



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTA' DI AGRARIA

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN
SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

TESI DI LAUREA

UTILIZZO DI BATTERI LATTICI PER LA
PRODUZIONE DI COMPOSTI BIOATTIVI A
PARTIRE DA SCARTI VEGETALI

RELATORE: PROF. SSA VIVIANA CORICH
CORRELATORE: DOTT. SSA DAFNI-MARIA KAGKLI

LAUREANDO: GIACOMO BETTIO

ANNO ACCADEMICO 2007-2008

RIASSUNTO

L'orticoltura italiana e' caratterizzata da un elevato numero di prodotti vegetali. Tali prodotti comprendono il radicchio, una coltura coltivata principalmente nel nord est Italia. L'aumento di domanda, da parte del consumatore, ha inciso sull'incremento della produzione di questo vegetale, la cui produzione è stimata intorno a 250.000 tonnellate all'anno. Uno degli obiettivi principali dell'azienda alimentare e' lo sfruttamento del sottoprodotto lasciato sul campo dopo l'elaborazione della matrice vegetale, che arriva a circa 10 tonnellate all'ettaro per anno.

Il colore del radicchio rosso e' associato alla presenza di pigmenti antociani idrosolubili; quindi i sottoprodotti del radicchio rosso potrebbero costituire una fonte di sostanze che variano da polisaccaridi, come l'inulina, a polifenoli e antociani. Sostanze funzionali possono essere anche ottenute dal residuo delle vinacce rimasto dopo la produzione della grappa.

Il lavoro della presente tesi e' stato focalizzato sui componenti antiossidanti e antimicrobici delle due matrici vegetali, in presenza di batteri lattici. In particolare, e' dimostrato che le due matrici vegetali permettono la crescita di questi batteri, la fermentazione aumenta l'attività antiossidante e tutte e le matrici, dopo la fermentazione, dimostrano attività antimicrobica contro diversi batteri. L'applicazione della fermentazione, quindi, potrebbe essere una soluzione alternativa allo sfruttamento dei sottoprodotti, altrimenti destinati all'eliminazione, dando così a essi valore aggiunto.

ABSTRACT

Italian horticulture is characterized by a large number of vegetables. Such products comprise red or variegated chicories, called “radicchio” which are cultivated mainly in northeastern Italy. The increased consumers’ demand for these products has led to an increased production which reaches approximately 250 000 tons per year. A major problem though is the by-products produced from their elaboration in the farm, reaching approximately 10 tons/hectare. Unlike white chicories, the color of the red varieties is associated with the presence of water-soluble anthocyanin pigments; red chicory leaves obtained as waste or by-product are a source of substances ranging from polysaccharides like inulin to anthocyanins and polyphenols. Similar functional compounds, might as well be obtained from grape pomace after the manufacture of grappa.

The present study focused on the recovery of antioxidant and antimicrobial compounds from these two vegetable matrices in the presence of lactic acid bacteria. It is demonstrated that these matrices allow growth of these bacteria, the fermentation increases antioxidant activity of the vegetables and they demonstrate antimicrobial activity against a wide range of microorganisms. The application of food fermentation may therefore be a useful tool in exploiting the by-products still possessing important substances giving additional value to a product deemed to be wasted otherwise.

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	2
INDICE.....	3
1. INTRODUZIONE.....	5
1.1 ANTIOSSIDANTI NELLA DIETA.....	7
1.2 LA VINACCIA.....	9
1.2.1 Caratteristiche generali e composizione.....	9
Acqua.....	9
Zuccheri.....	9
Acidi.....	10
Composti polifenolici.....	10
Sostanze pectiche.....	11
Cellulosa.....	11
Sostanze aromatiche.....	11
1.2.2 Composti bioattivi nei residui di lavorazione dell'uva (Casas et al., 2008).....	12
Effetti metabolici conosciuti.....	12
Resveratrolo.....	12
Effetti metabolici conosciuti.....	13
Quantità di molecole estraibili.....	13
1.2.3 Antocianine.....	14
Struttura base delle antocianine.....	14
Effetti metabolici conosciuti.....	15
Quantità di molecole estraibili.....	16
1.2.4 Proantocianidine.....	16
Effetti metabolici conosciuti.....	17
1.2.5 Quercitina.....	17
Effetti metabolici conosciuti.....	18
1.2.6 Acidi fenolici delle uve e dei vini.....	18
1.3 IL RADICCHIO.....	21
1.4 MICRORGANISMI COINVOLTI NELLA PRODUZIONE DI COMPOSTI BIOATTIVI: I BATTERI LATTICI.....	25
Caratteristiche generali dei batteri lattici.....	25
2. SCOPO DELLA TESI.....	31
3. MATERIALI E METODI.....	32

3.1	<i>Ceppi utilizzati e isolamento</i>	32
3.2	<i>Terreni e condizioni di crescita dei batteri lattici</i>	33
3.3	<i>Preparazione inoculo</i>	33
3.4	<i>Trattamento della matrice vegetale (radicchio)</i>	33
3.5	<i>Preparazione degli estratti</i>	34
3.6	<i>Batteri indicatori prova antimicrobica dei fermentati</i>	34
3.7	<i>Determinazione della produzione di batteriocine</i>	35
3.8	<i>Attività antiossidante</i>	36
3.9	<i>Analisi dei polifenoli e antociani tramite HPLC</i>	36
4.	RISULTATI	37
4.1	<i>Valutazione della crescita di microrganismi tecnologicamente rilevanti in radicchio</i>	37
4.2	<i>Prove di fermentazione di <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Lactobacillus hilgardii</i> in radicchio</i>	41
4.3	<i>Comparazione delle attività fermentative di una selezione di ceppi proveniente dall'ambiente enologico</i>	44
4.3.1	<i>Crescita dei ceppi di <i>Lactobacillus plantarum</i></i>	45
4.3.2	<i>Crescita dei ceppi di <i>Lactobacillus hilgardii</i></i>	48
4.3.3	<i>Crescita dei ceppi di <i>Oenococcus oeni</i></i>	49
4.4	<i>Attività antimicrobica</i>	51
4.5	<i>Attività antiossidante</i>	54
4.6	<i>Composizione in polifenoli e antociani dei fermentati</i>	57
4.6.1	<i>Polifenoli</i>	58
4.6.2	<i>Antociani</i>	68
	CONCLUSIONI	74
	BIBLIOGRAFIA	76
	ALLEGATO -MEZZI COLTURALI	I
	RINGRAZIAMENTI	IV

1. INTRODUZIONE

La dieta è, attualmente, uno dei maggiori target individuati nelle strategie di ricerca riguardanti la salute pubblica, nella maggior parte dei paesi industrializzati. Il crescente interesse per la salute del consumatore è alla base dell'aumentato interesse in Europa e, nel resto del mondo, per gli alimenti funzionali. È, infatti, riconosciuta la possibilità di ridurre il rischio di malattie e migliorare lo stile di vita attraverso una dieta corretta. Le conferme dell'importanza di alimenti come frutta, verdura e cereali nella prevenzione di malattie, le ricerche sugli antiossidanti alimentari e sulle combinazioni di sostanze protettive presenti nelle piante, hanno favorito sviluppi del mercato degli alimenti funzionali. Un alimento può essere considerato funzionale se dimostra di avere, oltre gli effetti nutrizionali normali, effetti positivi su una o più funzioni specifiche dell'organismo. Esempi di alimenti funzionali sono i cibi che contengono fibre alimentari, vitamine, minerali, ecc. (tabella **1.1**) e quelli addizionati con sostanze biologicamente attive come antiossidanti, o colture di microrganismi probiotici. Sul mercato, sono diffusi prodotti in cui i batteri aventi caratteristiche probiotiche, ovvero arrecanti un effetto benefico sulla salute dell'ospite, quando consumati in adeguate quantità, sono incorporati soprattutto nel latte fermentato, ad esempio yogurt e derivati del latte, o sotto forma di colture concentrate.

Tabella 1.1: composti bioattivi contenuti negli alimenti

CLASSE	COMPONENTE BIOATTIVA	FONTE ALIMENTARE
VITAMINE	Vitamina D	Latticini
	Acido folico; vitamina A	Frutta, verdura
	Vitamina E (tocoferolo)	Oli vegetali
	Acido ascorbico (vitamina C)	Frutta, verdura
MINERALI	Calcio	Latticini, vegetali
	Selenio	Cereali, carne e pesce
	Zinco	Carne, vegetali
CAROTENOIDI	Licopene	Pomodori
	Luteina	Verdure verdi in genere
	β -carotene	Verdure verdi, carote e albicocche
	β -criptoxantina	Peperoncini rossi, mandarini
	Zeaxantina	Peperoncini rossi
FLAVONOIDI	Genisteina	Soia, prodotti della soia
	Resveratrolo	Uva, vino rosso
	Quercitina	Frutta, verdura
	(-) – Epigallocatechina-3-gallato	Tè verde
ISOTIOCIANATI	Allil isotiocianato	Cavoli
	Benzil isotiocianato	Crescione
	Indolo-3-carbinolo	Crucifere
MONOTERPENI	D-limonene	Olio di agrumi
ACIDI FENOLICI	Cucurmina	Cucurma, curry, mostarda
	Acido caffeico	Frutta, caffè, soia
	Acido ferulico	Frutta, soia
	Acido clorogenico	Frutta, caffè, soia

Da: Lorenzetti S., “Interazione tra contaminanti e/o fattori preventivi presenti nella dieta” (2007).

1.1 ANTIOSSIDANTI NELLA DIETA

L'*alfa-tocoferolo*, il maggiore costituente della vitamina liposolubile, nota come vitamina E, è considerato uno dei principali captatori di radicali liberi delle membrane e delle lipoproteine, che previene il danno ossidativo degli acidi grassi poliinsaturi delle membrane e delle proteine a elevato contenuto di tiolo (Southon S., 1996). L'osservazione che diete ricche di acidi grassi poliinsaturi (substrato per la perossidazione dei lipidi) danno luogo a un aumento delle lesioni dei tessuti in animali, in carenza di vitamina E, suffraga l'ipotesi di una funzione antiossidante da parte di quest'ultima. L'*alfa-tocoferolo* inibisce la perossidazione di lipidi eliminando radicali perossilici, che sono composti intermedi nel processo di lipoperossidazione. Il radicale *alfa-tocoferolo*, sebbene non completamente inerte, è molto meno reattivo di un radicale perossilico e, pertanto, rallenta la perossidazione.

L'*acido ascorbico*, vitamina idrosolubile C, è un buon captatore di numerose specie reattive dell'ossigeno in fase acquosa e contribuisce, probabilmente, a riciclare l'*alfa-tocoferolo in vivo* (Southon S., 1996). Tuttavia, in presenza di ferro o rame non legato, l'ascorbato può divenire un pro-ossidante, operando come agente riducente e generando superossido, radicali idrossilici e perossido di idrogeno. Normalmente, poiché la disponibilità di ioni metallici *in vivo* è limitata, predominano le proprietà antiossidanti della vitamina C. Tuttavia, nelle malattie e nelle lesioni tissutali, diventano disponibili i metalli di transfer, dando luogo a una probabile azione pro-ossidante della vitamina.

Negli ultimi anni i *carotenoidi*, in qualità di antiossidanti, hanno suscitato notevole interesse. Su 600 carotenoidi che si trovano in natura, solo una quarantina viene normalmente assunta dagli esseri umani, per lo più sotto forma di frutta e verdura come pigmenti colorati (Southon S., 1996).

In passato, oltre al loro potenziale di precursori della vitamina A, ai carotenoidi non è stato attribuito alcun ruolo nutrizionale. Tuttavia, dettagliati studi *in vitro* hanno dimostrato che i carotenoidi, con nove o più doppi legami coniugati, sono potenti neutralizzatori di ossigeno "singoletto" (1O_2). L'ossigeno "singoletto" si presenta biologicamente come forma eccitata dello stato fondamentale dell'ossigeno tripletto. Studi più recenti indicano che anche il beta-carotene ha la proprietà di *scavenger* (scaricatore) dei radicali perossilici (Southon S., 1996).

Nonostante gran parte delle ricerche abbiano focalizzato l'attenzione sul ruolo biologico del beta-carotene, è probabile che questo carotenoide non abbia un particolare effetto antiossidante in presenza di un'elevata pressione di ossigeno, come quella presente nel sangue e nei polmoni. È stato osservato che il licopene (prevalentemente presente nei pomodori e derivati) è il carotenoide più efficiente per quanto riguarda l'eliminazione di ossigeno "singoletto" e, ultimamente, è stato

dimostrato che la luteina (che abbonda, come il beta-carotene, nella maggior parte delle verdure gialle e verdi) è un antiossidante più efficiente del beta-carotene per quanto riguarda l'eliminazione dei radicali lipoperossidici (Southon S., 1996).

I *metalli*, formano parte integrante del sistema difensivo antiossidante enzimatico (Southon S., 1996). La catalasi è ferro-dipendente; gli enzimi superossido dismutasi possono essere zinco-, rame, o manganese-dipendenti, mentre la glutazione perossidasi è selenio-dipendente. Sono scarse, al momento, le prove di una pura attività antiossidante del ferro, dello zinco e del rame, mentre il selenio sembra emergere come fattore dietetico che può essere significativo nella prevenzione di tumori in determinate sedi.

I *flavonoidi polifenolici* (costituenti della dieta umana derivati dalle piante) vengono attualmente considerati anche in relazione alle loro proprietà antiossidanti (Southon S., 1996). I flavonoidi costituiscono un grande gruppo che fa capo ai polifenoli. I principali flavonoidi più ricorrenti derivati da piante sono le antocianine, le catechine, i flavoni, i flavonoli e le procianidine.

Fonti rilevanti di polifenoli sono la frutta a bacca, tè, birra, vino, olio d'oliva, cacao/ cioccolato, noci, arachidi, altri frutti e vegetali. Elevati livelli di polifenoli si trovano generalmente nelle bucce della frutta. Esistono più di duecento tipi di polifenoli nel vino rosso (Southon S., 1996).

È stato ipotizzato che molti dei componenti della dieta agiscano come antiossidanti inibendo il processo di lipoperossidazione e spazzando via i radicali dell'ossigeno (Southon S., 1996). I polifenoli sono in grado di agire come antiossidanti grazie alla capacità di cedere l'idrogeno dei loro gruppi fenolici. Un'altra proprietà è il loro potenziale di chelazione che può avere un ruolo nella protezione contro le reazioni dei radicali indotte dal rame o dal ferro. È stato suggerito che, i flavonoidi localizzati vicino alla superficie delle strutture fosfolipidiche, abbiano una posizione ideale per catturare i radicali di ossigeno generati in fase acquosa. Tuttavia, resta ancora in gran parte da conoscere, ed è attualmente oggetto di studio, in che misura questi composti vengano assorbiti e siano in grado di raggiungere potenziali siti di azione all'interno dell'organismo.

La produzione di sostanze antiossidanti o la realizzazione di prodotti alimentari che le contengono, su scala industriale, ha sicuramente rilevanti ricadute economiche. Le sostanze sopracitate, in particolare flavonoidi e polifenoli, sono presenti a concentrazioni particolarmente elevate in moltissime matrici vegetali, soprattutto prodotti ortofrutticoli. Frutta e verdura, quando sono trattati industrialmente, danno luogo a notevoli produzioni di scarti vegetali che sono ancora estremamente ricchi in sostanze antiossidanti. Il loro utilizzo per l'estrazione di composti bioattivi fornisce non solo il vantaggio di ottenere molecole preziose dal punto di vista salutistico, ma riduce anche i costi di smaltimento del rifiuto stesso.

1.2 LA VINACCIA

1.2.1 Caratteristiche generali e composizione

La vinaccia, immediato sottoprodotto della vinificazione, residuo della torchiatura, è il complesso delle parti solide dell'uva, quali bucce e relativi vinaccioli, in presenza o meno del raspo.

Essa rappresenta la materia prima per la produzione di grappa, conferita dalle cantine alle distillerie, dove viene stoccata in silos prima del processo di distillazione. Da notare che, anche la lavorazione di questo sottoprodotto è destinata ad ottenere una quantità non trascurabile di residuo di scarto, motivo per il quale tale matrice è stata utilizzata come substrato di sviluppo di batteri lattici isolati dall'ambiente enologico.

La componente principale della vinaccia, che contiene la maggior parte delle sostanze caratterizzanti la grappa, è la buccia dell'acino.

Le vinacce vergini diraspate presentano una composizione chimica che può variare a seconda di fattori quali l'andamento stagionale, il luogo di provenienza, la varietà del vitigno, il periodo della vendemmia e la diversa tecnica di vinificazione.

I principali composti chimici presenti nella vinaccia sono: acqua, cellulosa, zuccheri, acidi organici, sostanze azotate, pectine, acidi grassi, steroli, aldeidi, esteri, chetoni, sostanze polifenoliche, coloranti e aromatiche, sali minerali.

Acqua

È presente in grande quantità, come del resto in qualsiasi tessuto vegetale, essendo l'elemento indispensabile all'attività fisiologica. La sua percentuale dipende dallo stato di maturazione al momento della raccolta e dalle condizioni vegetative in cui la pianta si trova. La quantità di acqua della vinaccia è un parametro diverso dal valore dell'umidità di questa, dato che risente della presenza di mosto. Di conseguenza, nelle vinacce vergini, il valore dell'umidità e il contenuto zuccherino sono strettamente correlate: più elevato è il valore dell'umidità, maggiore è il pregio della vinaccia (De Rosa T., Castagner R., 1994).

Zuccheri

Gli zuccheri presenti nelle vinacce sono il glucosio e il fruttosio, in pari concentrazione, anche se i lieviti nella demolizione glucidica attaccano preferibilmente il glucosio, trasformandolo in alcol etilico, con un rendimento teorico del 60%.

Acidi

Rispetto al mosto, le vinacce presentano minore acidità titolabile e un più elevato valore di pH. L'acidità fissa (1-2%) è per lo più dovuta all'acido tartarico e in minor misura agli acidi malico, citrico e succinico, in gran parte salificati da potassio, calcio e magnesio (De Rosa T., Castagner R., 1994).

Il grado di acidità dipende dalla varietà dell'uva, dall'andamento stagionale (annate piovose corrispondono a valori più alti di pH) e dalla quantità di mosto che rimane inglobata nelle vinacce. Infatti, il pH del mosto oscilla tra valori di 2.8 e 3.2 e, di conseguenza, la vinaccia fermentata insieme al mosto avrà valori più bassi rispetto alla vinaccia, che può toccare livelli di pH compresi tra 3.8 e 5.5. A questi valori sono, inoltre, più attivi gli enzimi pectin-metil-esterasici, che idrolizzano le pectine liberando alcol metilico e quelli lipossigenasici, che attaccano gli acidi grassi insaturi della buccia con formazione di aldeidi dall'odore rancido (Odello L. *et al.*, 1997).

Avere delle vinacce con un buon valore di acidità è utile sia per l'azione selettiva operata sui lieviti interessati alla fermentazione alcolica, sia per l'azione inibente nei riguardi, principalmente, dei batteri Gram negativi. Inoltre, lunghi periodi di insilamento provocano sempre una perdita di acidità fissa, a causa di batteri che demoliscono parzialmente l'acido tartarico e altri acidi organici, come il malico, provocando aumenti in acidità volatile.

Composti polifenolici

I polifenoli sono un gruppo di sostanze chimiche ampiamente diffuse nel mondo vegetale, caratterizzati dalla presenza di più di un gruppo fenolico per molecola.

Nelle bucce e nei vinaccioli sono presenti sostanze polifenoliche e pigmenti coloranti. Le prime si trovano nelle bucce in percentuale compresa tra l'1 e il 2%, mentre nei vinaccioli il valore sale al 5-6%.

