazione dalla scala di laboratorio a quella industriale e ciò richiederà ovviamente l'ottimizzazione delle condizioni di fermentazione per grandi volumi, mantenendo la qualità del prodotto finale. Sarà infatti essenziale sviluppare protocolli standardizzati per assicurare la vitalità dei probiotici e la stabilità dei composti bioattivi durante la produzione su larga scala. Inoltre, la fermentazione della rucola con batteri lattici porta alla produzione di vari acidi organici, come l'acido lattico e l'acido citrico, i quali influenzano le caratteristiche sensoriali del prodotto finale. Futuri studi potrebbero concentrarsi su un'analisi dettagliata del profilo degli acidi organici, al fine di comprenderne meglio la dinamica della produzione durante la fermentazione.

I risultati di tale ricerca possono essere utilizzati per sviluppare una gamma di nuovi prodotti, inclusi integratori alimentari oppure cosmetici, due settori intimamente connessi.



## 5 BIBLIOGRAFIA

- Abbasi, B. H., Ali, J., Ali, M., Zia, M., Bokhari, S. A., & Khan, M. A. (2016). Free radical scavenging activity in in vitro-derived tissues of *Eruca sativa*. *Toxicology and Industrial Health*, 32(1), 98-105.
- Ahrén, I. L., Xu, J., Önning, G., Olsson, C., Ahrné, S., & Molin, G. (2015). Antihypertensive activity of blueberries fermented by *Lactiplantibacillus plantarum* DSM 15313 and effects on the gut microbiota in healthy rats. *Clinical Nutrition*, 34(4), 719-726.
- Alqasoumi, S., Al-Sohaibani, M., Al-Howiriny, T., Al-Yahya, M., & Rafatullah, S. (2009). Rocket "Eruca sativa": A salad herb with potential gastric anti-ulcer activity. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 15(16), 1958.
- Altay, F., Karbancioglu-Güler, F., Daskaya-Dikmen, C., & Heperkan, D. (2013). A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. *International journal of food microbiology*, 167(1), 44-56.
- Barillari, J., Canistro, D., Paolini, M., Ferroni, F., Pedulli, G. F., Iori, R., & Valgimigli, L. (2005). Direct antioxidant activity of purified glucoerucin, the dietary secondary metabolite contained in rocket (*Eruca sativa* Mill.) seeds and sprouts. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 53(7), 2475-2482.
- Bell, L., Methven, L., Signore, A., Oruna-Concha, M. J., & Wagstaff, C. (2017). Analysis of seven salad rocket (*Eruca sativa*) accessions: The relationships between sensory attributes and volatile and non-volatile compounds. *Food chemistry*, 218, 181-191.
- Bennett, R. N., Rosa, E. A., Mellon, F. A., & Kroon, P. A. (2006). Ontogenic profiling of glucosinolates, flavonoids, and other secondary metabolites in *Eruca sativa* (salad rocket), *Diplotaxis eruroides* (wall rocket), *Diplotaxis tenuifolia* (wild rocket), and *Bunias orientalis* (Turkish rocket). *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(11), 4005-4015.
- Bianco, V. V. (1995). Rocket, an ancient underutilized vegetable crop and its potential. *Rocket Genetic Resource Network; Padulosi, S., Ed.; International Plant Genetic Resources Institute: Rome, Italy*, 35-57.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D., & Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food research international*, 36(6), 527-543.
- Borcakli, M., Lucas, J., Caputo, L., Ozturk, T., Baruzzi, F., Fusco, V., ... & Houghton, M. (2013). Effect of UV-C light in the preservation of raw fermented beverages. *Italian Journal of Food Science*, 25(2), 213-221.
- Bozokalfa, K. M., Eşiyok, D., & Yağmur, B. (2011). Use of multivariate analysis in mineral accumulation of rocket (*Eruca sativa*) accessions. *Genetika*, 43(3), 437-448.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