I principali pigmenti coloranti nelle uve rosse sono gli antociani; essi hanno proprietà antiossidanti, utili soprattutto durante i lunghi periodi di conservazione (De Rosa T., Castagner R., 1994). I flavonoidi determinano, invece, il colore delle uve bianche.

I tannini, forme polimeriche dei vari composti fenolici, si suddividono in:

tannini idrolizzabili o gallici (polimeri dell'acido gallico), detti anche tannini nobili perché derivano dal contatto col legno di rovere delle botti;

tannini condensati (o procianidine), polimeri di flavonoidi, che originano sia dall'uva che dai processi di polimerizzazione ossidativa in atto durante la fermentazione.

Sostanze pectiche

Le sostanze pectiche presenti nella buccia sono costituite da lunghe catene lineari di condensazione dell'acido galatturonico, le cui funzioni acide sono in parte libere e in parte esterificate con gruppi metilici.

L'azione enzimatica della pectin-metil-esterasi di origine vegetale, durante il periodo di stoccaggio, favorita dalle temperature di fermentazione e di distillazione, può contribuire a liberare una frazione elevata di alcol metilico (De Rosa T., Castagner R., 1994). La presenza di alcol metilico nelle vinacce è influenzata, pertanto, dalle modalità di insilamento (si forma più rapidamente nelle uve bianche che nelle rosse), dal metodo di lavorazione in cantina e dal tipo di vitigno.

Cellulosa

Il 10-20% delle bucce è composto da cellulosa, un polisaccaride e, più precisamente, un polimero lineare costituito da molecole di D-glucosio, unite con legami β -1,4-glicosidici. Ha un peso molecolare medio di 400000, corrispondente a circa 2800 unità di glucosio per molecola. Le fibre di cellulosa sono costituite da fasci di catene polisaccaridiche parallele, unite da legami idrogeno tra i gruppi ossidrilici su catene adiacenti. Questo tipo di struttura conferisce alle fibre di cellulosa un'elevata resistenza meccanica.

Altre caratteristiche di questa molecola sono l'insolubilità in acqua e la scarsa conducibilità termica, che la fanno ritenere un materiale coibente.

Sostanze aromatiche

Gli strati più interni della buccia sono sede della maggior parte degli aromi varietali o primari, ovvero di molecole odorose come linalolo, (responsabile dell'aroma del vino Moscato), nerolo, citronellolo e geraniolo, appartenenti per lo più alla famiglia dei terpeni. Questi, pur avendo un punto elevato (dai 150 ai 198°C), sono in grado di passare dalla vinaccia all'acquavite, rendendola riconoscibile organoletticamente (De Rosa T., Castagner R., 1994; Odello R. *et al.*, 1997). Non tutti i vitigni possiedono molecole aromatiche e questo consente la distinzione tra varietà a frutto neutro e varietà a frutto aromatico, come Moscato, Malvasia, Sauvignon e Traminer. Comunque, la dotazione aromatica delle uve dipende anche dalla fase di maturazione e dall'andamento stagionale: in particolare, le annate piovose influiscono negativamente sul livello dei terpeni.

I terpeni, sostanze aromatiche primarie localizzate negli strati più interni dell'epicarpo, si ritrovano, per il loro elevato punto di ebollizione, nelle code del distillato. Reazioni di ossidazione, che possono intervenire durante la fermentazione alcolica, possono modificare queste molecole aromatiche, producendo composti completamente privi di interesse organolettico e un prodotto alquanto scadente.

Gli aromi secondari, che evaporano soprattutto nelle prime fasi della distillazione e in quelle finali, sono costituiti da alcuni alcoli, esteri, acidi, aldeidi e chetoni, prodotti durante la fermentazione alcolica o dai lieviti. Tra questi, i maggiori responsabili di ciò che viene definito aroma secondario dei distillati sono sicuramente gli alcoli superiori e gli esteri etilici di alcuni acidi grassi a corta e medi catena (Carnacini A. *et al.*, 1986).

1.2.2 Composti bioattivi nei residui di lavorazione dell'uva (Casas *et al.*, 2008)

I principali composti bioattivi estraibili dai processi di trasformazione dell'uva sono polifenoli e più specificatamente resveratrolo, antocianine, procianidine, quercetine, catechine e olio di vinaccioli.

Le vinacce contengono quantità importanti di sostanze che hanno effetti benefici sulla salute quali fibre (17-21%), tannini (16-27%) e altri composti polifenolici (2-6.5%), grassi (7-12%), zuccheri (3%) e sali dell'acido tartarico. In particolare, i polifenoli (principalmente acido ellagico e quercetina) e resveratrolo hanno importanza rilevante per le loro proprietà antiossidanti e di riduzione dei radicali liberi (Amico *et al.*, 2004). Quindi, l'utilizzo dei residui di lavorazione dell'uva come materia prima per la produzione di composti bioattivi può costituire un'interessante alternativa.

Effetti metabolici conosciuti

Studi scientifici hanno dimostrato che i polifenoli possono avere caratteristiche antiossidanti, con potenziali effetti benefici per la salute, ad esempio possono ridurre il rischio di malattie cardiovascolari e di cancro. I polifenoli sono anche stati studiati come fonte addizionale di beneficio nei prodotti biologici, senza arrivare ancora ad evidenze conclusive. Essi possono legare il ferro non-eme, la forma meno assorbibile del ferro (il 60% circa del ferro contenuto nella carne ed il 100% del ferro contenuto nei cibi di origine vegetale, nel latte e nei suoi derivati è in questa forma) e diminuirne ulteriormente l'assorbimento nel corpo. La dose giornaliera consigliata di polifenoli del vino rosso è da 100 a 300mg, che corrisponde a circa due bicchieri di vino rosso al giorno.

Resveratrolo

Il resveratrolo (3,5,4' - triidrossistilbene) è un fenolo non flavonoide. La struttura è di tipo stilbenico, con uno scheletro composto da due anelli aromatici, uniti da un ponte metilenico, su cui si innestano 3 gruppi OH in posizione 3,5,4'.(figura 1.1).

Tale composto si trova nella buccia delle uve rosse ed è uno dei costituenti del vino rosso, ma in base ai risultati ottenuti con test su animali, il livello medio di resveratrolo nel vino non sembra essere sufficiente per giustificare il "paradosso francese" secondo cui l'incidenza di malattie

cardiovascolari è relativamente basso nella Francia meridionale nonostante l'abbondante uso nell'alimentazione di grassi saturi.

Il resveratrolo è prodotto da diverse piante, probabilmente per le sue proprietà antifungine. E' uno dei più importanti polifenoli dell'uva.. Il resveratrolo naturale può essere estratto dall'uva e dal vino rosso ma anche dalle radici.

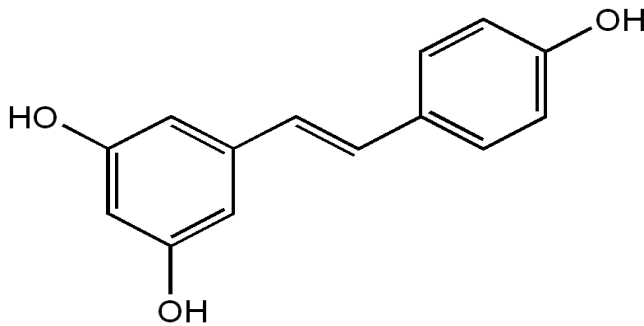


Figura 1.1: struttura chimica del resveratrolo
Da: Cabras P., Martelli A.: "Chimica degli alimenti" (2007)

Effetti metabolici conosciuti

Numerosi effetti benefici per la salute, quali effetti anti-cancro, antivirale, neuroprotettivo, anti-età, anti-infiammatorio e "allunga-vita" sono stati riscontrati in specie animali (es. ratti).

Il resveratrolo si è rivelato efficace contro disfunzioni e morte precoce delle cellule nervose, e in teoria potrebbe aiutare contro malattie quali il morbo di Huntington e il morbo di Alzheimer.

Anche in questo caso, il resveratrolo non è ancora stato testato sull'uomo per nessuna malattia.

Tuttavia, la quantità media di resveratrolo presente in qualsiasi vino, compresi vini fatti con ibridi americani, è trascurabile rispetto alla quantità che in teoria servirebbe per ottenere effetti benefici sulla salute: 1-10 milligrammi per litro di vino contro centinaia di migliaia di milligrammi al giorno.

Quantità di molecole estraibili

La quantità di resveratrolo nelle sostanze alimentari varia enormemente. I vini rossi comunemente ottenuti da viti europee contengono da 0.2 a 5.8 mg/L di resveratrolo, a seconda della varietà di uva, mentre i vini bianchi ne contengono molto meno: ciò è dovuto al fatto che il vino rosso si ottiene dalla fermentazione del mosto contenente le bucce d'uva ricche in resveratrolo, dalle quali la molecola viene estratta. Il vino bianco, al contrario, si ottiene fermentando il mosto dopo l'eliminazione delle bucce; il vino che si ottiene, perciò, risulterà particolarmente povero di resveratrolo. I vini prodotti da ibridi americani, sia rossi che bianchi, possono contenere più di 40 mg/L. Le bucce fresche di uva contengono da 50 a 100 microgrammi di resveratrolo per grammo.

1.2.3 Antocianine

Le antocianine (o antociani) sono pigmenti flavonoidi vacuolari solubili in acqua, di colore rosso o blu a seconda del pH. Sono sintetizzate da organismi del regno vegetale e da batteri, si trovano in tutti i tessuti delle piante superiori e sono responsabili della colorazione di foglie, gemme, radici, fiori e frutti.

Gli antociani sono composti poliaromatici poliossidrilati in grado di reagire con gli ossidanti quali l'ossigeno molecolare e i radicali liberi riducendo così i danni che queste molecole possono provocare alle cellule ed ai tessuti.

Grazie a queste loro attività antiossidanti e antiradicaliche, tali sostanze possono essere molto utili per i loro impieghi in medicina. Questi pigmenti sembrano proteggere contro la fragilità capillare e contro vari processi di invecchiamento o modificazioni cellulari provocati dall'ossigeno, tra cui processi infiammatori e modificazioni cancerogene. Alcune di queste attività sono le stesse riscontrate nel vino.

Questi pigmenti possono essere inoltre utilizzati come indicatori di pH, virando dal rosso al violetto o blu con l'aumentare dell'alcalinità dell'ambiente.

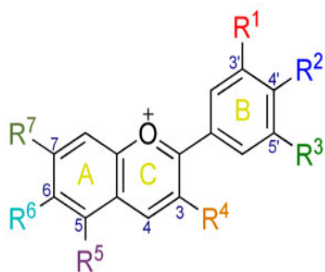
Gli antociani sono anche impiegati come additivi alimentari e in particolare costituiscono il *rosso antociano* (E163), usato in marmellate e altri alimenti normalmente con pH acido come lo yogurt.

Industrialmente, le antocianine si estraggono dalla buccia dell'uva rossa, come sottoprodotto dell'industria enologica. L'estrazione avviene con acidi diluiti e il prodotto è un liquido contenente zuccheri, acidi, sali e pigmenti originariamente presenti nella buccia. Per essiccazione, si ottiene una polvere idrosolubile relativamente ricca in questi pigmenti.

Struttura base delle antocianine

Le antocianine appartengono alla famiglia dei flavonoidi. Queste molecole sono costituite da una molecola di benzene fusa con una di pirano (anello eterociclico contenente ossigeno), collegata a sua volta con un gruppo fenilico che può essere a sua volta legato a diversi sostituenti. Questa molecola complessa prende il nome di **catione flavilio**, che è la struttura di base di tutte le antocianine.

Le antocianine derivano dai rispettivi agliconi (antocianidine), da cui si differenziano per l'aggiunta di un gruppo glicosile (uno zucchero), di norma in posizione R3 e/o R4 (figura **1.2**). In natura esistono circa una ventina di agliconi, mentre il numero dei derivati è fino a 15-20 volte maggiore. Tra i primi, più frequenti in natura vi sono: delphinidina, petunidina, cianidina, malvidina, peonidina e pelargonidina, i cui nomi derivano dalle piante di cui sono ricche.



Antocianidina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
Aurantidinina	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-OH
6-idrossi-Cianidina	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-OH
Cianidina	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
6-idrossi-Delfinidina	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH
Delfinidina	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
Europinidina	-OCH ₃	-OH	-OH	-OH	-OCH ₃	-H	-OH
Tricetinidina	-OH	-OH	-OH	-H	-OH	-H	-OH
Luteolinidina	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-H	-OH
Apigeninidina	-H	-OH	-H	-H	-OH	-H	-OH
Pelargonidina	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Malvidina	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
Peonidina	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Petunidina	-OH	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
Rosinidina	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OCH ₃

Figura 1.2. Antocianine presenti nell'uva e nel vino.

Da: Cabras P., Martelli A.: "Chimica degli alimenti" (2007)

Effetti metabolici conosciuti

Oltre al loro ruolo di regolatori di luce, le antocianine agiscono come potenti anti-ossidanti, aiutando a proteggere la pianta dai radicali formati per azione della luce UV e durante i processi metabolici. La proprietà anti-ossidante si mantiene anche dopo il loro consumo da parte di un altro organismo, il che fornisce un'ulteriore spiegazione del perché frutti e vegetali con la buccia rossa sono un'eccellente fonte nutrizionale. Inoltre, le antocianine esplicano importanti effetti anticancerogeni.

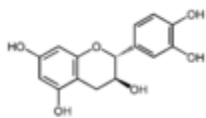
Quantità di molecole estraibili

Mentre si possono estrarre da 30 a 75mg di antocianine da 100g di uva rossa, se ne possono estrarre circa 24 / 35mg da 100g di vino rosso.

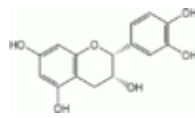
1.2.4 Proantocianidine

Le proantocianidine, un'altra classe di flavonoidi, sono polimeri delle catechine (figura 1.3), tanto che sono conosciute anche come proantocianidine oligomeriche (OPC). Furono scoperte nel 1936 dal professor J. Masquelier, che fu il primo a sviluppare le tecniche di estrazione delle proantocianidine da certe specie vegetali. I flavonoidi sono composti essenziali, in quanto il corpo umano non è capace di produrli, ma ne ha bisogno per sopravvivere. Si trovano in diverse piante e vengono chiamati "sostanza vegetale secondaria". A causa delle non corrette abitudini alimentari di oggi, la maggior parte delle persone non ne assume quantità sufficienti.

Le proantocianidine si possono trovare in molte piante, soprattutto nella corteccia del pino, nei vinaccioli, nella buccia dell'uva, e nei vini rossi. Dal momento che elevate concentrazioni di OPC si ritrovano solo in alcune parti di piante quali corteccia, semi e bucce, è praticamente impossibile ottenere la quantità necessaria di OPC dalla nostra dieta quotidiana. In particolare i vinaccioli, che contengono elevate quantità di OPC, sono presenti raramente nell'alimentazione, in quanto la maggior parte delle uve da tavola commercializzate sono senza semi. Anche gli effetti benefici del vino rosso (Paradosso Francese) sono riconducibili al suo contenuto di OPC. Un consumo quotidiano di vino tuttavia non è sufficiente a fornire la quantità necessaria di OPC, in quanto sarebbe necessario consumare giornalmente due litri di vino pro capite.



(+) catechina



(-)-epicatechina

Figura 1.3. Monomeri delle proantocianidine.

Da: Cabras P., Martelli A.: "Chimica degli alimenti" (2007)

Effetti metabolici conosciuti

Le OPC sono un potente antiossidante, in grado di ridurre i radicali liberi all'interno dell'organismo. I radicali liberi sono prodotti dal normale metabolismo dell'ossigeno, così come dall'esposizione al sole, ad agenti chimici, nicotina, alcool, batteri, parassiti, alcuni acidi grassi e molte altre sostanze. I radicali liberi distruggono la membrana cellulare, danneggiano il collagene e altri tessuti connettivi, interrompono importanti processi fisiologici e creano mutazioni nel DNA delle cellule. Collagene e elastina sono le cosiddette proteine del tessuto connettivo. Con l'età questi tessuti si ossidano, diventano rugosi e rigidi e perdono la loro elasticità. In combinazione con la vitamina C, le OPC creano un ambiente favorevole per la biosintesi di nuovo collagene ed elastina. Gli effetti antiossidanti delle OPC e la loro affinità con i tessuti connettivi sono i motivi che ne giustificano l'utilizzo. La stabilizzazione di collagene ed elastina rende la pelle giovane e liscia. Studi sperimentali hanno recentemente scoperto che l'ossidazione del colesterolo LDL è uno dei principali responsabili dell'indurimento delle arterie e di malattie cardiache. Le OPC si sono rivelate antiossidanti molto efficaci e per questo diversi i medici prescrivono, prodotti a base di OPC nella cura delle malattie vascolari.

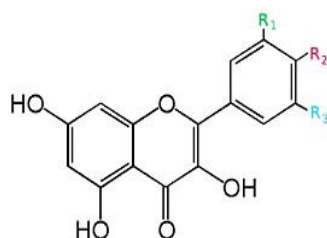
Altri studi sperimentali hanno dimostrato che le OPC sono in grado di ridurre l'attività tumorale. Tuttavia, gli antiossidanti non possono essere considerati effettivamente una cura contro il cancro, ma hanno piuttosto effetti preventivi e fortificano il sistema immunitario bilanciando la dieta quotidiana. Diversi studi sperimentali hanno dimostrato che i vegetali hanno un'importante funzione di prevenzione contro il cancro. L'effetto positivo è dovuto, infatti, alla presenza di sostanze vegetali secondarie come ad esempio il gruppo di flavonoidi a cui le OPC appartengono. Si ritiene che il dosaggio ideale di OPC sia da 1 a 3mg di OPC per kg di peso corporeo al giorno.

Quantità di molecole estraibili

Si possono estrarre 84mg di OPC da 100g di vinaccioli di Pinot nero essiccati.

1.2.5 Quercetina

La quercetina è un flavonoide e più specificatamente un flavonolo (figura 1.4). In molti studi, la quercetina è risultata il più attivo dei flavonoidi in studio e molte piante medicinali devono gran parte della loro attività al loro elevato contenuto in quercetina.



Flavonoli	R₁	R₂	R₃
Quercitina	-OH	-OH	-H
Campferolo	-H	-OH	-H
Mirecitina	-OH	-OH	-OH
Isoramnetina	-H	-OH	-OCH ₃

Figura 1.4. Flavonoli dell'uva e del vino

Da: Cabras P., Martelli A.: "Chimica degli alimenti" (2007)

Effetti metabolici conosciuti

La quercetina ha dimostrato significativa attività anti-infiammatoria in quanto inibisce l'inizio di molti processi infiammatori. Ad esempio, inibisce sia la produzione, sia il rilascio di istamina e di altri mediatori allergico/infiammatori. Inoltre, esercita una potente attività antiossidante ed un'azione protettiva nei confronti della vitamina C.

La quercetina può avere effetti positivi nel combattere o nell'aiutare a prevenire il cancro, prostatiti, malattie cardiache, cataratta, allergie/infiammazioni, e malattie di tipo respiratorio quali bronchite o asma.

1.2.6 Acidi fenolici delle uve e dei vini

Le uve e i vini contengono acidi fenolici di tipo benzoico e cinnamico, la cui concentrazione varia da 100 a 200 mg/l nei vini rossi e da 10 a 20 mg/ml nei vini bianchi. Sono noti sette acidi del tipo benzoico (C₆-C₁) (figura 1.5), due dei quali, l'acido salicilico (acido orto-idrossibenzoico) e l'acido genticico (acido 2,5-deidrossibenzoico) sono allo stato di tracce. Essi differiscono per il grado e per la natura dei sostituenti dell'anello benzenico e si trovano nell'uva soprattutto sotto forma di eterosidi, da cui sono liberati per idrolisi acida, e di esteri (tannini gallici ed ellagici), da cui sono liberati per idrolisi alcalina. Le forme libere sono maggiormente presenti nei vini rossi, a causa dell'idrolisi delle loro forme combinate e di reazioni di degradazione di molecole più complesse, in particolare gli antociani, sotto l'azione del calore (Galvin, 1993)

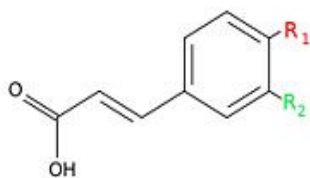
Nelle uve e nei vini sono presenti anche acidi fenolici del tipo cinnamico (C6-C3) (figura 1.6). Essi si trovano sotto forma esterificata essenzialmente con l'acido tartarico, o come eterosidi del glucosio, mentre le forme libere sono poco rappresentate.



Acidi benzoici	R₁	R₂	R₃	R₄
Acido para idrossibenzoico	-H	-H	-OH	-H
Acido protocatetico	-H	-OH	-OH	-H
Acido vanillico	-H	-OCH ₃	-OH	-H
Acido gallico	-H	-OH	-OH	-OH
Acido siringico	-H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃
Acido salicilico	-OH	-H	-H	-H
Acido gentisico	-OH	-H	-H	-OH

Figura 1.5. Acidi fenolici delle uve e dei vini.

Da: Cabras P., Martelli A.: "Chimica degli alimenti" (2007)



Acidi cinnamici	R₁	R₂
Acido cinnamico	-H	-H
Acido p-cumarico	-OH	-H
Acido ferulico	-OH	-OCH ₃
Acido caffeico	-OH	-OH

Figura 1.6. Acidi cinnamici delle uve e dei vini.
 Da: Cabras P., Martelli A.: "Chimica degli alimenti" (2007)

1.3 IL RADICCHIO

Il radicchio (*Cichorium intybus*), orticola appartenente alle cicorie, comprende alcuni tipi con piante a foglie rosse e altri con foglie più o meno intensamente variegate. Si ritiene che tutte le cultivar attualmente in coltura derivino da individui a foglie rosse, riconducibili al radicchio di Treviso che, spontanei in Oriente, sarebbero stati introdotti in Europa intorno al XV secolo. Informazioni più precise circa l'origine di questa coltura si hanno però soltanto a partire dal XVI secolo, quando la specie iniziò a essere coltivata nel Veneto, dove si diffuse piuttosto rapidamente tanto che, anche al momento attuale, viene considerata una specialità quasi esclusiva di alcuni ambienti tipici di questa regione (Pimpini *et al.*,2003).

Al genere *Cichorium* appartengono 7 o 8 specie, tra le quali, sotto il profilo orticolo, rivestono particolare importanza *C. endivia* e *C. intybus*. Alla specie *C. intybus* afferiscono tipi con piante a foglie verdi, variegate, o rosse: questi ultimi, si ritiene derivino dalla varietà botanica *foliosum*, mentre quelli a foglie variegata o screziate sembrano provenire da incroci spontanei, avvenuti in provincia di Treviso verso la fine del XVIII secolo, tra le piante di "Rosso di Treviso" e la scarola (Pimpini *et al.*,2003).

Il colore delle varietà rosse è determinato soprattutto dalla presenza di pigmenti idrosolubili, detti antocianine, di cui è stata dimostrata una loro attività antiossidante degna di nota.

Nella tabella 2 viene riportata la composizione chimica tipica del radicchio rosso.

Tabella 1.2. Composizione chimica del radicchio rosso

Componente	Valore per 100g di parte edibile
Acqua	94 g
Proteine	1,4 g
Lipidi	0,1 g
Glucidi disponibili:	3 g
amido	1,6 g
solubili	0 g
fibra	1,6 g
Energia	13 Kcal
	52 Kj
Sodio	10 mg
Potassio	240 mg
Ferro	0,3 mg
Calcio	36 mg
Fosforo	30 mg
Tiamina (vit. B1)	0,07 mg
Riboflavina (vit. B2)	0,05 mg
Niacina (vit. PP)	0,3 mg
Vitamina A	tracce

Da: "Agricoltura e gastronomia su Internet"

La produzione su scala mondiale, del prodotto tal quale, è stata stimata intorno alle 250.000 tonnellate, per l'anno 2007. La materia prima, quindi, è destinata a una prima lavorazione di preparazione, che comporta l'ottenimento di scarti costituiti dalle foglie più esterne o presentanti difetti vari. È proprio per la disponibilità di scarti, la cui quantità stimata, per l'anno 2007, era di circa 10 tonnellate per ettaro (Lante *et al.*, 2007), che questa pianta orticola è risultata di estremo interesse per l'estrazione di sostanze bioattive di cui è particolarmente ricca. Inoltre, come si può osservare dalla sua composizione chimica (tabella **1.2**), il radicchio può essere utilizzato come substrato per la crescita di microrganismi in grado di potenziare l'effetto dei composti bioattivi in esso presenti.

1.3.1 Composizione e quantificazione dei maggiori composti fitochimici del radicchio (Rossetto *et al.*, 2005)

Lo spettro UV-visibile, nell'intervallo tra 200 e 800 nm di otto varietà di radicchio, mostra che tutti i radicchi rossi sono caratterizzati da un massimo assorbimento, nella regione del visibile, a 535 nm, corrispondente al picco di assorbimento della cianidina 3-glucoside. Viceversa, gli estratti delle varietà verdi non mostrano assorbimento significativo a questa lunghezza d'onda.

La composizione in acidi fenolici delle otto cultivar, espressa come micromoli per grammo di peso fresco, è stata determinata tramite i cromatogrammi HPLC. Un esempio di cromatogramma di un radicchio rosso è riportato in figura **1.7A,B**, in cui si può notare un elevato contenuto di acidi benzoici e idrossicinnamici, la cui struttura chimica è rappresentata nelle figure **1.5** e **1.6**.

L'analisi HPLC conferma che il maggior componente della classe delle antocianidine è la cianidina, in varie forme glicosilate (figura **1.7C**). Infatti, in tutte le varietà di radicchio rosso esaminate, le cianidine glicosilate rappresentano l'83-89% delle antocianine totali, su una base molare.

La malvidina (come aglicone e 3-glucoside), che ha un intervallo tra il 4 e l'8.3% delle antocianine totali, è stata trovata come il secondo componente di questa classe nei radicchi rossi.

Riguardo alle cianidine, il picco maggiore è stato attribuito alla cianidina 3-malonilglucoside.

Sulla base dei dati HPLC delle cultivar studiate, la concentrazione è stata espressa come cianidina 3-glucoside ed è stata calcolata ad un'assorbanza di 535 nm, usando cianidina 3-glucoside come standard.

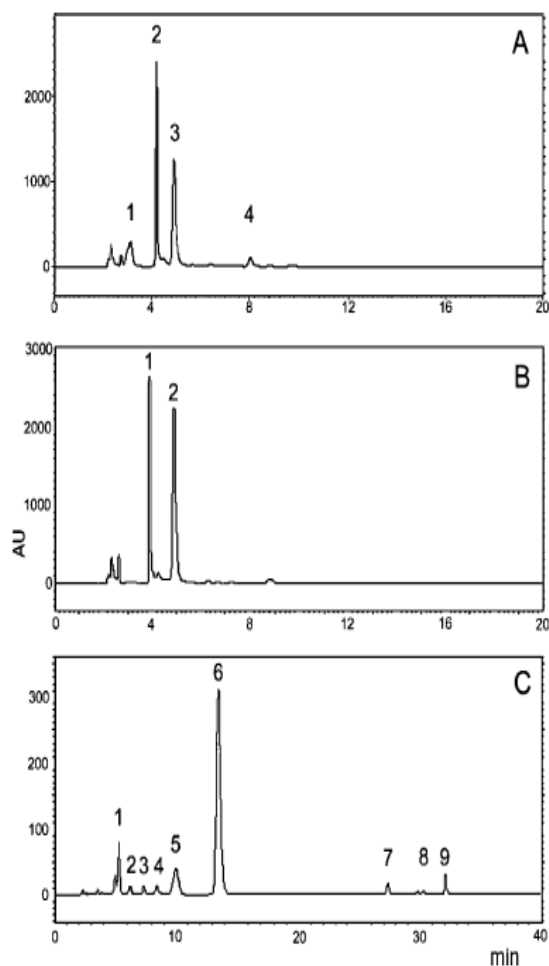


Figura 1.7. Profili HPLC del radicchio rosso di Verona giovanile.

Picchi identificati con la rilevazione a 275 nm (1, acido gallico; 2, acido protocatecico; 3, acido clorogenico; 4, acido caffeico).

Picchi identificati con la rilevazione a 330 nm (1, acido cicorico; 2, acido clorogenico).

Picchi identificati con la rilevazione a 550 nm (1, cianidina 3-O-glucoside; 2, cianidina 3-O-rutinoside; 3, pelargonidina 3-O-glucoside; 4, feonidina 3-O-glucoside; 5, malvidina 3-O-glucoside; 6, cianidina 3-malonilglucoside; 7, pelargonidina; 8, feonidina, 9, malvidina).

Da Rossetto M.: “*Red chicories as Potent Scavengers of Hight Reactive Radicals: A study on Their Phenolic Composition and Peroxyl Radical Trapping Capacity and Efficiency*”. Journal of agricultural and food chemistry (2005).

La composizione fenolica delle otto cultivar, espressa come micromoli per grammo di peso fresco, è riportata in tabella 1.3. In relazione ai polifenoli, dai dati riportati appare che l’acido clorogenico è il maggior componente all’interno delle otto cultivar studiate (da solo costituisce infatti una percentuale compresa tra il 37 e il 60% circa dei polifenoli totali) mentre l’acido gallico è il secondo maggior componente in quasi tutte le varietà studiate. Sono state ritrovate tracce (meno del 2% dei polifenoli totali) di acidi siringico, vanillico e *p*-cumarico in qualche estratto di radicchio, ma la loro

presenza è trascurabile. Le antocianine costituiscono il 15-17% dei polifenoli totali, calcolati su base molare, se si esclude il radicchio rosso tardivo di Treviso, che è molto meno colorato. Infatti, in questa cultivar, le antocianine rappresentano solo il 9% dei polifenoli totali. Al contrario, le antocianine diventano componenti minoritarie (l'1,5%) nella varietà maculata (varietà di Castelfranco) e sono trascurabili nei radicchi verdi (bianco di Chioggia e Grumolo verde).

Tabella 1.3. Composizione fenolica di alcune varietà di radicchio^a

radicchio	antoci anine ^a	acido gallico ^b	acido protocatetico ^c	acido caffeico ^c	acido cicorico ^c	acido clorogenico ^c	polifenoli totali ^d
Variegato Castelfranco	0,06	0,83	0,79	0,29	0,53	1,45	3,95
Rosso di Verona	1,86	0,92	1,67		0,84	7,08	12,37
Rosso di Chioggia	1,25	0,55	0,99	0,36	0,68	3,49	7,32
Bianco di Chioggia		0,75	0,87		0,46	1,22	3,30
Rosso di Treviso precoce	0,77	0,47	1,12		0,61	2,37	5,34
Rosso di Treviso tardivo	0,36	0,55	0,73		0,30	1,88	3,82
Grumolo verde		2,29	1,96	0,29	1,29	4,48	10,31
Grumolo rosso	3,12	1,82	1,24		1,26	12,23	19,67
Rosso di Verona giovanile	1,93	0,83	3,14	0,17	3,06	15,59	24,72
Rosso di Treviso giovanile tardivo	1,51	4,57	2,20		1,90	3,47	13,65

^aDeviazione standard dei dati di composizione fenolica era <10%. ^bEspresso come cianidina-3 glucoside (umol/g di peso fresco), dalle analisi spettrofotometriche. ^cMicromoli per grammo di peso fresco, dalle analisi HPLC. ^dMicromoli per grammo di peso fresco, calcolate dalla somma dei diversi polifenoli.

Da Rossetto M.: "Red chicories as Potent Scavengers of Hight Reactive Radicals: A study on Their Phenolic Composition and Peroxyl Radical Trapping Capacity and Efficiency". Journal of agricultural and food chemistry (2005).

Degli acidi fenolici tipici di radicchio, riportati in tabella 1.3, molti sono presenti anche in altri prodotti vegetali e, in particolare, nell'uva (paragrafo 1.2.2). La figura successiva riporta la struttura chimica degli acidi fenolici tipici del radicchio, ovvero l'acido cicorico e l'acido clorogenico.

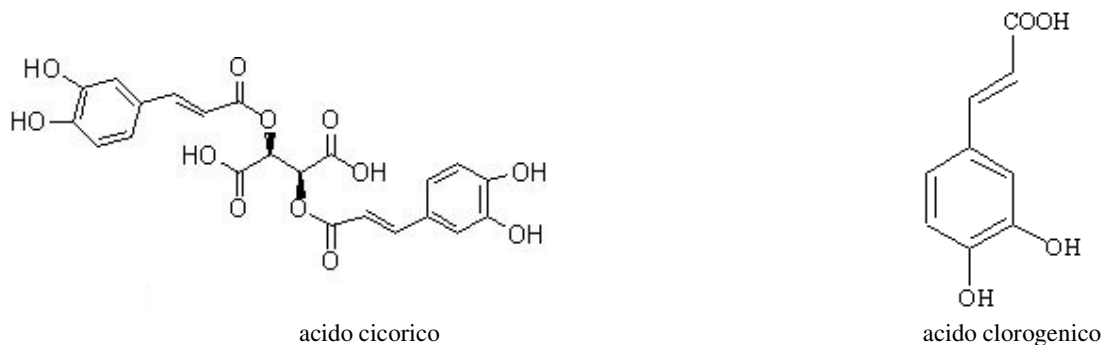


Figura 1.8. Struttura chimica degli acidi fenolici caratteristici del radicchio.

Da: Cabras P., Martelli A.: "Chimica degli alimenti" (2007)

1.4 MICRORGANISMI COINVOLTI NELLA PRODUZIONE DI COMPOSTI BIOATTIVI: I BATTERI LATTICI

I batteri lattici sono usati da lungo tempo come colture starter nella produzione di alimenti fermentati. Queste colture sono generalmente designate per conferire ai cibi sicurezza, *shelf-life*, efficacia tecnologica ed economica. Oltre a queste proprietà tradizionali, i ceppi batterici per le colture starter selezionati in tempi molto recenti sono anche in grado di eliminare i rischi di produzione, da parte del metabolismo batterico, di sostanze considerate nocive per l'uomo quali le amine biogene, in particolare istamina, oppure di limitare la diffusione di antibiotico resistenze, in quanto ne sono privi. Inoltre, sono oggetto di studio le nuove "colture starter funzionali", in grado di proteggere i prodotti alimentari da batteri dannosi, grazie alla rapida acidificazione o alla produzione di sostanze antimicrobiche (batteriocine). Le colture selezionate possono apportare anche benefici diretti alla salute dell'uomo, come nel caso dei microrganismi probiotici, o della produzione di sostanze di origine microbica ad azione nutraceutica negli alimenti in cui tali batteri sono contenuti.

Inoltre, sono allo studio prodotti ottenuti, con l'utilizzo in matrici alimentari, di sostanze che hanno la funzione di favorire, o addirittura incrementare, lo sviluppo di microrganismi starter o, in generale, con funzioni salutistiche.

Caratteristiche generali dei batteri lattici

I batteri lattici sono quei microrganismi che per fermentazione degli zuccheri producono prevalentemente acido lattico. Sono Gram positivi, anaerobi, anaerobi aerotolleranti o microaerofili, asporigeni, catalasi negativi, con eccezione di alcune specie del genere *Pediococcus*, (la catalasi è l'enzima che libera ossigeno molecolare da acqua ossigenata), hanno esigenze nutritive complesse e le loro cellule possono avere forma coccica o bastoncellare. Fra i batteri lattici si trovano sia specie termofile che mesofile, con ottimi compresi, quindi, tra i 45° e i 25°C. Si suddividono in omolattici e eterolattici: i primi producono quasi esclusivamente acido lattico dalla degradazione degli zuccheri, riducendo il pH dell'ambiente in cui crescono, i secondi, oltre all'acido lattico, producono acido acetico, etanolo, anidride carbonica ed altri composti secondari. La loro crescita causa un abbassamento del pH del terreno di crescita che inibisce lo sviluppo di molti microrganismi patogeni (Zambonelli, 1998).

I batteri lattici sono ubiquitari e sono normalmente presenti nei prodotti alimentari, come ad esempio derivati del latte, cibi fermentati e vegetali; essi intervengono in numerosi processi fermentativi naturali e trovano largo uso nelle industrie alimentari e in altre attività. In alcuni casi, i batteri lattici e, in particolare, alcune specie del genere *Enterococcus* e tutte quelle del genere

Streptococcus, ad eccezione di *S. thermophilus*, possono provocare danni o patologie nell'uomo.

Nel presente lavoro, sono stati oggetto di studio ceppi appartenenti a tre specie isolate da vinacce d'uva: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus hilgardii* e *Oenococcus oeni*.

Il genere *Lactobacillus* consta di circa 140 specie, di cui la maggior parte è di importanza industriale (Singh *et al.*, 2008). Essi fanno parte della flora naturale di una gamma di prodotti alimentari, come latte crudo, latticini fermentati, frutta, vegetali, prodotti carnei e sono anche utilizzati come starter per la produzione di cibi fermentati, oltre che per migliorare la qualità o aggiungere benefici alla salute del consumatore. Queste specie, di importanza economica, presentano spesso caratteristiche fenotipiche e fisiologiche simili, probabilmente dovute alla loro evoluzione nelle stesse nicchie ecologiche (Singh *et al.*, 2008) e, per questo, sono difficili da differenziare. Ciò richiede, pertanto, metodi avanzati per la loro appropriata identificazione e caratterizzazione.

Lactobacillus plantarum è una delle specie del genere *Lactobacillus* più diffusa e si trova in svariati prodotti alimentari. Questo microrganismo presenta forma bastoncellare, cresce a 15 ma non a 45°C e produce isomeri D e L dell'acido lattico; in particolare è un omofermentante facoltativo, ovvero, in carenza di zuccheri, si comporta come un eterofermentante producendo acido acetico, etanolo e acido formico (eventualmente può fermentare anche zuccheri pentosi in mancanza di esosi), mentre, se la concentrazione di zuccheri esosi è elevata, trasforma il glucosio in acido lattico. *L. plantarum* presenta uno dei più grandi genomi noti tra i batteri lattici e costituisce una specie molto flessibile e versatile (Zambonelli, 1998).

Tale batterio è in grado di respirare l'ossigeno: questo, una volta consumato, viene convertito in perossido di idrogeno, che agisce come sostanza in grado di inibire gli altri batteri competitori per le fonti di nutrimento. Al posto della protezione data dall'enzima superossido dismutasi, presente in quasi tutte le altre cellule ossigeno-tolleranti, questo organismo accumula quantità millimolari di manganese polifosfato, che protegge la cellula dai danni dell'ossigeno (Zambonelli, 1998).

L. plantarum è un batterio lattico versatile, riscontrato in un'ampia gamma di nicchie ambientali che comprende latticini, carni e molti vegetali fermentati (tabella 1.4). Inoltre, tale specie è comunemente presente nel tratto gastro-intestinale umano (de Vries M. C. *et al.*, 2006). Tuttavia, *L. plantarum* può essere coinvolto nella contaminazione dei cibi, come ad esempio carne (Borcha *et al.*, 1997), vino (Beneduce *et al.*, 2004) o succo di arancia (Alwazeer *et al.*, 2003). L'analisi genomica, recentemente effettuata, di un ceppo di *L. plantarum* isolato da saliva umana (Kleerebezem *et al.*, 2003), ha confermato che questo microrganismo ha capacità di assorbire e utilizzare molti zuccheri diversi, di trasportare all'interno della cellula peptidi e di sintetizzare molti aminoacidi. Inoltre, il relativamente alto numero di geni codificanti funzioni di regolazione indica

l'abilità ad adattarsi a molte condizioni diverse. Tutto questo, nell'insieme, si riflette sulla capacità di tale specie di crescere in un'ampia gamma di nicchie ambientali. L'alto numero di geni codificanti per proteine di membrana potrebbero essere implicati in funzioni di ricognizione, o essere in grado di legare alcuni componenti nell'ambiente. Le proteine codificate da questi geni, infatti, mostrano elevata omologia con quelle in grado di formare legami con mucose, aggregazioni e adesioni con altre cellule (Vries *et al.*, 2006).