- Brock, A., Herzfeld, T., Paschke, R., Koch, M., & Dräger, B. (2006). Brassicaceae contain nortropane alkaloids. *Phytochemistry*, 67(18), 2050-2057.
- Bukhsh, E., Malik, S. A., & Ahmad, S. S. (2007). Estimation of nutritional value and trace elements content of *Carthamus oxyacantha*, *Eruca sativa* and *Plantago ovata*. *Pakistan Journal of Botany*, 39(4), 1181.
- Cats, A., Kuipers, E. J., Bosschaert, M. A. R., Pot, R. G. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., & Kusters, J. G. (2003). Effect of frequent consumption of a *Lactobacillus casei*-containing milk drink in *Helicobacter pylori*-colonized subjects. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 17(3), 429-435.
- Cavaiuolo, M., Cocetta, G., & Ferrante, A. (2013). The antioxidants changes in ornamental flowers during development and senescence. *Antioxidants*, 2(3), 132-155.
- Cavaiuolo, M., & Ferrante, A. (2014). Nitrates and glucosinolates as strong determinants of the nutritional quality in rocket leafy salads. *Nutrients*, 6(4), 1519-1538.
- Cavaiuolo, M., & Ferrante, A. (2014). Nitrates and glucosinolates as strong determinants of the nutritional quality in rocket leafy salads. *Nutrients*, 6(4), 1519-1538.
- Chin, H. W., & Lindsay, R. C. (1994). Modulation of volatile sulfur compounds in cruciferous vegetables.
- Chow, J. (2002). Probiotics and prebiotics: a brief overview. *Journal of renal nutrition*, 12(2), 76-86.
- Chu, S. C., & Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*, 98(3), 502-507.
- Chung, I. C., OuYang, C. N., Yuan, S. N., Lin, H. C., Huang, K. Y., Wu, P. S., ... & Chen, L. C. (2019). Pretreatment with a heat-killed probiotic modulates the NLRP3 inflammasome and attenuates colitis-associated colorectal cancer in mice. *Nutrients*, 11(3), 516.
- Compare, D., Rocco, A., Coccoli, P., Angrisani, D., Sgamato, C., Iovine, B., ... & Nardone, G. (2017). *Lactobacillus casei* DG and its postbiotic reduce the inflammatory mucosal response: an ex-vivo organ culture model of post-infectious irritable bowel syndrome. *BMC gastroenterology*, 17, 1-8.
- D'Antuono, L. F., Elementi, S., & Neri, R. (2008). Glucosinolates in *Diplotaxis* and *Eruca* leaves: Diversity, taxonomic relations and applied aspects. *Phytochemistry*, 69(1), 187-199.
- Demir, N., Bahçeci, K. S., & Acar, J. (2006). The effects of different initial *Lactiplantibacillus plantarum* concentrations on some properties of fermented carrot juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30(3), 352-363.
- de Vos, A. C., Broekman, R., de Almeida Guerra, C. C., van Rijsselberghe, M., & Rozema, J. (2013). Developing and testing new halophyte crops: A case study of salt tolerance of two species of the Brassicaceae, *Diplotaxis tenuifolia* and *Cochlearia officinalis*. *Environmental and experimental botany*, 92, 154-164.

- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10), 3010-3014.
- Didari, T., Solki, S., Mozaffari, S., Nikfar, S., & Abdollahi, M. (2014). A systematic review of the safety of probiotics. *Expert opinion on drug safety*, 13(2), 227-239.
- EFSA, 2005. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA J.* 3, 226.
- Erten, H., Tanguler, H., & Canbaş, A. (2008). A traditional Turkish lactic acid fermented beverage: Shalgam (Salgam). *Food Reviews International*, 24(3), 352-359.
- Esiyok, D., Ongun, A. R., Bozolkalfa, K., Tepecik, M., Okur, B., & Kaygisiz, T. (2006, September). Organic Rocket Growing. In *Proceedings of the VI Vegetable Agriculture Symposium, Kahramanmaraş, Turkey* (pp. 19-22).
- Fahey, J. W., & Talalay, P. (1999). Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9-10), 973-979.
- FAO/WHO, 2006. Probiotics in food, Chemical and Functional Properties of Food Components, Third Edition. Rome.
- FAO/WHO, 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food - Report of a Joint85 FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario Canada.
- Feng, Y., Zhang, M., Mujumdar, A. S., & Gao, Z. (2017). Recent research process of fermented plant extract: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 65, 40-48.
- Fijan, S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International journal of environmental research and public health*, 11(5), 4745-4767.
- Flanders, A., & Abdulkarim, S. M. (1985). The composition of seed and seed oils of Taramira (*Eruca sativa*). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62(7), 1134-1135.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization FAO/WHO. (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.
- Force, L. E., O'Hare, T. J., Wong, L. S., & Irving, D. E. (2007). Impact of cold storage on glucosinolate levels in seed-sprouts of broccoli, rocket, white radish and kohlrabi. *Postharvest biology and technology*, 44(2), 175-178.
- Francke, A. (2004). Effect of cultivation time and soil kind on yielding of garden rocket (*Eruca sativa* L. DC.).