Tabella 1.4. Prodotti alimentari contenenti *L. plantarum*

Materia prima	Prodotto
Prodotti vegetali	Olive
	Chicchi di cacao
	Cassava
	Crauti
	Togwa
	Vino
Prodotti lattiero-caseari	Formaggio Stilton
	Formaggio feta
Prodotti carnei	Salsiccia fermentata
	essiccata
	Salsiccia italiana fermentata

Da: de Vries M. C. *et al.* 2008, "Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: a review. *Food Science and technology*, 1-10.

Lactobacillus. hilgardii è un'altra specie del genere *Lactobacillus* che presenta caratteristiche simili a quelle di *L. plantarum*, ma si distingue per il tipo di fermentazione, essendo un eterofermentante obbligato, in grado cioè di utilizzare il glucosio e produrre acido lattico, acido acetico, etanolo e anidride carbonica, ma può fermentare anche i pentosi per produrre acido lattico e acido acetico. Tale batterio è stato frequentemente isolato come contaminante del vino (Zambonelli, 1998).

Di questa specie, si possono citare gli effetti che diverse concentrazioni di due sostanze polifenoliche, (+) catechina e acido gallico, esercitano sulla crescita e il metabolismo di un ceppo di *Lactobacillus hilgardii* (Farias *et al.*, 2002). Questi composti fenolici, aggiunti in un mezzo di crescita (FT80) alle concentrazioni in cui sono normalmente presenti nel vino, non solo stimolano lo sviluppo, ma portano anche a una maggiore densità cellulare raggiunta in fase stazionaria di crescita. Durante le prime fasi di crescita (generalmente nella prima ora), è stato dimostrato, infatti, che entrambi i composti fenolici migliorano la velocità di utilizzazione di glucosio e fruttosio e solo la catechina aumenta la velocità di consumo dell'acido malico. I composti fenolici non solo sembrano influenzare la crescita di *L. hilgardii*, ma anche la formazione della putrescina, un'ammina biogena prodotta da tale batterio. La formazione di putrescina, infatti, diminuisce in seguito all'aggiunta, nel mezzo di crescita, degli acidi protocateutico, vanillico e caffeico e dei flavonoidi catechina e rutina, alle medesime concentrazioni in cui questi sono normalmente presenti nei vini

(Arena *et al.*, 2007).

Come altra considerazione riguardo a tale specie, in coltura mista di *L. hilgardii* X1B e di *Leuconostoc oenos* X2L, isolati da un vino argentino, come risposta di crescita è stato osservato che il ceppo di *L. oenos* non era cresciuto, poiché a 24 ore di incubazione non furono rilevate cellule vitali. Sia in coltura pura che mista, il ceppo di *L. hilgardii*, invece, aveva prodotto perossido di idrogeno già dalle prime fasi di crescita, raggiungendo il massimo sviluppo a 24 ore. I valori di minima concentrazione inibitoria (MIC) e minima concentrazione battericida (MBC), indotte dall'azione del perossido di idrogeno contro la crescita di *L. oenos*, sono stati 4,08 ug/ml e 17000 ug/ml, rispettivamente (Rodriguez *et al.*, 1995).

Oenococcus oeni è l'unica specie del genere *Oenococcus* (Dicks *et al.*, 1995), che comprende batteri di forma coccica, disposti a coppie o catenelle, Gram positivi, immobili, asporigeni, anaerobi aerotolleranti, eterofermentanti (glucosio → acido D-lattico 50%min + acido acetico + alcol etilico + anidride carbonica). Il loro sviluppo, sebbene lento, è favorito in mezzi con pH intorno a 4.2-4.8, contenenti succo di pomodoro. La temperatura ottimale di crescita è compresa tra i 18° e i 24°C e la richiesta di fattori di accrescimento e aminoacidi è molto complessa. Le complesse esigenze nutrizionali, a base di carboidrati, minerali, composti azotati e altre sostanze, fanno sì che questa specie sia presente frequentemente nell'uva e nel vino, che rappresentano infatti un mezzo nutritivo idoneo al loro sviluppo grazie alla presenza di aminoacidi, vitamine e composti fermentescibili quali zuccheri, acido malico, acido citrico, acido tartarico. L'importanza di questa specie di batteri lattici è dovuta al fatto che è responsabile della fermentazione malolattica del vino. Questa, non è una vera e propria fermentazione, bensì una degradazione dell'acido L-malico ad acido L-lattico, con liberazione di CO₂. Quest'acido organico non è utilizzabile come unica fonte di energia, ma stimola notevolmente la crescita batterica se viene degradato in presenza di glucosio (van Leeuwenhoek, 1999).

Questi microrganismi sono capaci di svilupparsi a pH relativamente bassi (pH del vino 3,5-3,7), dannosi invece per gli altri lattobacilli. Perché la fermentazione malolattica avvenga però, sono necessarie alcune condizioni chimico-fisiche fondamentali: temperatura minima di 18-20°C, concentrazione molecolare di anidride solforosa inferiore a 0,6 mg/l, concentrazione di etanolo inferiore al 10-13% v/v e assenza di residui zuccherini nel vino (che porterebbero ad una fermentazione vera e propria) (van Leeuwenhoek, 1999).

Molte cantine preferiscono ormai inoculare il vino con ceppi selezionati di batteri malolattici che facilitano la partenza della fermentazione malolattica e garantiscono l'assenza di composti indesiderati come metaboliti secondari (per esempio le ammine biogene, tossiche) (Zambonelli, 1998).

Tra le caratteristiche possedute dalle specie fino ad ora descritte e, in generale, dai batteri lattici, vi è quella di produrre batteriocine, sostanze battericide secrete da questi microrganismi, quando si trovano in condizioni di competizione per il substrato con altri batteri, che sono in grado di inibire la crescita di batteri appartenente alla stessa specie, o a specie diverse (Cotter *et al.*, 2005).

Le batteriocine sono peptidi o proteine con attività antimicrobica. Molti batteri lattici producono batteriocine con uno spettro di azione piuttosto largo. Diverse batteriocine di batteri lattici offrono potenziali applicazioni nella conservazione degli alimenti e l'uso di batteriocine nell'industria alimentare può aiutare a ridurre l'aggiunta di conservanti chimici, così come l'intensità dei trattamenti termici, con il risultato che i cibi possono essere conservati in modo più naturale, conservando proprietà organolettiche e nutrizionali. Ciò può essere, inoltre, un'alternativa nel soddisfare l'aumento della richiesta, da parte dei consumatori, di cibi pronti, cibi trattati con processi minimi, prodotti nuovi (ad esempio ad acidità più bassa o con un più basso contenuto di sale), oltre che garantire una maggior sicurezza. L'elevato spettro delle batteriocine presenta i più ampi usi potenziali, mentre uno spettro ristretto può essere usato, più specificamente, per inibire selettivamente certi batteri patogeni nei cibi, come *Listeria monocytogenes*, senza attaccare i microbi innocui (Cotter *et al.*, 2005).

Le batteriocine possono essere aggiunte ai cibi nella forma di preparazioni concentrate, additivi o ingredienti, oppure possono essere prodotte *in situ* da starter batteriogenici. Le batteriocine immobilizzate possono, inoltre, trovare applicazione per lo sviluppo di packaging alimentari bioattivi (Cotter *et al.*, 2005).

Negli ultimi anni, l'applicazione di batteriocine, come parte della tecnologia "ad ostacoli", ha ottenuto grande attenzione. Diverse batteriocine mostrano effetti additivi o sinergici, quando sono usate in combinazione con altri agenti antimicrobici, come conservanti chimici, composti polifenolici naturali, così come altre proteine antimicrobiche. Ciò può evitare, inoltre, lo sviluppo di ceppi resistenti. (Cotter *et al.*, 2005).

La combinazione di batteriocine con trattamenti fisici come l'alta pressione o i campi elettrici pulsati può offrire buone opportunità per molte conservazioni efficaci dei cibi, fornendo anche una difesa addizionale contro strutture batteriche resistenti come le endospore (Cotter *et al.*, 2005).

L'efficacia delle batteriocine è spesso dipendente da fattori ambientali come temperatura, pH, composizione e struttura del cibo, così come dai microrganismi presenti nel prodotto. Gli alimenti possono essere considerati, infatti, ecosistemi in cui le interazioni microbiche possono avere una grande influenza sul bilanciamento delle specie microbiche presenti e sulla proliferazione di batteri benefici o nocivi. Riguardo a quest'ultimo aspetto, è stato dimostrato, ad esempio, come il ceppo NC8 di *L. plantarum* fosse incapace di produrre batteriocine quando veniva fatto crescere da solo in

brodo coltura. Tuttavia, la coltura dello stesso ceppo, con alcuni batteri Gram positivi, o l'aggiunta di cellule uccise con il calore di alcuni ceppi in coltura liquida, stimolava la produzione di batteriocine (Maldonado et al., 2004b).

2. SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro di tesi presenta i seguenti obiettivi principali:

1. esplorare la possibilità che due matrici vegetali, costituite da radicchio e vinaccia, possano essere utilizzate come substrato per la crescita di batteri,
2. valutare l'effetto che la crescita microbica determina sui composti bioattivi presenti, quali polifenoli e antociani dotati di una già nota attività antiossidante.

A questo scopo sono state avviate fermentazioni utilizzando diverse specie microbiche. Successivamente, l'attenzione è stata focalizzata su ceppi appartenenti alle specie *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus hilgardii* e *Oenococcus oeni*, che hanno dimostrato le migliori capacità di acidificazione delle matrici vegetali. A fine fermentazione gli estratti sono stati analizzati e il livello di attività antimicrobica, in grado di inibire lo sviluppo di batteri patogeni e contaminati e di attività antiossidante, sono stati confrontati con quelli posseduti dalla matrice non fermentata. Infine, i polifenoli e gli antociani presenti nei singoli estratti sono stati separati mediante HPLC ed è stata saggiata l'attività antiossidante e antimicrobica dei componenti ignoti del cromatogramma.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Ceppi utilizzati e isolamento

Per il monitoraggio della capacità acidificante e, quindi, per procedere alla fermentazione delle matrici alimentari prescelte, sono stati utilizzati i seguenti microrganismi:

12 ceppi di *Lactobacillus plantarum*, 9 ceppi di *Lactobacillus hilgardii* e 10 ceppi di *Oenococcus oeni*, tutti riportati in Tabella 1.

Tali batteri sono stati tutti isolati da vinacce.

Il procedimento di isolamento prevede la crescita in terreno selettivo (MRS agar, Oxoid), dal quale si procede prelevando dalla piastra una colonia isolata, stemperandola in 5ml di MRS liquido e incubando a 30°C per 24 ore, per *Lactobacillus plantarum* e per *Lactobacillus hilgardii*. Nel caso di *Oenococcus oeni*, invece, è stato utilizzato MRS addizionato a succo di pomodoro, con pH corretto a 5,0 e incubato a 30°C, per 24.

Dopo 24 ore di crescita, il surnatante della coltura, preventivamente centrifugata, è stato eliminato, il pellet risospeso in 1ml di glicerolo al 80% a cui è stato aggiunto 1ml di MRS liquido. La sospensione batterica concentrata, così ottenuta, è stata trasferita in provette sterili da 2ml e conservata in congelatore ad una temperatura di -80°C.

<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Oenococcus oeni</i>
T30PCP06	TGMMRS06	T30PCM01
T30PCP07	TGMMRS08	T30PCM02
T30PCP14	TGMMRS11	T30PCM03
T30PCP22	TGMMRS12	T30PCM04
T30PCP05	TGMMRS13	T30PCM10
T30PCP01	TGMMRS25	T4MMRS51
T4MPCP71	TGMMRS27	T4MMRS55
T4MPCP69	TGMMRS35	T4MMRS60
T4MPCP77	TGMMRS41	T4MMRS80
T4MPCP78		T4MMRS91
T4MPCP72		
T4MPCP73		

Tabella 1. Ceppi di batteri lattici utilizzati

3.2 Terreni e condizioni di crescita dei batteri lattici

MRS agar e liquido, preparati secondo la formula di De Man, Rogosa e Sharp, sono terreni selettivi indicati per l'isolamento dei batteri lattici. La loro composizione è riportata nell'Allegato I. MRS, addizionato con succo di pomodoro, è stato utilizzato per la crescita di *O. oeni*, che va preparato come l'MRS, più l'aggiunta del 10% di succo di pomodoro.

La temperatura di incubazione con cui sono stati fatti crescere i ceppi delle tre specie testate, era di 30°C; la durata relativa ai tempi di crescita era variabile a seconda delle specie, dato che i ceppi di *L. plantarum* dopo 24 ore avevano ottenuto già un idoneo sviluppo, mentre, *L. hilgardii* e *O. oeni* richiesero, rispettivamente, 2 giorni e una settimana.

3.3 Preparazione inoculo

Per l'avvio della fermentazione sono stati prelevati 80 µl di coltura proveniente dai gliceroli a – 80°C, inoculati in 8 ml di MRS liquido, o MRS addizionato a succo di pomodoro, in base alla specie utilizzata e incubati a 30°C per 24 ore. Prima di procedere con l'inoculo della matrice vegetale è stata effettuata la quantificazione, mediante conta su piastra, della concentrazione di cellule e la misurazione della densità ottica allo spettrofotometro, a 600nm, della coltura per ogni singolo ceppo, dopo incubazione, per poter valutare e confrontare i valori di crescita alle opportune diluizioni. Una volta raggiunto il valore di riferimento sono state eseguite le opportune diluizioni ed è stato effettuato un inoculo pari a 10⁵cfu/ml finale.

3.4 Trattamento della matrice vegetale (radicchio)

Trenta grammi di radicchio, precedentemente privato delle foglie esterne, sono stati pesati e lavati. Successivamente, è stato aggiunto un volume di acqua fisiologica (0,9% NaCl) uguale al peso rilevato. La miscela è stata omogeneizzata in un frullatore per 2 minuti e suddivisa in aliquote da 30ml all'interno di provette sterili monouso. In certi casi, è stato necessario sottoporre le aliquote di omogeneizzato ad una pasteurizzazione, a 72°C per 10 minuti, a bagnomaria.

Il valore di pH della matrice vegetale non inocolata, è stato misurato sia prima che dopo la pastorizzazione; parte del radicchio non inocolato è stato ugualmente incubato e tenuto come campione di riferimento.

Dopo aver effettuato la pastorizzazione è stata effettuata la semina delle aliquote rimanenti, con i batteri lattici, utilizzando un inoculo pari all'1% corrispondente a 10⁵cfu/ml nella matrice vegetale. Il radicchio così trattato è stato incubato a 30°C. Durante questa fase è stato monitorato l'andamento del pH a 24, 48, 72 e 96 ore, o oltre, quando necessario.

La capacità acidificante dei ceppi di *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus hilgardii* è stata testata anche su terreno di coltura MRS liquido, mentre nel caso di *Oenococcus oeni* in MRS addizionato con succo di pomodoro.

Per quanto riguarda le vinacce, sono stati effettuati gli inoculi soltanto con *L. plantarum*, monitorando i valori di pH negli stessi tempi di quanto effettuato per il radicchio.

3.5 Preparazione degli estratti

Raggiunto un valore di pH stazionario, il radicchio e la vinaccia inoculati e i rispettivi controlli non inoculati, sono stati sottoposti a centrifugazione di 5,000 g, per 15 min, allo scopo di recuperare il surnatante, del quale 2 ml sono stati prelevati ed usati in seguito per le analisi in HPLC. Il resto del surnatante è stato congelato e trasferito nel liofilizzatore, in cui è rimasto per 4 giorni consecutivi, fino a completa essiccazione. Successivamente, ciascun liofilizzato è stato risospeso in acqua deionizzata sterile, in modo da ottenere una concentrazione finale pari a 200mg/ml e tenuto a -80°C, fino al momento dell'esecuzione delle prove antimicrobiche e antiossidanti.

Questa procedura è stata seguita sia per i fermentati di radicchio e vinaccia che per le colture in MRS e MRS addizionato con succo di pomodoro.

3.6 Batteri indicatori prova antimicrobica dei fermentati

Per valutare la capacità dei batteri lattici di produrre delle sostanze in grado di inibire lo sviluppo di altri microrganismi è stata utilizzata una serie di batteri come indicatori, in particolare:

- *Bacillus amyloliquefaciens* (DSM 7)
- *Bacillus subtilis* subs. *subtilis* (DSM10)
- *Pseudomonas fluorescens* (DSM50090)
- *Lactobacillus helveticus* (ceppo tipo)
- *Lactobacillus delbrueckii* (ceppo tipo)
- *Saccharomyces cerevisiae* (ceppo tipo)
- *Streptococcus thermophilus* (ceppo tipo)
- *Staphylococcus xylosus* DSM20266
- *Listeria innocua* DSM20649
- *Escherichia coli* (ceppo tipo)
- *Gluconobacter* spp.
- *Tatunella tiseus*
- *Acetobacter aceti*
- *Leuconostoc* spp.

- *Lactobacillus plantarum*

Tutti i batteri elencati sopra corrispondono al ceppo tipo (ovvero già sperimentato in laboratorio) o a uno noto delle rispettive specie, ad eccezione degli ultimi 5, che sono microrganismi isolati da vinaccia destinata alla produzione di grappa, all'inizio del periodo di stoccaggio. Per effettuare la prova ciascun ceppo è stato inoculato nel proprio terreno di coltura, a partire dallo *stock* in glicerolo, e incubato alle temperature opportune. I terreni utilizzati sono stati: BHI (*Brain Heart Infusion*, Oxoid) per *L. innocua* e *E. coli*; MRS per *L. helveticus*, *L. delbrueckii* e *L. plantarum*; CB (*Corynebacterium Broth*, Oxoid) per *S. xylosus*, M17 (Oxoid) per *Strep. thermophilus*; NB (Nutrient Broth, Oxoid) per *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, e *P. fluorescens*. *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *Strep. thermophilus* e *E. coli* sono stati incubati ad una temperatura di 37°C, le restanti specie a 30°C. È stato utilizzato anche il ceppo tipo di lievito *Saccharomyces cerevisiae*, cresciuto in YMB (*Yeast Mould Broth*, Oxoid), ad una temperatura di incubazione di 30°C, per 24 ore. La descrizione della composizione esatta di ciascun terreno è presente nell' Allegato I.

I batteri lattici sono stati incubati in anaerobiosi, mentre quelli aerobi o i lieviti sono stati incubati, sotto agitazione, all'apposita temperatura. Dopo incubazione *over-night*, 100µl della prima diluizione decimale di ciascuna coltura sono stati trasferiti e spalmati, tramite spatola, su piastre contenenti terreni colturali adatti alla loro crescita, come descritto sopra. Successivamente, sono stati preparati dei dischetti di diametro di 6 mm, precedentemente sterilizzati, sui quali sono stati appoggiati 20µl di estratto. Tetraciclina e cicloesimide (entrambe alle concentrazioni di 100 µg/ml) sono state usate come controlli positivi e acqua distillata come controllo negativo. Da sei a nove dischetti sono stati messi su ciascuna piastra, che sono state incubate alla temperatura e alle condizioni adatte per ciascun batterio.

Dopo 24 ore di incubazione è stata verificata la presenza di aloni sulla piastra e, se presenti, ne è stato misurato il diametro.