- Frąszczak, B., Ziombra, M., & Knaflewski, M. (2006). The content of vitamin C and essential oils in herbage of some spice plants depending on light conditions and temperature. *Rocz. AR Pozn. Ogrodn*, 40, 15-21.
- Galdeano, C. M., de LeBlanc, A. D. M., Carmuega, E., Weill, R., & Perdigon, G. (2009). Mechanisms involved in the immunostimulation by probiotic fermented milk. *Journal of Dairy Research*, 76(4), 446-454.
- Gardner, N. J., Savard, T., Obermeier, P., Caldwell, G., & Champagne, C. P. (2001). Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *International journal of food microbiology*, 64(3), 261-275.
- Garg, G., & Sharma, V. (2014). *Eruca sativa* (L.): Botanical description, crop improvement, and medicinal properties. *Journal of herbs, spices & medicinal plants*, 20(2), 171-182.
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F., & Gramenzi, A. (2016). Probiotics history. *Journal of clinical gastroenterology*, 50, S116-S119.
- Ghosh, T., Beniwal, A., Semwal, A., & Navani, N. K. (2019). Mechanistic insights into probiotic properties of lactic acid bacteria associated with ethnic fermented dairy products. *Frontiers in microbiology*, 10, 431574.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), 1401-1412.
- Grölund, M. M., Lehtonen, O. P., Eerola, E., & Kero, P. (1999). Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 28(1), 19-25.
- Gulfraz, M., Sadiq, A., Tariq, H., Imran, M., Qureshi, R., & Zeenat, A. (2011). Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Eruca sativa* seed. *Pak. J. Bot*, 43(2), 1351-1359.
- Hall, M., Jobling, J., & Rogers, G. (2012). Some perspectives on rocket as a vegetable crop: A review. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 76(1), 21-41.
- Hardy, G. (2000). Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning. *Nutrition*, 16(7-8), 688-689.
- Harmsen, H. J., Wildeboer-Veloo, A. C., Raangs, G. C., Wagendorp, A. A., Klijn, N., Bindels, J. G., & Welling, G. W. (2000). Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 30(1), 61-67.
- Havas, P., Kun, S., Styevkó, G., Slačanac, V., Hardi, J., & Rezessy-Szabó, J. (2014). Fruit and vegetable juice fermentation with Bifidobacteria. *Acta alimentaria*, 43(Supplement-1), 64-72.
- Helminger, J., Rausch, T., & Hilgenberg, W. (1983). Localization of newly synthesized indole-3-methylglucosinolate (= glucobrassicin) in vacuoles from horseradish (*Armoracia rusticana*). *Physiologia Plantarum*, 58(3), 302-310.

- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 365s-373s.
- Holzapfel, W. H., Franz, C. M. A. P., Ludwig, W., Back, W., & Dicks, L. M. (2006). The genera *pediococcus* and *tetragenococcus*. *Prokaryotes*, 4(1), 229-66.
- Hooper, L. V., & Macpherson, A. J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 159-169.
- Indumathy, M., Sobana, S., Panda, B., & Panda, R. C. (2022). Modelling and control of plate heat exchanger with continuous high-temperature short time milk pasteurization process—A review. *Chemical Engineering Journal Advances*, 11, 100305.
- Jabłońska-Ryś, E., Sławińska, A., Radzki, W., & Gustaw, W. (2016). Evaluation of the potential use of probiotic strain *Lactiplantibacillus plantarum* 299v in lactic fermentation of button mushroom fruiting bodies. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 15(4), 399-407.
- Jakubíková, J., Sedlák, J., Mithen, R., & Bao, Y. (2005). Role of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways in sulforaphane- and erucin-induced phase II enzymes and MRP2 transcription, G2/M arrest and cell death in Caco-2 cells. *Biochemical pharmacology*, 69(11), 1543-1552.
- Jin, J., Koroleva, O. A., Gibson, T., Swanston, J., Magan, J., Zhang, Y. A. N., ... & Wagstaff, C. (2009). Analysis of phytochemical composition and chemoprotective capacity of rocket (*Eruca sativa* and *Diplotaxis tenuifolia*) leafy salad following cultivation in different environments. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(12), 5227-5234.
- Jirovetz, L., Smith, D., & Buchbauer, G. (2002). Aroma compound analysis of *Eruca sativa* (Brassicaceae) SPME headspace leaf samples using GC, GC-MS, and olfactometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(16), 4643-4646.
- Johansson, M. L., Molin, G., Jeppsson, B., Nobaek, S., Ahrne, S., & Bengmark, S. (1993). Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Applied and environmental microbiology*, 59(1), 15-20.
- Kancabaş, A., & Karakaya, S. (2013). Angiotensin-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity of boza, a traditional fermented beverage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(3), 641-645.
- Kareem, K. Y., Hooi Ling, F., Teck Chwen, L., May Foong, O., & Anjas Asmara, S. (2014). Inhibitory activity of postbiotic produced by strains of *Lactiplantibacillus plantarum* using reconstituted media supplemented with inulin. *Gut pathogens*, 6, 1-7.
- Katina, K., Laitila, A., Juvonen, R., Liukkonen, K. H., Kariluoto, S., Piironen, V., ... & Poutanen, K. (2007). Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye. *Food microbiology*, 24(2), 175-186.

- Kaur, S., & Das, M. (2011). Functional foods: An overview. *Food Science and Biotechnology*, 20, 861-875.
- Kaźmierczak-Siedlecka, K., Daca, A., Folwarski, M., Witkowski, J. M., Bryl, E., & Makarewicz, W. (2020). The role of *Lactiplantibacillus plantarum* 299v in supporting treatment of selected diseases. *Central European Journal of Immunology*, 45(4), 488-493.
- Kim, S. J., Jin, S., & Ishii, G. (2004). Isolation and structural elucidation of 4-( $\beta$ -D-glucopyranosyldi-sulfanyl) butyl glucosinolate from leaves of rocket salad (*Eruca sativa* L.) and its antioxidative activity. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 68(12), 2444-2450.
- Kim, S. J., & Ishii, G. (2006). Glucosinolate profiles in the seeds, leaves and roots of rocket salad (*Eruca sativa* Mill.) and anti-oxidative activities of intact plant powder and purified 4-methoxyglucobrassicin. *Soil science and plant nutrition*, 52(3), 394-400.
- Kim, S. J., & Ishii, G. (2007). Effect of storage temperature and duration on glucosinolate, total vitamin C and nitrate contents in rocket salad (*Eruca sativa* Mill.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(6), 966-973.
- Kim, H., Lim, J. J., Shin, H. Y., Suh, H. J., & Choi, H. S. (2021). *Lactiplantibacillus plantarum* K8-based paraprobiotics suppress lipid accumulation during adipogenesis by the regulation of JAK/STAT and AMPK signaling pathways. *Journal of Functional Foods*, 87, 104824.
- Klaver, F. A., & Van der Meer, R. (1993). The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Applied and environmental microbiology*, 59(4), 1120-1124.
- Klingberg, T. D., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D., & Budde, B. B. (2005). Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), 419-431.
- Konstantinov, S. R., Kuipers, E. J., & Peppelenbosch, M. P. (2013). Functional genomic analyses of the gut microbiota for CRC screening. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 10(12), 741-745.
- Kujawa-Szewieczek, A., Adamczak, M., Kwiecień, K., Dudzicz, S., Gazda, M., & Więcek, A. (2015). The effect of *Lactiplantibacillus plantarum* 299v on the incidence of *Clostridium difficile* infection in high risk patients treated with antibiotics. *Nutrients*, 7(12), 10179-10188.
- Kurmann, J. A., & Rašić, J. L. (1991). The health potential of products containing bifidobacteria. *Therapeutic properties of fermented milks.*, 117-157.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 728-764.