3.7 Determinazione della produzione di batteriocine

Gli estratti ottenuti da colture in MRS e MRS addizionato con succo di pomodoro e risultati positivi nella prova antimicrobica sono stati trattati con proteinasi K, per poter stabilire se l'attività antimicrobica era da attribuire a sostanze di natura proteica, come le batteriocine.

Per la digestione enzimatica sono stati utilizzati 160 µl di estratto risospeso, a cui sono stati addizionati 40 µl di buffer fosfato alla concentrazione di 50 mM, a pH 7,5, contenente l'enzima ad una concentrazione di 10mg/ml. La soluzione è stata incubata a 30° C, per 4 ore e, successivamente, è stata determinata l'attività antimicrobica, come descritto precedentemente (Drosinos *et al.* 2006) .

3.8 Attività antiossidante

Per effettuare questa prova è stato scelto il metodo che utilizza DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl, Sigma) e che consente di valutare l'attività antiossidante, attraverso una determinazione spettrofotometrica. 2 ml di una soluzione contenente DPPH, risospeso in metanolo, alla concentrazione di $6 \cdot 10^{-6}$ mM, sono stati aggiunti a 1 ml di ciascun estratto, direttamente all'interno di una cuvetta. La soluzione è stata conservata al buio per 15 minuti; alla fine dell'incubazione di tale periodo è stata effettuata la misurazione allo spettrofotometro.

E' stata utilizzata, come bianco, una soluzione in cui al posto dell'estratto è stato aggiunto un egual volume di acqua. Quando il DPPH reagisce con un composto antiossidante, che può donare idrogeno, esso viene ridotto. Questa reazione determina un cambiamento di colore, dal violetto scuro al giallo, la cui intensità viene misurata allo spettrofotometro, ad una lunghezza d'onda di 515nm alla luce (Miliauskas *et al.* 2004). Tutte le analisi sono state eseguite usando una concentrazione iniziale di estratto pari a di 200mg/ml. Quando ritenuto opportuno, in base all'assorbanza misurata, sono state eseguite diluizioni dei campioni .

Per il calcolo dell'attività antiossidante è stata utilizzata la seguente formula:

$$\% \text{ Inibizione} = [(A_B - A_A) / A_B] * 100$$

dove:

A_B : assorbanza del DPPH utilizzato come bianco al tempo zero;

A_A : assorbanza del campione in esame dopo 15 minuti.

3.9. Analisi dei polifenoli e antociani tramite HPLC

Gli estratti liofilizzati dei ceppi di *L. plantarum* e *L. hilgardii*, cresciuti in radicchio e in MRS, sono stati sottoposti ad analisi HPLC come descritto da Lante *et al.*, 2005.

4. RISULTATI

4.1 Valutazione della crescita di microrganismi tecnologicamente rilevanti in radicchio

Durante la prima fase della sperimentazione è stata valutata l'attività fermentativa di una serie di microrganismi in esame, inoculati in una varietà di radicchio (rosso di Chioggia). Oltre alla quantificazione dello sviluppo microbico, tramite conta su piastra, durante tutta la fase, di crescita è stato determinata l'entità dell'abbassamento del pH dovuto all'attività fermentativa.

Come già detto nella parte introduttiva, il radicchio è una matrice vegetale che presenta fonti glucidiche potenzialmente fermentescibili, inoltre possiede attività antiossidante dovuta alla presenza di una consistente frazione polifenolica.

I microrganismi utilizzati sono riportati in tabella **4.1**: la loro scelta è dovuta al fatto che sono tutti dotati di metabolismo fermentativo, tanto che alcuni sono molto importanti dal punto di vista tecnologico (*Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) in quanto utilizzati in diverse produzioni nel settore agro-alimentare. In particolare, *S. cerevisiae* è il lievito più utilizzato nell'industria alimentare, impiegato nella produzione di bevande alcoliche, prodotti da forno, ecc. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Strep. thermophilus*, sono batteri lattici usati nelle culture starter per la produzione dello yogurt e di diversi formaggi. *Lactobacillus plantarum* è considerato ubiquitario ed è stato isolato in ambienti vari, come intestino e molte matrici vegetali; *Lactobacillus hilgardii* fa parte della microflora autoctona delle matrici vegetali ed è considerato, assieme a *L. plantarum*, uno dei batteri più coinvolti nella contaminazione dei prodotti.

Tabella 4.1. Microorganismi valutati e motivazioni della loro scelta

Microorganismi	Importanza tecnologica o ambientale
<i>S. cerevisiae</i>	Agente della fermentazione alcolica impiegato nella produzione di bevande alcoliche, prodotti da forno, ecc.
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Starter di fermentazione nel settore lattiero-caseario
<i>Strep. thermophilus</i>	Starter di fermentazione nel settore lattiero-caseario
<i>L. hilgardii</i>	Costituente della microflora naturale di matrici vegetali
<i>L. plantarum</i>	costituente della microflora naturale di matrici vegetali

La prova è stata condotta inoculando i suddetti microrganismi, alle medesime concentrazioni (10^5 CFU/ml), in un omogeneizzato contenente radicchio, in rapporto 1:1 w/w con della soluzione

fisiologica (NaCl 0,9%), tal quale o pastorizzato. Il trattamento termico è stato effettuato in quanto poteva rivelarsi necessario nel caso in cui la carica microbica di partenza della matrice fosse troppo elevata e, quindi, in grado di ostacolare la crescita dell'inoculo. Per la valutazione dell'attività fermentativa è stato misurato periodicamente il pH. L'acidificazione del mezzo di crescita, infatti, è la principale conseguenza dell'attività di fermentazione dei batteri lattici, con produzione di acidi organici (acido lattico e acetico). Ad ogni campionamento, per ciascuna matrice inoculata e per i controlli, è stata effettuata anche la determinazione della concentrazione cellulare mediante conta su piastra (CFU/ml).

Nella figura 4.1 viene riportato l'andamento fermentativo (valutato mediante misurazione del pH) dei microrganismi saggiati in omogeneizzato di radicchio non pastorizzato:

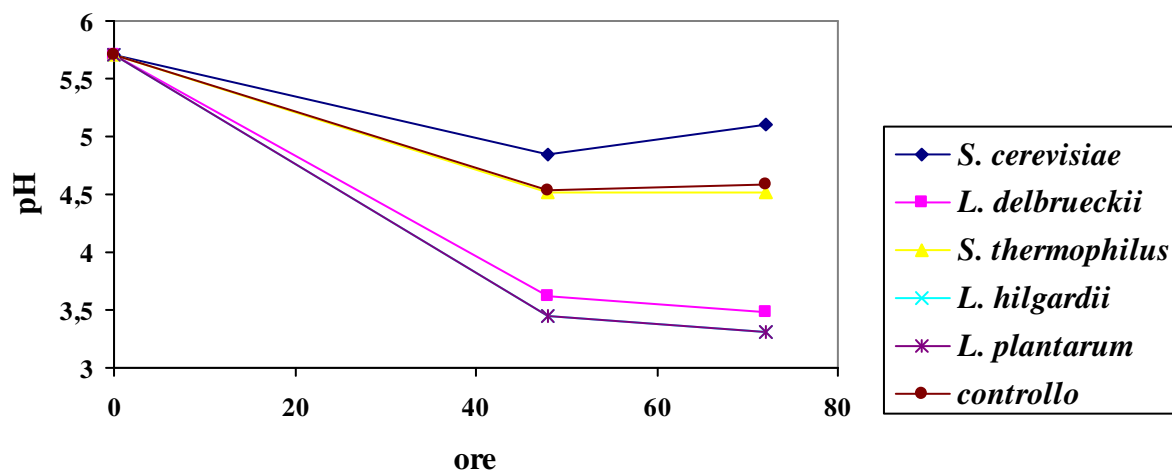


Figura 4.1. Abbassamento del pH in radicchio non pastorizzato, durante un tempo di tre giorni, ad opera dei microrganismi saggiati.

Come si può notare dall'andamento delle curve di acidificazione, i microrganismi che fermentano meglio sono *L. plantarum* e *L. hilgardii*. Questi determinano, infatti, un abbassamento di pH, dopo un tempo di 72 ore, pari a 3,31 unità; seguono *L. delbrueckii* (pH 3,49 dopo 72 ore), quindi, *Strep. thermophilus* e *S. cerevisiae*: questi ultimi presentano a fine fermentazione, rispettivamente, valori di pH pari a 4,52 e 5,11. Riguardo al controllo, ovvero il radicchio non pastorizzato e neppure inoculato,

questo presenta un pH finale pari a 4,59, mentre il valore iniziale era di 5,7. Ciò sta ad indicare che la microflora indigena in grado di svilupparsi non utilizza la fermentazione degli zuccheri come principale sistema per la produzione di energia.

La conferma dell'avvenuto sviluppo dei microrganismi inoculati è stata ottenuta dall'analisi della frazione coltivabile, valutata sui rispettivi terreni di crescita e riportata in tabella 4.2:

Tabella 4.2. Concentrazioni (CFU/ml) dei microrganismi inoculati in radicchio non pastorizzato

Microrganismo	Mezzo colturale di crescita*	0h	48h	72h
<i>S. cerevisiae</i>	YM	10^5	$1,24 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$
<i>L. delbrueckii</i>	MRS	10^5	$2,79 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^9$
<i>Strep. thermophilus</i>	M17	10^5	$2,45 \cdot 10^7$	$2,18 \cdot 10^7$
<i>L. hilgardii</i>	MRS	10^5	$3 \cdot 10^9$	$4 \cdot 10^9$
<i>L. plantarum</i>	MRS	10^5	$3 \cdot 10^9$	$4 \cdot 10^9$
controllo non pastorizzato	PCA	$4 \cdot 10^4$	$1,74 \cdot 10^8$	$1,23 \cdot 10^8$

*La determinazione è stata effettuata in mezzi colturale selettivi specifici per ciascun microrganismo, mentre, per il controllo non pastorizzato, la carica microbica è stata valutata in terreno Plate Count Agar (PCA).

I dati ottenuti confermano che le specie *L. plantarum* e *L. hilgardii* sono i microrganismi che crescono meglio in questo tipo di substrato. *S. cerevisiae*, invece, è quello che in tale matrice presenta la concentrazione di cellule più bassa anche dopo 72 ore. Per quanto riguarda l'attività fermentativa condotta dagli stessi microrganismi in matrice pastorizzata, nella figura 4.2 sono riportate le curve di acidificazione.

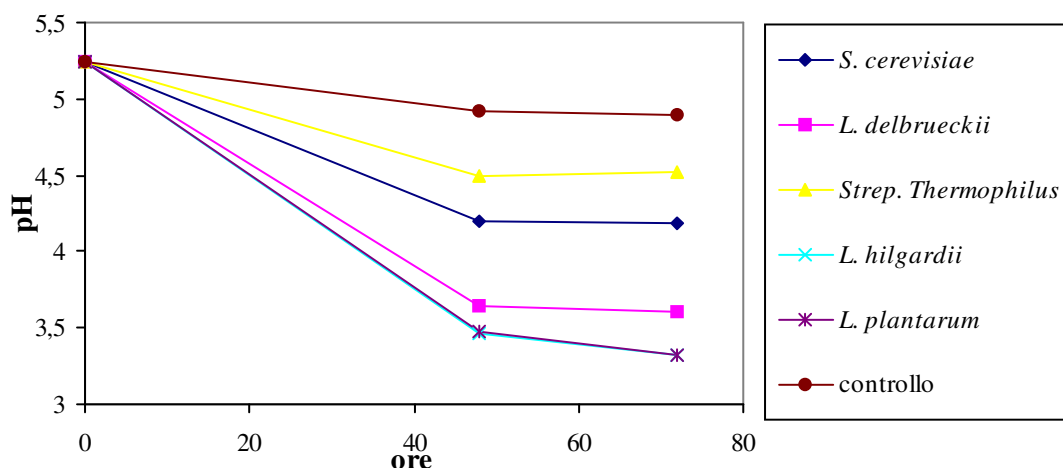


Figura 4.2. Abbassamento del pH in radicchio pastorizzato, durante un tempo di tre giorni, ad opera dei microrganismi testati.

Come si può rilevare dal grafico sopra riportato, i microrganismi che meglio acidificano sono, anche in questa situazione, *L. plantarum* e *L. hilgardii*, che determinano un abbassamento di pH analogo a quello verificatosi in radicchio non pastorizzato; anche *L. delbrueckii* e *S. thermophilus* acidificano in modo molto simile rispetto a quanto avvenuto nella stessa matrice non pastorizzata. Al contrario, l'unico microrganismo che mostra migliori capacità di acidificazione rispetto alla situazione precedente è *S. cerevisiae*. Il pH a fine fermentazione infatti, scende fino a 4,19, una unità sotto il valore ottenuto nella crescita in radicchio non pastorizzato. In questo caso sembra che l'eliminazione di gran parte dei microrganismi indigeni mediante pasteurizzazione renda il lievito molto più competitivo. Infine, il radicchio pastorizzato, utilizzato come controllo, subisce una variazione di pH minima, visto che, da un valore pari a 5,24, questo scende poco al di sotto di 5. Nella tabella 4.3 è riportata l'evoluzione delle popolazioni inoculate nella matrice di radicchio pastorizzato.

Tabella 4.3. Valori delle conte cellulari (CFU/ml) su piastra, dei microrganismi inoculati in radicchio pastorizzato

Microrganismo	Mezzo colturale di crescita*	0h	48h	72h
<i>S. cerevisiae</i>	YM	10 ⁵	9,3*10 ⁷	8,5*10 ⁷
<i>L. delbrueckii</i>	MRS	10 ⁵	2,64*10 ⁹	2,87*10 ⁹
<i>Strep. thermophilus</i>	M17	10 ⁵	2,35*10 ⁷	2,04*10 ⁷
<i>L. hilgardii</i>	MRS	10 ⁵	3,3*10 ⁹	4*10 ⁹
<i>L. plantarum</i>	MRS	10 ⁵	3,5*10 ⁹	4*10 ⁹
controllo pastorizzato	PCA	non rilevata	2,6*10 ⁵	1*10 ⁶

*La conta di ogni microrganismo viene effettuata in mezzo colturale selettivo, mentre, per il controllo pastorizzato, la carica microbica viene determinata in terreno Plate Count Agar (PCA).

La conta su piastra conferma che, tranne *S. cerevisiae*, i microrganismi non crescono in maniera più vigorosa rispetto a quanto avvenuto in radicchio non pastorizzato. Sembra, perciò, che i microrganismi inoculati siano estremamente competitivi e riescano a controllare lo sviluppo della microflora indigena. Sulla base di questi risultati, il proseguimento dell'esperienza sperimentale è stato focalizzato sulla determinazione dell'attività fermentativa, sempre in radicchio pastorizzato e non pastorizzato, delle specie di *L. plantarum* e *L. hilgardii*, considerando che, tra i microrganismi testati in questa matrice, sono quelli che acidificano meglio e crescono più vigorosamente.

4.2 Prove di fermentazione di *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus hilgardii* in radicchio

Nel presente paragrafo, sono riportati i risultati inerenti alla valutazione dell'attività fermentativa di *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus hilgardii*, in omogeneizzato di radicchio rosso di Chioggia pastorizzato e non pastorizzato. Come già dimostrato, (**paragrafo 4.1**), tali microrganismi sono quelli caratterizzati dalle prestazioni di crescita e di acidificazione migliori. Al fine di valutare meglio l'attività fermentativa, la valutazione della capacità acidificante e la crescita sono state effettuate a intervalli determinati, per un tempo complessivo di 44 ore, una durata che, come rilevato in **paragrafo 4.1**, è in grado di comprendere quasi completamente il periodo di sviluppo, nel caso dei suddetti microrganismi. Nel grafico successivo è possibile osservare l'andamento dei valori di pH, attraverso le misurazioni effettuate a 4, 20, 24, 28 e 44 ore (i valori iniziali di pH sono stati 5,5 per il radicchio non pastorizzato e 5,12 per quello pastorizzato).

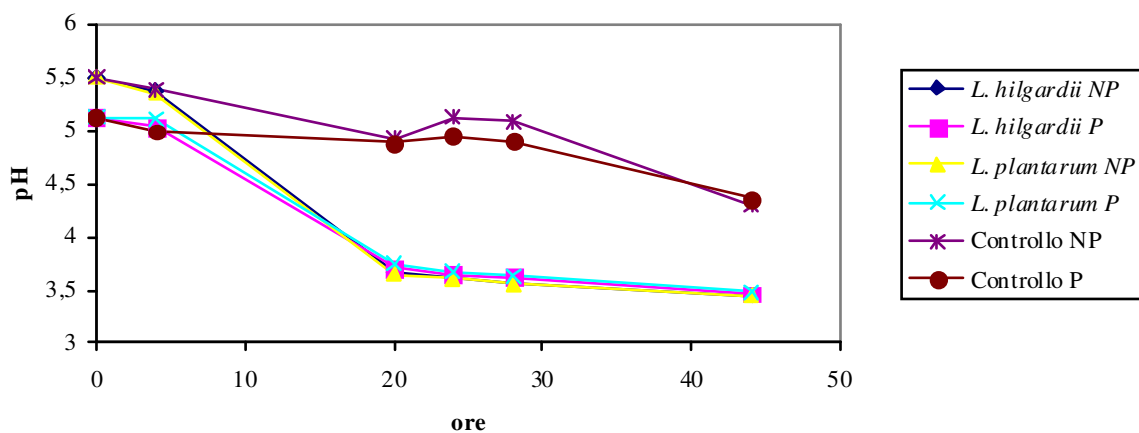


Grafico 4.3. Andamento delle curve di acidificazione relative a *L. plantarum* e *L. hilgardii*, inoculati in omogeneizzati di radicchio pastorizzato (P) e non pastorizzato (NP).

L'evoluzione delle curve di acidificazione mostra come, sebbene la matrice pastorizzata sia dotata di un pH inferiore all'inizio della prova, la differenza tra l'andamento del radicchio inoculato pastorizzato e quello delle corrispondenti prove con matrice non pastorizzata, si riduce progressivamente. Dopo 20 ore di incubazione, infatti, gli andamenti sono sovrapponibili e rimangono tali fino alla fine della prova. Dopo 44 ore di incubazione, tutte le matrici inoculate presentano pH compresi tra 3,44 e 3,48, mentre gli omogeneizzati non inoculati hanno valori intorno a 4,30.

La conferma dell'avvenuta crescita, a partire dagli inoculi, è stata ottenuta mediante conta su piastra della popolazione presente, effettuata agli stessi intervalli di tempo delle rilevazioni di pH.

Tabella 4.4. conte cellulari (CFU/ml) su piastra di *L. plantarum* e *L. hilgardii* inoculati in radicchio pastorizzato (P) e non pastorizzato (NP)

Microorganismo	0h	4h	20h	24h	28h	44h
<i>L. hilgardii</i> NP*	2,9*10 ⁵	2,9*10 ⁷	6*10 ⁸	1,88*10 ⁹	5,7*10 ⁸	1,46*10 ⁹
<i>L. hilgardii</i> P*	2,9*10 ⁵	1,5*10 ⁷	5*10 ⁸	1,26*10 ⁹	1,1*10 ⁹	6,6*10 ⁸
<i>L. plantarum</i> NP*	2,5*10 ⁵	4*10 ⁶	4*10 ⁸	8,2*10 ⁸	7,4*10 ⁷	7,4*10 ⁸
<i>L. plantarum</i> P*	2,5*10 ⁵	2,07*10 ⁷	6*10 ⁸	2,78*10 ⁹	2,2*10 ⁸	1,3*10 ⁹
controllo NP [†]	1,8*10 ⁶	2*10 ⁶	6*10 ⁸	2,16*10 ⁹	3,2*10 ⁹	1,93*10 ⁹
controllo P [†]	non rilevata	8*10 ⁴	2*10 ⁸	4*10 ⁸	2*10 ⁹	1*10 ⁹

*La conta cellulare dei campioni inoculati è stata effettuata su piastre contenenti terreno selettivo per batteri lattici, MRS.