- Lee, H. Y., Park, J. H., Seok, S. H., Baek, M. W., Kim, D. J., Lee, K. E., ... & Park, J. H. (2006). Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular and cell biology of lipids*, 1761(7), 736-744.
- Lee, J., Kim, Y., Yun, H. S., Kim, J. G., Oh, S., & Kim, S. H. (2010). Genetic and proteomic analysis of factors affecting serum cholesterol reduction by *Lactobacillus acidophilus* A4. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14), 4829-4835.
- Lima, I. F. P., De Dea Lindner, J., Soccol, V. T., Parada, J. L., & Soccol, C. R. (2012). Development of an innovative nutraceutical fermented beverage from herbal mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) extract. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(1), 788-800.
- Liptáková, D., Valík, L., & Medveďová, A. (2008). Characterization of the growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG in milk at suboptimal temperatures. *J Food Nutr Res*, 47, 60-67.
- Long, G., Burdet, H. M., & Greuter, W. *Med-checklist: a critical inventory of vascular plants of the circum-mediterranean countries*.
- Majchrzak, W., Motyl, I., & Śmigielski, K. (2022). Biological and cosmetical importance of fermented raw materials: An overview. *Molecules*, 27(15), 4845.
- Mack, D. R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., & Hollingsworth, M. A. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 276(4), G941-G950.
- Mantegazza, G., Duncan, R., Telesca, N., Gargari, G., Perotti, S., Riso, P., & Guglielmetti, S. (2024). Lactic acid bacteria naturally associated with ready-to-eat rocket salad can survive the human gastrointestinal transit. *Food Microbiology*, 118, 104418.
- Martínez-Sánchez, A., Marín, A., Llorach, R., Ferreres, F., & Gil, M. I. (2006). Controlled atmosphere preserves quality and phytonutrients in wild rocket (*Diplotaxis tenuifolia*). *Postharvest Biology and Technology*, 40(1), 26-33.
- Martínez-Sánchez, A., Llorach, R., Gil, M. I., & Ferreres, F. (2007). Identification of new flavonoid glycosides and flavonoid profiles to characterize rocket leafy salads (*Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(4), 1356-1363.
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 173-182.
- McFarland, L. V. (2015). From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl\_2), S85-S90.
- Melchini, A., Costa, C., Traka, M., Miceli, N., Mithen, R., De Pasquale, R., & Trovato, A. (2009). Erucin, a new promising cancer chemopreventive agent from rocket salads, shows anti-proliferative activity on human lung carcinoma A549 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 47(7), 1430-1436.