[†]La carica microbica del radicchio non pastorizzato e pastorizzato è stata effettuata su piastre contenenti terreno PCA, mentre su terreno MRS non è stata rilevata crescita.

Il passo successivo è stato quello di valutare l'eventuale attività antimicrobica e antiossidante dei surnatanti, ottenuti dalla centrifugazione del fermentato e comparare i risultati con quelli del controllo non inoculato. Si suppone, infatti, che in virtù della rilevante capacità fermentativa, queste due specie di batteri lattici abbiano la possibilità di modificare la composizione del substrato, a favore dell'eventuale produzione di sostanze dotate di proprietà bioattive **Poiché le prove di attività antimicrobica e antiossidante hanno dato esito negativo**, è stato deciso di sottoporre i surnatanti a un trattamento di liofilizzazione che ha come scopo quello di concentrare le sostanze presenti. I liofilizzati così ottenuti sono stati risospesi, in acqua distillata, a una concentrazione di 200mg/ml, e utilizzati nelle successive prove, per valutare l'attività antimicrobica e antiossidante. In particolare, i liofilizzati saggiati sono stati quelli ottenuti dopo 44 ore di incubazione, Questo preciso tempo di incubazione è stato scelto anche in tutte le prove successive.

La valutazione dell'attività antiossidante è stata determinata mediante il test DPPH, che consente di stabilire, in maniera rapida e piuttosto attendibile, l'eventuale azione antiossidante manifestata dalla sostanza in esame. La tabella successiva mostra i valori, espressi in percentuale, di inibizione del DPPH, riconducibili all'attività antiossidante posseduta dai liofilizzati in esame. L'attività, anche se non troppo elevata, sembra essere posseduta solo dai liofilizzati ottenuti da matrici fermentate.

Tabella 4.5. Attività antiossidante dei liofilizzati del surnatante dopo 44 ore di incubazione, risospesi (200 mg/ml) in acqua distillata

Campioni	% inibizione DPPH
Controllo NP	0
Controllo P	0
<i>L. plantarum</i> NP	11,50%
<i>L. plantarum</i> P	16%
<i>L. hilgardii</i> NP	11,50%
<i>L. hilgardii</i> P	0

Per quanto riguarda il test antimicrobico, la prova è stata effettuata attraverso l'impiego di dischetti di carta bianchi, sterili, dal diametro di 6mm. I microrganismi utilizzati come indicatori, ovvero in grado di subire o meno l'inibizione manifestata dagli estratti in esame, sono stati scelti per la loro importanza, esercitata nel campo alimentare, in tema di sicurezza, poiché, i relativi generi, sono quelli più pericolosi per il consumatore, nel caso di contaminazione dei cibi (*Staphylococcus xylosum*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*) o per il loro interesse tecnologico (*Strep. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, *S. cerevisiae*).

I risultati riportati in **tabella 4.6** mostrano che l'attività antimicrobica, è manifestata contro un certo numero di microrganismi solamente dai campioni inoculati, mentre, i liofilizzati ottenuti da radicchio non inoculato, hanno dato esito negativo in tutti i casi. A tale prova, sono state sottoposte anche le colture liofilizzate, cresciute in MRS, degli stessi microrganismi utilizzati per la prova fermentativa in radicchio, ma, queste, pur essendo state risospese alla stessa concentrazione di 200 mg/ml, non hanno mostrato nessuna attività.

Tabella 4.6. Attività antimicrobica dei liofilizzati ottenuti dopo un'incubazione di 44 ore, risospesi (200 mg/ml) in acqua distillata.

Campioni	<i>S. xyloso</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>P. fluorescens</i>
controllo NP	-	-	-	-	-	-
controllo P	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> NP	++	++	++	++	+++	+++
<i>L. plantarum</i> P	++	++	+	+	+++	+++
<i>L. hilgardii</i> NP	++	++	++	+	+++	+++
<i>L. hilgardii</i> P	++	++	++	+	+++	+++

+++ alone di inibizione avente diametro pari o superiore a 20 mm
 ++ alone di inibizione avente diametro superiore o uguale a 10 mm
 + alone di inibizione avente diametro inferiore a 0 mm

4.3 Comparazione delle attività fermentative di una selezione di ceppi proveniente dall'ambiente enologico

Tutte le prove fino a ora descritte sono state condotte con i ceppi tipo dei microrganismi di interesse. L'esperienza è proseguita con la valutazione di dodici ceppi di *L. plantarum* e nove di *L. hilgardii*, provenienti dall'ambiente enologico. Questi costituiscono il frutto di una selezione di batteri ottenuti da vinaccia, destinata alla produzione di grappa, durante il periodo di insilamento. È stato deciso, inoltre, di saggiare anche dieci ceppi di *Oenococcus oeni*, provenienti dallo stesso ambiente ecologico, e appartenenti ad una specie adattata a crescere a pH molto bassi (riesce a svilupparsi anche a pH intorno a 3) e, pertanto, molto resistente.

Va ricordato, inoltre, che la vinaccia presenta una composizione polifenolica comparabile a quella del radicchio, il substrato utilizzato, in questa esperienza, per testare l'attività fermentativa delle specie in esame.

Nelle figure riportate di seguito, sono mostrati i valori di pH relativi ai ceppi delle tre specie di batteri lattici, inoculati in omogeneizzati di radicchio e vinacce sottoposti a pastorizzazione. Questo trattamento termico consente di abbassare la concentrazione della flora batterica, in modo da favorire subito lo sviluppo dei batteri inoculati. Parallelamente allo sviluppo in radicchio, la crescita di tali

microrganismi è stata valutata anche nei mezzi selettivi utilizzati abitualmente in laboratorio, allo scopo verificare eventuali variazioni nell'attività di fermentazione. L'inoculo iniziale, in tutti i casi, è stato di 10^5 CFU/ml. Questo valore è stato ottenuto attraverso la determinazione delle densità ottiche (O.D.), relative alla seconda diluizione delle colture madri di ogni ceppo, a cui è seguito un inoculo dell'1% del volume corrispondente a ogni O.D., in modo da introdurre, nelle matrici vegetali e nei terreni colturali, la stessa concentrazione batterica. La crescita, a fine incubazione, è stata saggiata mediante determinazione della conta su piastra (i valori ottenuti sono stati sempre superiori 10^9 cfu/ml).

4.3.1 Crescita dei ceppi di *Lactobacillus plantarum*

Il grafico 4.4 rappresenta l'evoluzione del pH, in 48 ore di crescita, delle colture dei diversi ceppi di *Lactobacillus plantarum*, in terreno MRS: osservando l'andamento delle curve appare evidente che, tutti i ceppi, effettuano un'acidificazione molto simile, con un abbassamento finale di pH compreso tra 3,62 (ceppo 1) e 3,69 (ceppi 77, 5 e 69) mentre il controllo, cioè il terreno non inocolato (in questo caso MRS), e' rimasto costante a pH attorno il 5,7.

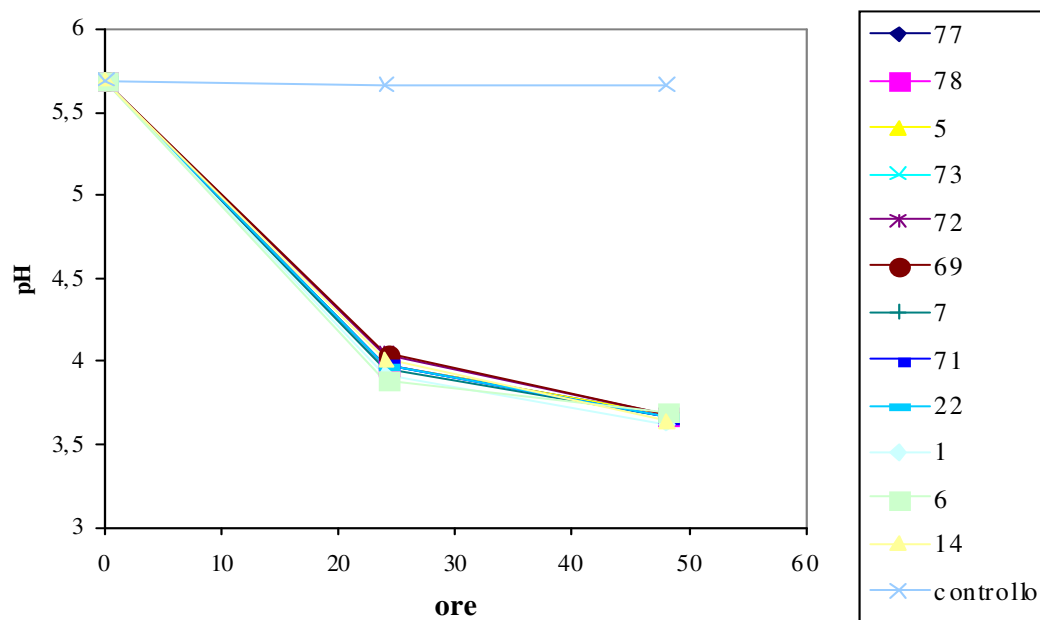


Grafico 4.4. Andamento delle curve di acidificazione relative ai ceppi di *Lactobacillus plantarum* inoculati in MRS.

Come si può notare nel grafico 4.5, l'andamento di fermentazione degli stessi ceppi, inoculati in omogeneizzato di radicchio pastorizzato, tende a variare di più rispetto a quanto avviene in MRS: dopo 24 ore, infatti, alcuni ceppi (ad esempio il numero 77 che ha portato il radicchio a pH 4,21) mostrano una acidificazione limitata, mentre altri (ad esempio i ceppi 1 e 69 che presentano valori pari a 3,81) presentano una notevole attività. Nel corso di 48 ore, i valori di pH scendono tutti al di sotto di 4, con un range compreso tra 3,16, per il ceppo 1, e 3,52, per il ceppo 69. Da notare, a tale riguardo, che il ceppo 69, se all'inizio acidifica molto rapidamente, dopo 48 ore presenta il pH più elevato. Il ceppo 1, invece, si conferma, come in MRS, quello che acidifica più vigorosamente per l'intera durata della fase di crescita.

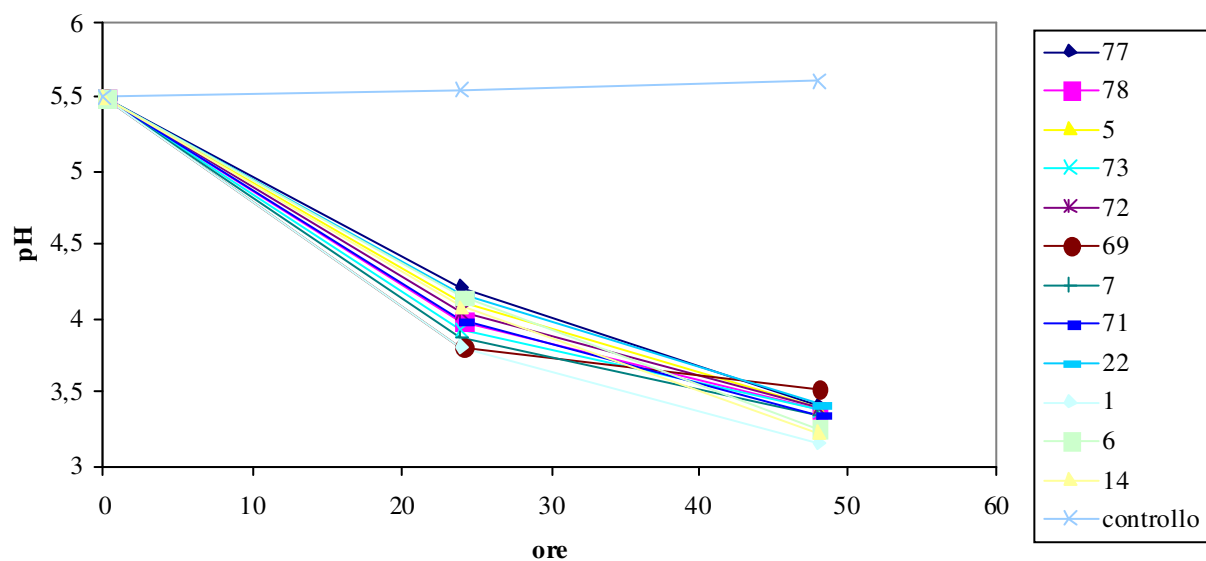


Grafico 4.5. Andamento delle curve di acidificazione dei ceppi di *L. plantarum* in radicchio. L'abbassamento finale del pH raggiunge, per tutti i ceppi, valori sempre inferiori a 4, con una diminuzione massima di 3,16, nel caso del ceppo 1.

L'inoculo dei ceppi di *L. plantarum* in omogeneizzato di vinacce pastorizzato, è stato condotto nella prova preliminare. Tali vinacce sono state portate a pH 5,5, al fine di ottenere, nella matrice, le stesse condizioni di acidità iniziale del radicchio.

L'andamento fermentativo dei ceppi presenta delle differenze rispetto ai profili di acidificazione ottenuti utilizzando gli altri substrati. Come si nota in grafico 4.6, infatti, in questo caso è il ceppo 71 quello che, già nelle prime fasi di crescita, tende ad abbassare di più il pH. Infatti, dopo 24 ore, è l'unico che presenta un valore molto al di sotto di 5, confermandosi il migliore anche successivamente. In generale le differenze nell'andamento tra i diversi ceppi sembrano maggiormente accentuate rispetto a quanto osservato in MRS e in radicchio. A 24 ore dall'inoculo, infatti, il valore più alto di pH è 6 (ceppo 77), mentre il valore più basso, dopo quello del ceppo 71, è 5,19 (ceppo 6). Anche alla fine delle fermentazioni, sono state registrate notevoli differenze nei valori di pH per i diversi ceppi. Infatti, il valore più basso, come già detto, è stato raggiunto dal ceppo 71 (pari 3,5), mentre il valore maggiore dal ceppo 6 (4,63).

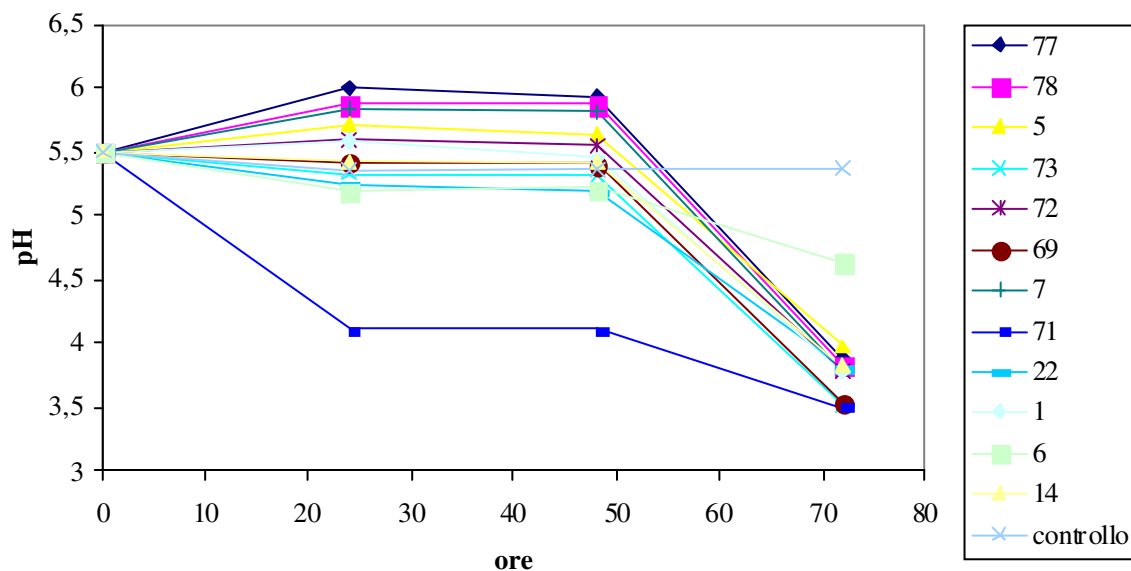


Grafico 4.6. Andamento delle curve di acidificazione dei ceppi di *L. plantarum* inoculati in vinacce a pH 5,5. Anche in questo caso, i valori finali di pH si trovano al di sotto di 4, tranne che per il ceppo 6, in cui il pH è pari a 4,63. La migliore attività di acidificazione è stata ottenuta dal ceppo 71 che si evidenzia già dalle prime fasi di crescita.

4.3.2 Crescita dei ceppi di *Lactobacillus hilgardii*

La crescita dei ceppi di *Lactobacillus hilgardii*, inoculati in MRS, si presenta, innanzitutto, di lunga durata, poiché il pH tende a stabilizzarsi solo dopo le 168 ore; inoltre, l'andamento è piuttosto eterogeneo, in termini di acidificazione, (grafico 4.7). Il ceppo 6, in particolare, è quello che acidifica più velocemente, tanto che, a 24 ore, porta il pH del mezzo a 4,61, quando tutti gli altri ceppi sono ancora sopra a 5. Questo valore rimane pressoché costante durante tutta la fase successiva di crescita. A 120 ore il ceppo 35, con un valore di pH pari a 4,90, mostra una limitata capacità di acidificazione, mentre 11, 8, 12 e 41, presentando valori intorno a 4,1, dimostrano delle buone performance di acidificazione. Verso fine fermentazione, raggiunta dopo 168 ore, i valori tendono progressivamente a uniformarsi, essendo compresi tra 4,08 e 4,32.

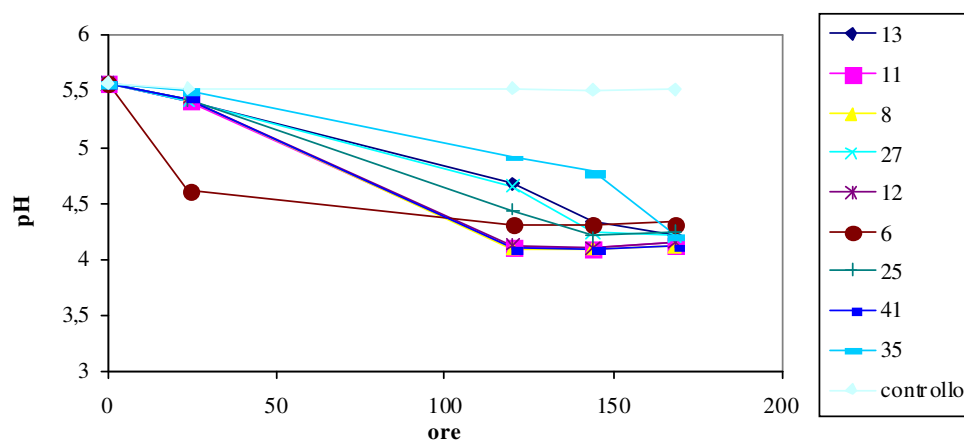


Grafico 4.7. Andamento delle curve di acidificazione relative ai ceppi di *Lactobacillus hilgardii* inoculati in MRS. I pH finali, in tale mezzo di crescita, si portano sempre al di sopra di 4.

L'evoluzione dell'attività fermentativa degli stessi ceppi di *L. hilgardii*, inoculati in omogeneizzato di radicchio pastorizzato, mostra una situazione differente rispetto a quanto verificatosi in terreno MRS. Come si osserva dal grafico 4.8, il tempo necessario per raggiungere il valore minimo di pH, in questo caso è più breve ed è pari a 96 ore. Inoltre si osserva che il ceppo 6 conferma lo stesso andamento mostrato in MRS, mentre, il 35, in questa situazione, tende ad acidificare molto più rapidamente.