- Metchnikoff, I. I. (1907). *The prolongation of life: optimistic studies*. Springer Publishing Company.
- Miyazawa, M., Maehara, T., & Kurose, K. (2002). Composition of the essential oil from the leaves of *Eruca sativa*. *Flavour and fragrance journal*, 17(3), 187-190.
- Moser, B. R., Winkler-Moser, J. K., Shah, S. N., & Vaughn, S. F. (2010). Composition and physical properties of arugula, shepherd's purse, and upland cress oils. *European journal of lipid science and technology*, 112(7), 734-740.
- Nobaek, S., Johansson, M. L., Molin, G., Ahrné, S., & Jeppsson, B. (2000). Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Official journal of the American College of Gastroenterology* | *ACG*, 95(5), 1231-1238.
- Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions—a review. *International journal of medical microbiology*, 300(1), 57-62.
- Oliveira, A., Coelho, M., Alexandre, E. M., Almeida, D. P., & Pintado, M. (2015). Long-term frozen storage and pasteurization effects on strawberry polyphenols content. *Food and bioprocess technology*, 8, 1838-1844.
- Omirou, M., Papastefanou, C., Katsarou, D., Papastylianou, I., Passam, H. C., Ehaliotis, C., & Papadopoulou, K. K. (2012). Relationships between nitrogen, dry matter accumulation and glucosinolates in *Eruca sativa* Mills. The applicability of the critical NO 3-N levels approach. *Plant and soil*, 354, 347-358.
- Orla-Jensen, S. (1919). *The lactic acid bacteria* (Vol. 3, No. 2). AF Host.
- Orrhage, K., Sillerström, E., Gustafsson, J. Å., Nord, C. E., & Rafter, J. (1994). Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 311(2), 239-248.
- O'sullivan, L., Ross, R. P., & Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84(5-6), 593-604.
- Ozen, M., & Dinleyici, E. C. (2015). The history of probiotics: the untold story. *Beneficial microbes*, 6(2), 159-165.
- Pakroo, S., Tarrah, A., Bettin, J., Corich, V., & Giacomini, A. (2022). Genomic and phenotypic evaluation of potential probiotic pediococcus strains with hypocholesterolemic effect isolated from traditional fermented food. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-12.
- Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of applied microbiology*, 100(6), 1171-1185.
- Pasini, F., Verardo, V., Cerretani, L., Caboni, M. F., & D'Antuono, L. F. (2011). Rocket salad (*Diplomatix* and *Eruca* spp.) sensory analysis and relation with glucosinolate and phenolic content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(15), 2858-2864.

- Pimentel, T. C., Cruz, A. G., Pereira, E., da Costa, W. K. A., da Silva Rocha, R., de Souza Pedrosa, G. T., ... & Magnani, M. (2023). Postbiotics: An overview of concepts, inactivation technologies, health effects, and driver trends. *Trends in Food Science & Technology*.
- Pyo, Y. H., & Seong, K. S. (2009). Hypolipidemic effects of Monascus-fermented soybean extracts in rats fed a high-fat and-cholesterol diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8617-8622.
- Quattrini, E., Penati, M., Alberici, A., Martinetti, L., Marino Gallina, P., Ferrante, A., & Schiavi, M. (2007, October). Effect of the reduction of nutrient solution concentration on leafy vegetables quality grown in floating system. In *International Symposium on High Technology for Greenhouse System Management: Greensys2007 801* (pp. 1167-1176).
- Quinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., & Girbés, T. (2014). Probiotic lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 5(18), 1765.
- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M. T., & McCormick, J. K. (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical microbiology reviews*, 16(4), 658-672.
- Robles-Vera, I., Toral, M., Romero, M., Jiménez, R., Sánchez, M., Pérez-Vizcaíno, F., & Duarte, J. (2017). Antihypertensive effects of probiotics. *Current hypertension reports*, 19, 1-8.
- Rodriguez, S. A., Vela Gurovic, M. S., Mulet, M. C., & Murray, A. P. (2006). *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC., a source of a potentially antifungal essential oil containing nitrile.
- Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., de las Rivas, B., de Felipe, F. L., Gómez-Cordovés, C., ... & Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 132(2-3), 79-90.
- Rollan, S., Houle, C., & Deshayes, C. (2015). *U.S. Patent No. 9,044,399*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., ... & Rowland, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British journal of nutrition*, 80(S1), S147-S171.
- Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M., ... & Vinderola, G. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(9), 649-667.
- Schleifer, K. H., & Ludwig, W. (1995). Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Systematic and Applied Microbiology*, 18(4), 461-467.
- Shah, N. P. (1999). Probiotic bacteria: Antimicrobial and antimutagenic properties. *Probiotica*, 6, 1-3.
- Shah, N. P. (2000). Some beneficial effects of probiotic bacteria. *Bioscience and Microflora*, 19(2), 99-106.