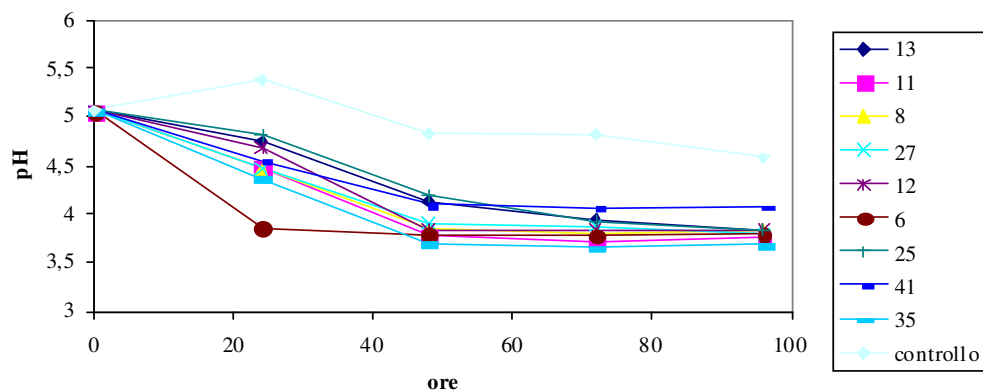


Grafico 4.8. Andamento delle curve di acidificazione relative ai ceppi di *L. hilgardii* inoculati in radicchio. I profili fermentativi raggiungono valori finali di pH tutti sotto a 4, tranne nel caso del ceppo 41.

4.3.3 Crescita dei ceppi di *Oenococcus oeni*

L'andamento di acidificazione di *Oenococcus oeni* in terreno colturale MRS, con aggiunta di succo di pomodoro, al fine di facilitare la crescita e portare il pH del terreno a 4,80, è molto simile tra i ceppi saggiati.

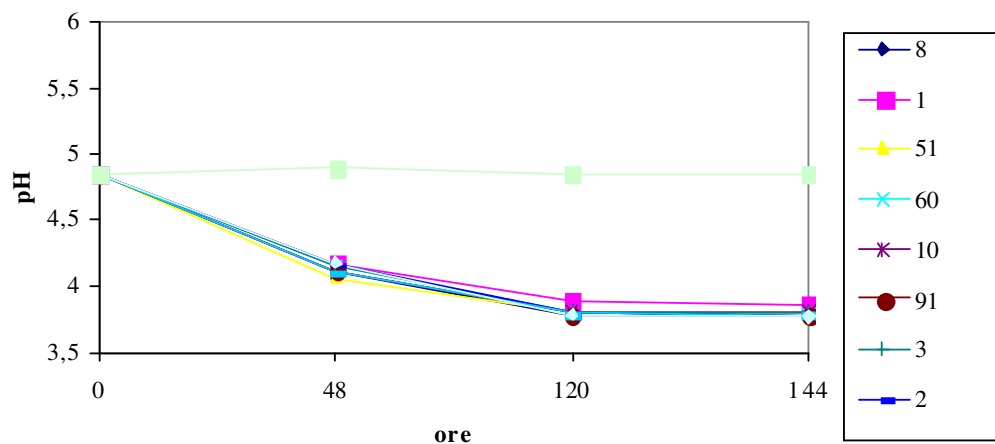


Grafico 4.9. Andamento delle curve di acidificazione relative ai ceppi di *Oenococcus oeni* inoculati in MRS + succo di pomodoro, a pH 4,80. L'andamento del pH è simile per tutti i ceppi. Il valore finale di pH è compreso tra 3,77 e 3,85.

L'andamento fermentativo dei ceppi di *O. oeni*, inoculati in omogeneizzato di radicchio pastorizzato (grafico 4.10), è un chiaro indice di avvenuta crescita di tutti i ceppi anche in una situazione molto diversa da quella naturale tipica della specie. Infatti, il pH iniziale dell'omogeneizzato è pari a 5,29, ben al di sopra di 4,80, il valore caratteristico del mezzo MRS, contenente succo di pomodoro, che viene considerato il terreno ottimale per questa specie. Per il resto si può osservare che, in questo caso, il profilo di acidificazione è più eterogeneo rispetto a quanto verificatosi in terreno sintetico: a 72 ore, infatti, si può notare che il pH più elevato, relativo al ceppo 60, è pari a 5,26, mentre il ceppo 91 presenta il valore più basso (4,55). Particolare attenzione merita il ceppo 60, che, a 96 ore porta il pH a 5,23, quando, negli altri casi, è ben al di sotto di 4. Questa differenza tende a protrarsi per la rimanente durata della fermentazione, tanto che, a 168 ore, il pH relativo al ceppo 60 è pari a 5,60, mentre, gli altri ceppi, hanno tutti valori sotto a 4 (solo per il ceppo 91 il pH è 4,03).

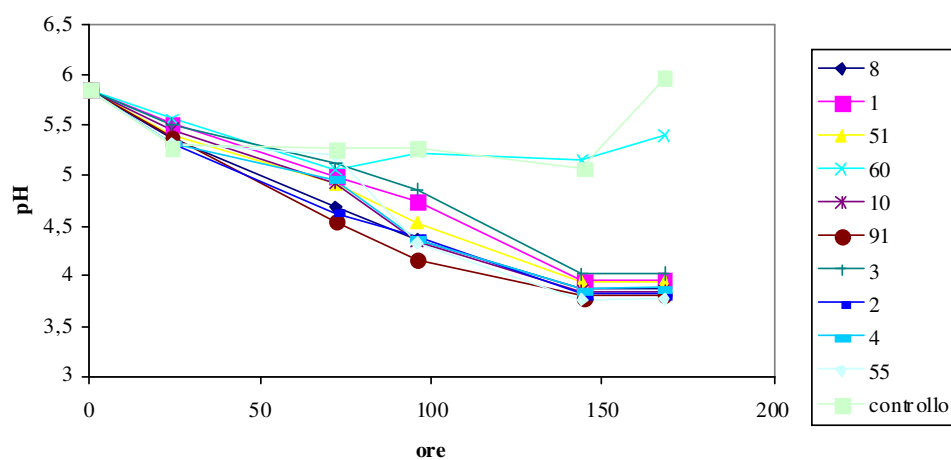


Grafico 4.10. Andamento delle curve di acidificazione relative ai ceppi di *O. oeni* inoculati in radicchio.

4.4 Attività antimicrobica

Nel presente paragrafo, vengono riportate le attività antimicrobiche manifestate dai surnatanti liofilizzati dei fermentati vegetali, prodotti inoculando i batteri lattici provenienti da ambiente enologico, nei confronti di una serie di microrganismi utilizzati come indicatori.

In particolare, di tutti i liofilizzati ottenuti da radicchio, risospesi in acqua sterile in modo da ottenere una concentrazione di 200mg/ml, soltanto quelli relativi ai ceppi di *L. plantarum* hanno prodotto inibizione contro i microrganismi indicatori (tabelle 4.7 e 4.8). Dei liofilizzati, saggiati alla medesima concentrazione, ottenuti da terreno di coltura di laboratorio, quelli relativi ai ceppi *L. plantarum* e *O. oeni.*, hanno inibito alcuni dei ceppi testati, in particolare *S. xylosus* (tabelle 4.9 e 4.10). Aggiungendo, in quest'ultimo caso, agli stessi estratti proteinasi-K, in grado di degradare in modo specifico le proteine, l'azione inibente si è attenuata oppure è scomparsa del tutto, confermando che l'effetto antimicrobico dipende da una molecola di natura proteica che con molta probabilità appartiene alla classe delle batteriocine. Questo risultato è confermato dalla presenza in letteratura di molte evidenze sperimentali che indicano, nella specie *L. plantarum*, un gruppo di microrganismi molto attivi nella produzione composti proteici inibitori della crescita batterica.

Tabella 4.7. Attività antimicrobica dei liofilizzati, alla concentrazione di 200 mg/ml, ottenuti mediante fermentazione di *L. plantarum* in radicchio

<i>L. plantarum</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>S. thermopylus</i>
77 R	-	-	-	-	-	-	-
7 R	-	-	-	-	+	-	-
72 R	-	-	-	-	+	-	-
73 R	-	+	-	+	-	+	-
14 R	-	-	-	-	-	-	-
69 R	-	-	-	-	-	-	-
5 R	-	-	-	-	-	-	-
6 R	-	+	-	-	+	+	-
78 R	-	-	-	-	+	-	-
1 R	+	+	+	+	+	+	+
71 R	-	-	-	-	-	-	-
Controllo R	-	-	-	-	-	-	-

Tabella 4.8. Attività antimicrobica dei liofilizzati, alla concentrazione di 200 mg/ml, ottenuti mediante fermentazione di *L. plantarum* in vinacce

<i>L. plantarum</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>S. thermopylus</i>
77 V	-	-	-	-	-	-	-
7 V	-	-	+	-	+	-	-
72 V	-	-	+	-	+	-	-
73 V	-	-	-	-	-	-	-
14 V	-	+	-	+	-	-	+
69 V	-	+	+	-	-	-	-
5 V	-	-	-	-	-	-	-
6 V	-	+	-	-	-	-	-
78 V	-	+	-	-	-	-	-
1 V	-	-	-	-	-	-	-
71 V	-	-	-	-	-	-	-
Controllo V	-	-	-	-	-	-	-

Tabella 4.9. Attività antimicrobica dei liofilizzati, alla concentrazione di 200 mg/ml, ottenuti mediante fermentazione di *L. plantarum* terreno colturale MRS

<i>L. plantarum</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
77	++	+	+	+
77 + pk	-	-	-	-
22	++	-	-	-
22 +pk	+			
72	++	-	-	-
72 + pk	-			
73	++	-	-	-
73 + pk	-			
14	++	-	-	-
14 + pk	-			
5	++	-	-	-
5 + pk	-			
6	++	-	-	-
6 + pk	-			
1	++	-	-	-
1+ pk	+			
Controllo	-	-	-	-

++ alone di inibizione avente diametro pari o superiore a 10 mm

+ alone di inibizione avente diametro inferiore a 10 mm

Tabella 4.10. Attività antimicrobica dei liofilizzati, alla concentrazione di 200 mg/ml, ottenuti mediante fermentazione di *O. oeni* in terreno colturale MRS addizionato con succo di pomodoro

<i>O. oeni</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
55	+++	+	+	+
55+ pk	++	-	-	-
51	++	-	-	-
51 + pk	-			-
91	+++	-	-	-
91 +pk	++			-
2	++	-	-	-
2 + pk	-			
4	++	-	-	-
4 + pk	-			
3	++	-	-	-
3 + pk	-			
80	++	-	-	-
80 + pk	-			
1	+	-	-	-
1+ pk	-			
10	++	-	-	-
10 + pk	-			

+++ alone di inibizione avente diametro pari o superiore a 20 mm

++ alone di inibizione avente diametro superiore o uguale a 10 mm

+ alone di inibizione avente diametro inferiore a 10 mm

4.5 Attività antiossidante

I grafici riportati successivamente, mostrano i valori di attività antiossidante, ottenuti mediante il test del DPPH, relativi ai liofilizzati di radicchio e vinacce inoculati con i microrganismi in esame. Il test, per ciascun ceppo, è stato eseguito in triplicato. Un risultato generale riguarda l'attività espressa dal liofilizzato, ottenuto dalla matrice vegetale non inocolata, che è pari a zero in tutti i casi. Questo indica che, almeno nelle condizioni saggate, l'apporto della sola matrice è molto basso e che l'attività di fermentazione, in qualche modo, favorisce la produzione o la conservazione, durante tutta la fase di crescita microbica, dei composti bioattivi. Tra le specie saggate *L. plantarum* e *O. oeni* manifestano l'attività più elevata anche se sembra che questa sia specifica per il singolo ceppo piuttosto che attribuibile alla specie. In relazione a *L. plantarum*, i ceppi cresciuti nella vinaccia mostrano un'attività leggermente più elevata, mediamente. E' interessante notare che alcuni ceppi presentano attività quando cresciuti in radicchio, ma non in vinaccia (ad esempio il 77 o il 22). Questo risultato tenderebbe a dimostrare che la specificità del substrato influenza notevolmente le potenzialità antiossidanti del ceppo.

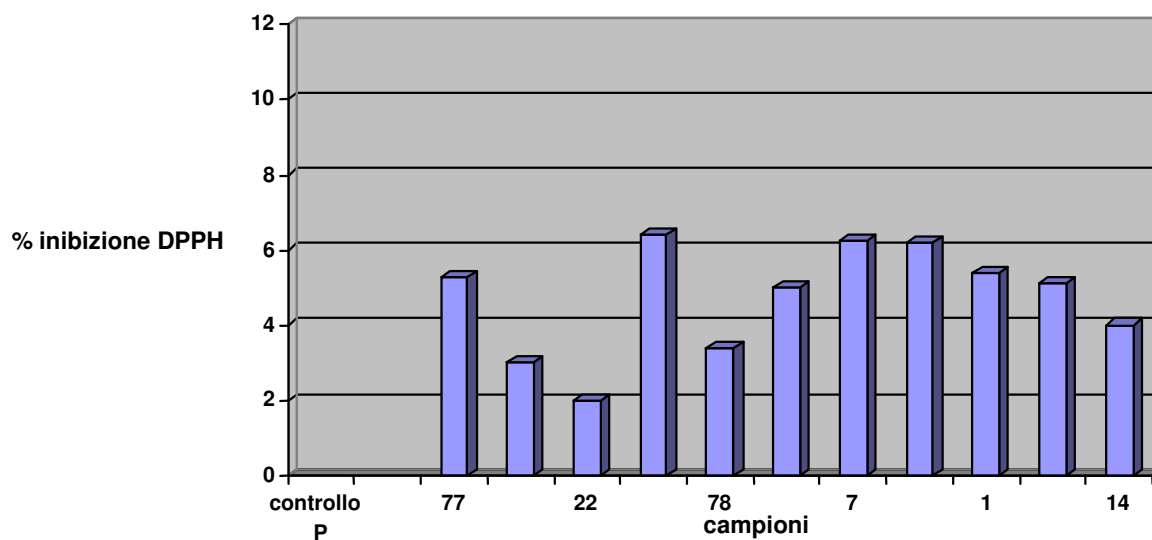


Grafico 4.11. Attività antiossidante relativa ai liofilizzati di radicchio inoculati con i ceppi di *L. plantarum*, saggiati ad una concentrazione di 5 mg/ml (bisogna sistemare)

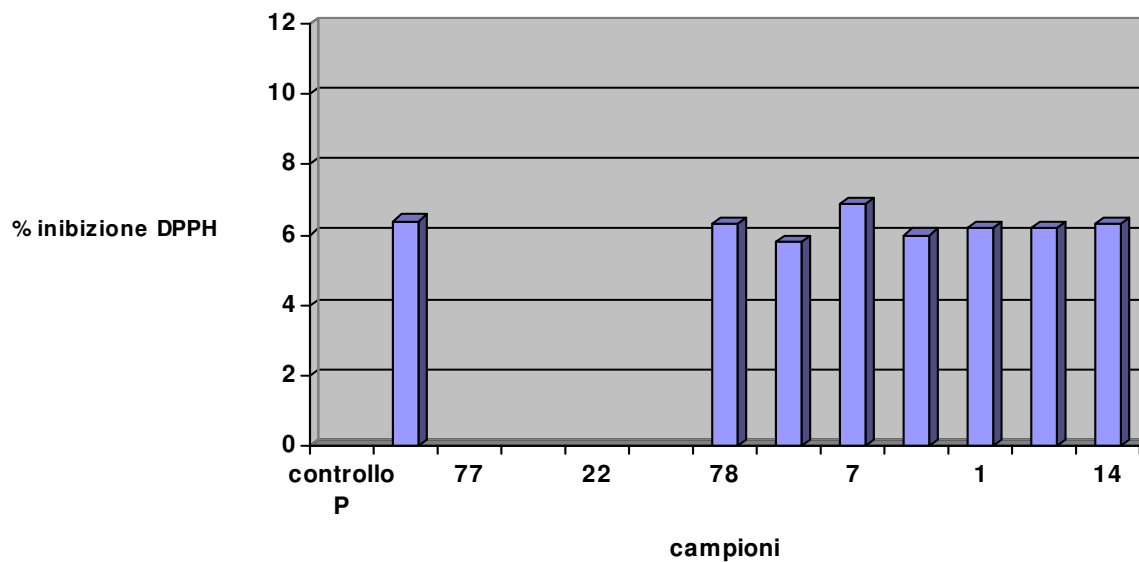


Grafico 4.12. Attività antiossidante relativa agli estratti di vinacce inoculati con i ceppi di *L. plantarum*, saggiati ad una concentrazione di 5 mg/ml

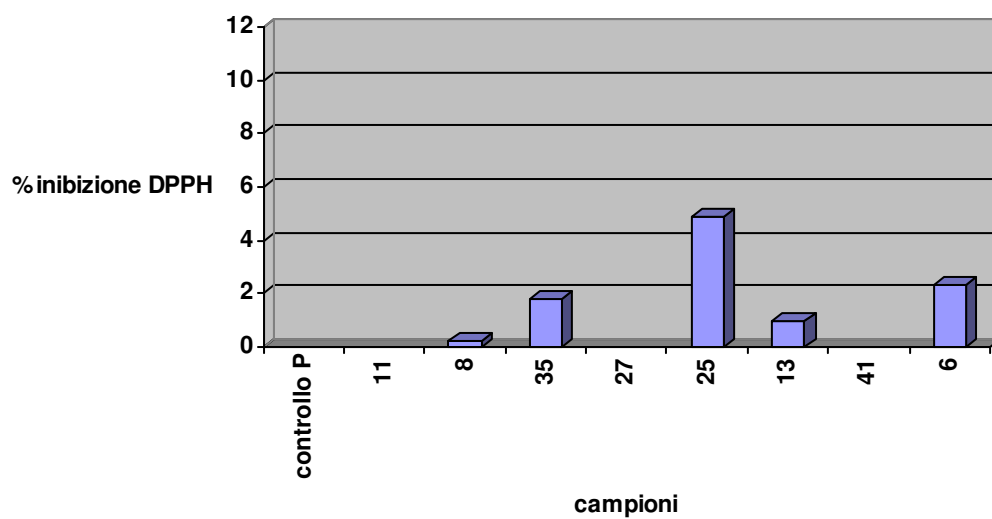


Grafico 4.13. Attività antiossidante relativa agli estratti di radicchio inoculati con i ceppi di *L. hilgardii*, saggiati ad una concentrazione di 5 mg/ml

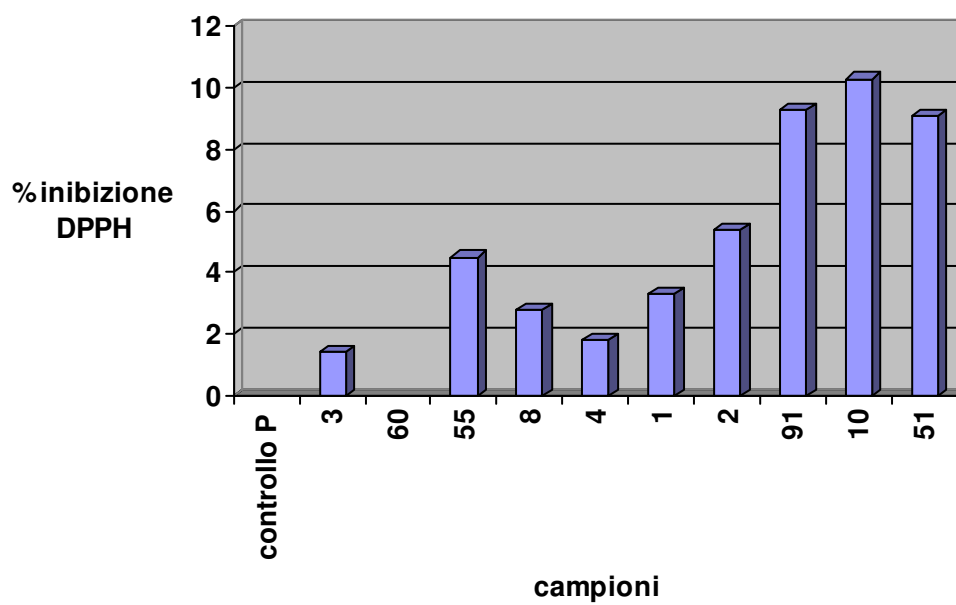


Grafico 4.14. Attività antiossidante relativa agli estratti di radicchio inoculati con i ceppi di *O. oeni*, saggiati ad una concentrazione di 5 mg/ml

4.6 Composizione in polifenoli e antociani dei fermentati

Una volta concluse le fermentazioni, i campioni in presenza o assenza di *L. hilgardii* e *L. plantarum*, sono stati centrifugati e i relativi surnatanti sono stati direttamente analizzati mediante HPLC (*Lante et al.*, 2005) per determinare la loro composizione in antociani e polifenoli. Le analisi relative a *O. oeni* sono ancora in corso e non saranno presentate in questa tesi. Assieme agli isolati naturali, sono stati analizzati anche i ceppi tipo delle relative specie di *L. hilgardii* e *L. plantarum*.