- Shah, N. P. (2006). Microorganisms and health attributes (probiotics). *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*, Chandan, RC (Ed.), Blackwell Publishing Professional, Iowa, USA, 341-354.
- Shahidi, F. (2009). Nutraceuticals and functional foods: whole versus processed foods. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 376-387.
- Sharma, A., Kaur, J., Lee, S., & Park, Y. S. (2019). Tracking of intentionally inoculated lactic acid bacteria strains in yogurt and probiotic powder. *Microorganisms*, 8(1), 5.
- Silva, Á., Gonzalez, N., Terrén, A., García, A., Martínez-Blanch, J. F., Illescas, V., ... & Chenoll, E. (2020). An infant milk formula supplemented with heat-treated probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CECT 8145, reduces fat deposition in *C. elegans* and augments acetate and lactate in a fermented infant slurry. *Foods*, 9(5), 652.
- Song, D., Ibrahim, S., & Hayek, S. (2012). Recent application of probiotics in food and agricultural science. *Probiotics*, 10(1), 1-34.
- Song, Y. R., Shin, N. S., & Baik, S. H. (2014). Physicochemical and functional characteristics of a novel fermented pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves-based beverage using lactic acid bacteria. *Food science and biotechnology*, 23, 187-194.
- Sun, J., Chen, H., Qiao, Y., Liu, G., Leng, C., Zhang, Y., ... & Feng, Z. (2019). The nutrient requirements of *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG and their application to fermented milk. *Journal of dairy science*, 102(7), 5971-5978.
- Taverniti, V., & Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes & nutrition*, 6(3), 261-274.
- Tsilingiri, K., Barbosa, T., Penna, G., Caprioli, F., Sonzogni, A., Viale, G., & Rescigno, M. (2012). Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut*, 61(7), 1007-1015.
- Vimala, Y., & Kumar, P. D. (2006). Some aspects of probiotics.
- Vinderola, G., Sanders, M. E., & Salminen, S. (2022). The concept of postbiotics. *Foods*, 11(8), 1077.
- Vonk, R. J., Reckman, G. A., Harmsen, H. J., & Priebe, M. G. (2012). Probiotics and lactose intolerance. *Probiotics*, 7, 149-160.
- Wardhani, D. H., Vázquez, J. A., & Pandiella, S. S. (2010). Optimisation of antioxidants extraction from soybeans fermented by *Aspergillus oryzae*. *Food Chemistry*, 118(3), 731-739.
- Xiao, Y., Wang, L., Rui, X., Li, W., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M. (2015). Enhancement of the antioxidant capacity of soy whey by fermentation with *Lactiplantibacillus plantarum* B1-6. *Journal of functional foods*, 12, 33-44.

- Xu, R., Shang, N., & Li, P. (2011). In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharide fractions from *Bifidobacterium animalis* RH. *Anaerobe*, 17(5), 226-231.
- Yan, Y., Zhang, F., Chai, Z., Liu, M., Battino, M., & Meng, X. (2019). Mixed fermentation of blueberry pomace with *L. rhamnosus* GG and *L. plantarum*-1: Enhance the active ingredient, antioxidant activity and health-promoting benefits. *Food and Chemical Toxicology*, 131, 110541.
- Yehuda, H., Soroka, Y., Zlotkin-Frušić, M., Gilhar, A., Milner, Y., & Tamir, S. (2012). Isothiocyanates inhibit psoriasis-related proinflammatory factors in human skin. *Inflammation Research*, 61, 735-742.
- Yoon, H., Benamouzig, R., Little, J., Francois-Collange, M., & Tome, D. (2000). Systematic review of epidemiological studies on meat, dairy products and egg consumption and risk of colorectal adenomas. *European Journal of Cancer Prevention*, 151-164.
- Žnidarčič, D., Ban, D., & Šircelj, H. (2011). Carotenoid and chlorophyll composition of commonly consumed leafy vegetables in Mediterranean countries. *Food chemistry*, 129(3), 1164-1168.