L'identificazione dei picchi presenti nei cromatogrammi è stata ottenuta tramite standard esterni; la cui scelta è stata guidata, da una ricerca bibliografica, in merito ai composti normalmente presenti in radicchio. I nomi degli standard sia di polifenoli che antociani sono riportati nella tabella **4.11**.

Tabella 4.11. Standard di polifenoli e antociani usati

Standard polifenoli	Standard antociani
Acido gallico	Cyanidine-3,5-di-O-glucoside
Acido protocateico	Cyanidine-3-O-rutinodise
Acido clorogenico	Cyanidine-3-O-glucoside
Acido P-Hydrossibenzoico	Pelargonidin-3-O-glucoside
Acido caffeico	Delphinidine
Acido vanillico	Peonidin-3-O-glucoside
Acido siringico	Malvidin-3-O-glucoside
Acido p-cumarico	Cyanidine
Acido ferulico	Pelargonidin
Acido cicorico	Peonidine
	Malvidine

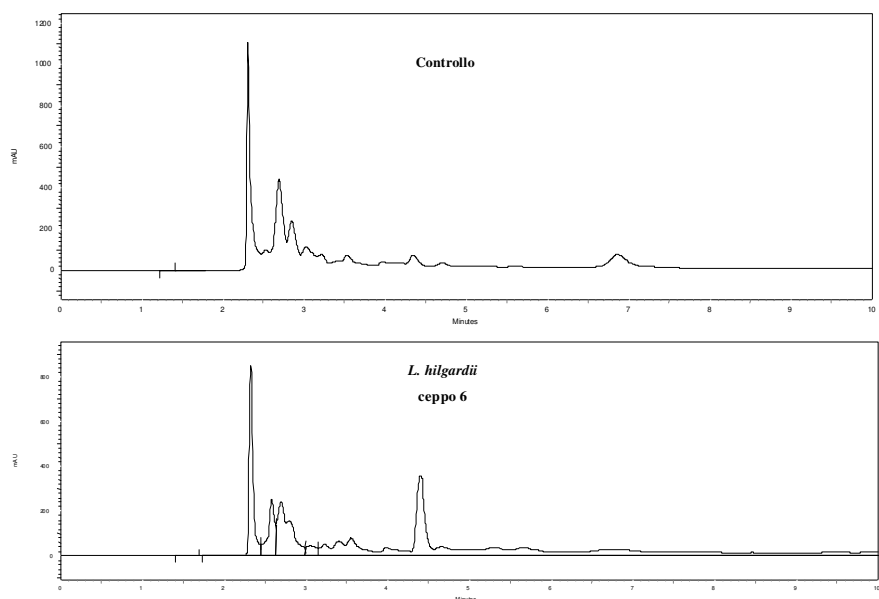
Nel caso degli antociani, sono stati inseriti, assieme al campione, alcuni standard interni. I casi della malvidina-O-glucoside e della cianidina sono quelli il cui tempo di ritenzione sembra coincidere con quello di alcuni composti presenti nei surnatanti.

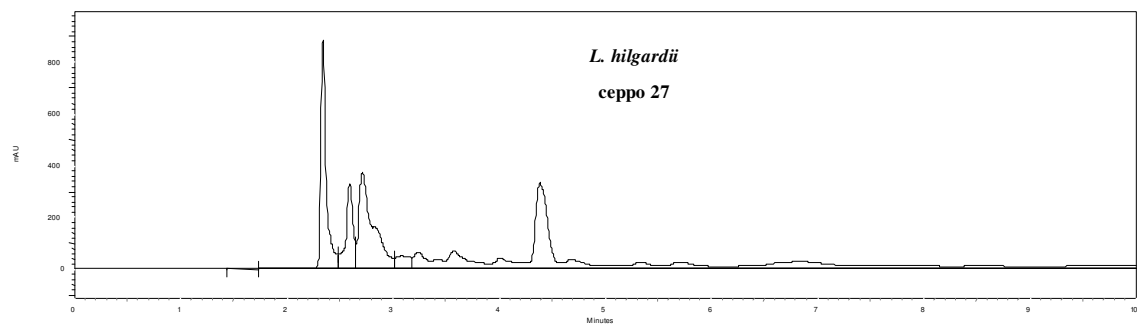
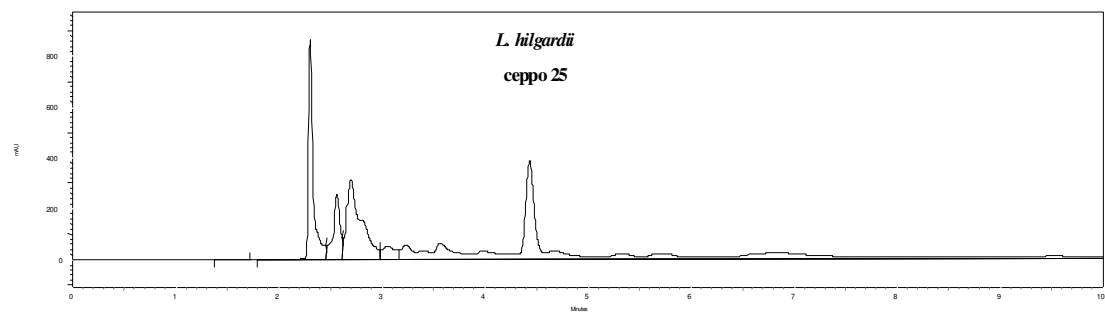
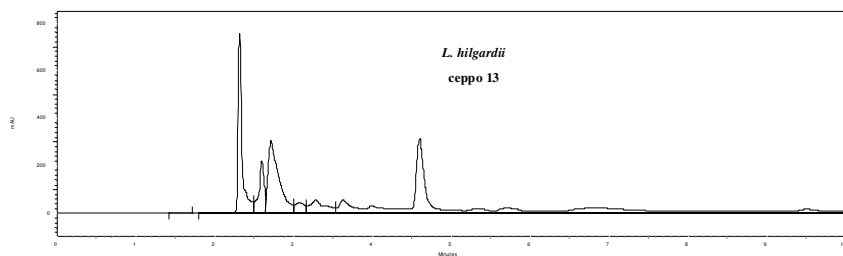
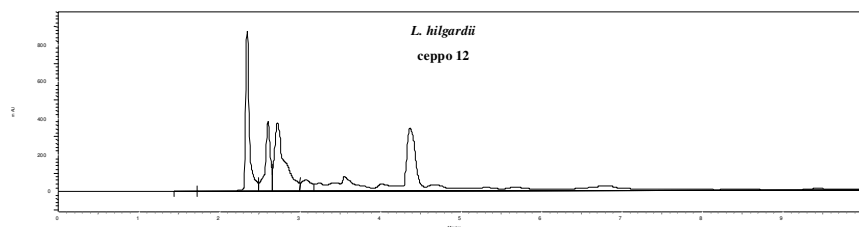
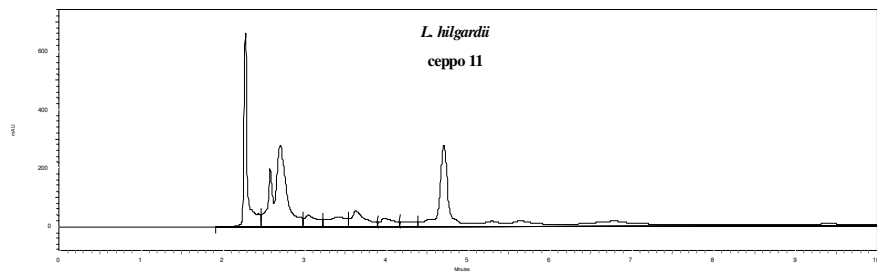
4.6.1 Polifenoli

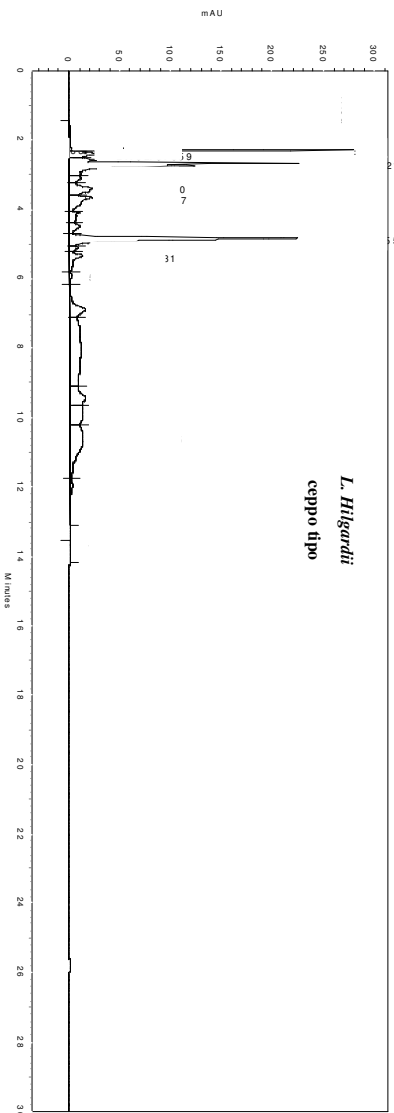
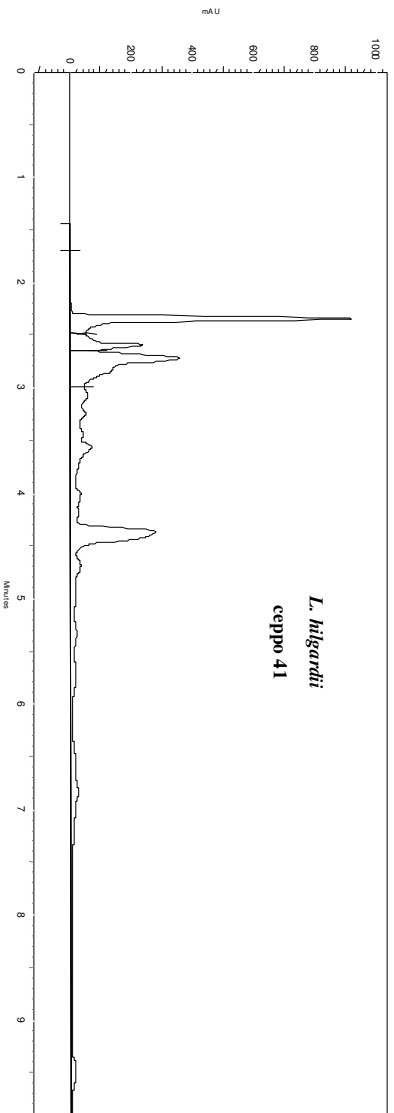
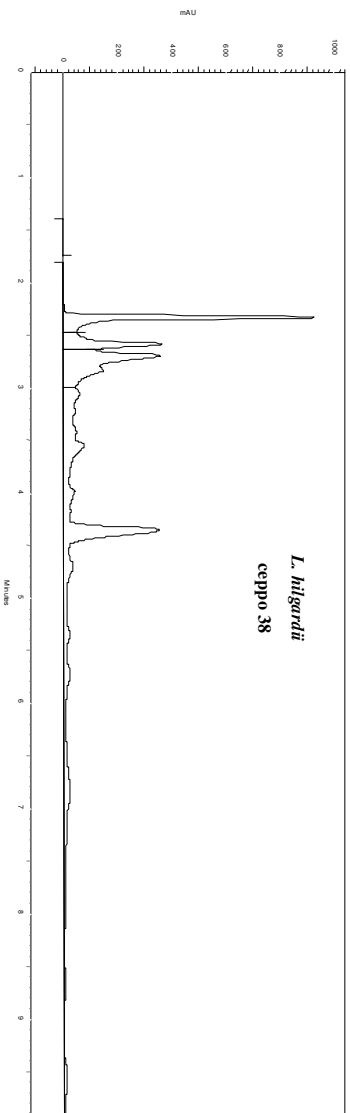
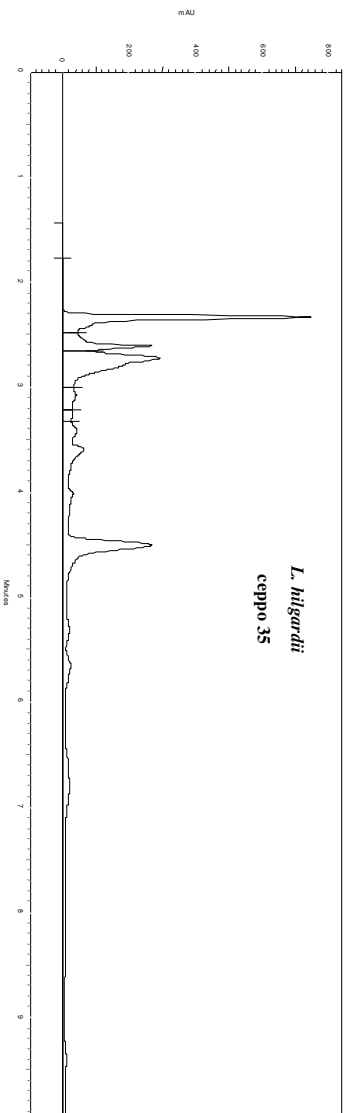
I cromatogrammi relativi alle fermentazioni di *L. hilgardii* e *L. plantarum* ottenuti si rivelano molto simili tra loro (Grafico 4.15). Picchi sono presenti sia nei campioni fermentati con inoculo, che nel controllo pasteurizzato, che ha subito una fermentazione spontanea dovuta alla microflora sopravvissuta alla pasteurizzazione.

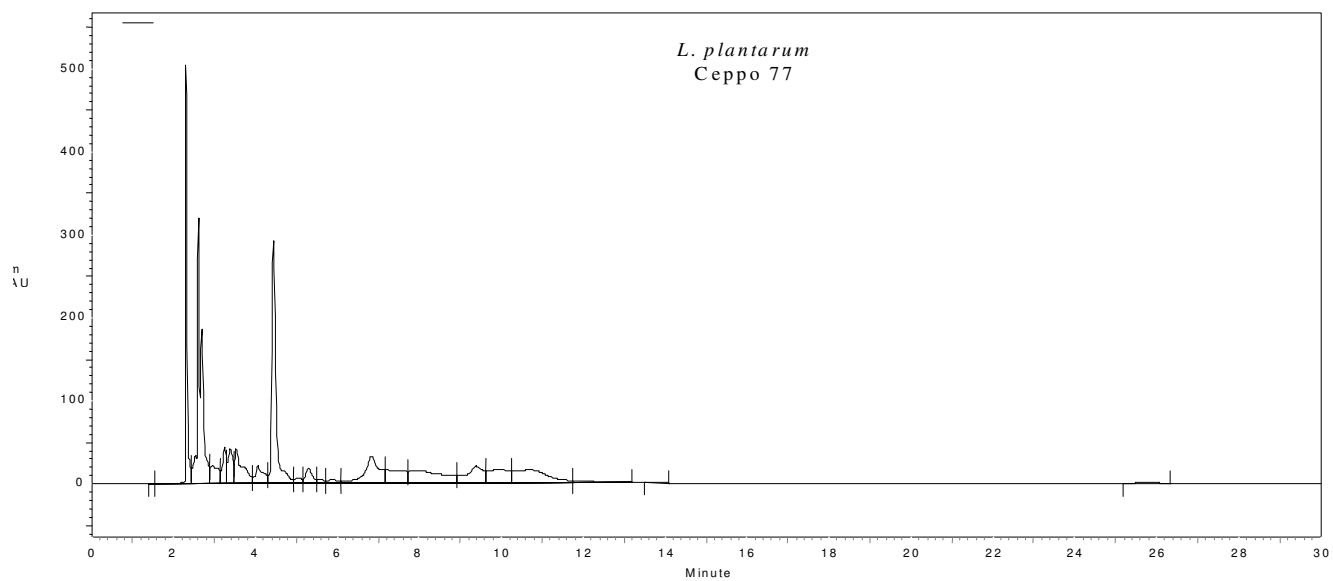
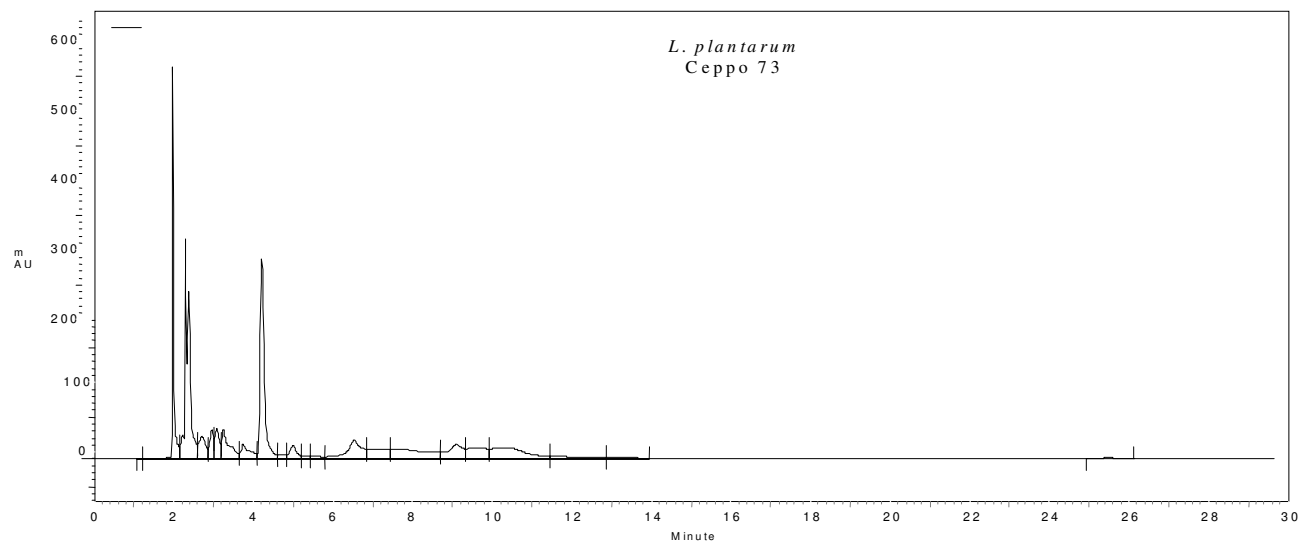
La presenza di polifenoli, in tutti i campioni, e' un dato che non sorprende in quanto sono note le proprietà antiossidanti dovute alla notevole quantità di polifenoli contenuta nel radicchio rosso di Chioggia. Le osservazioni più importanti, relative ai cromatogrammi, sono riassumibili nelle due considerazioni successive.

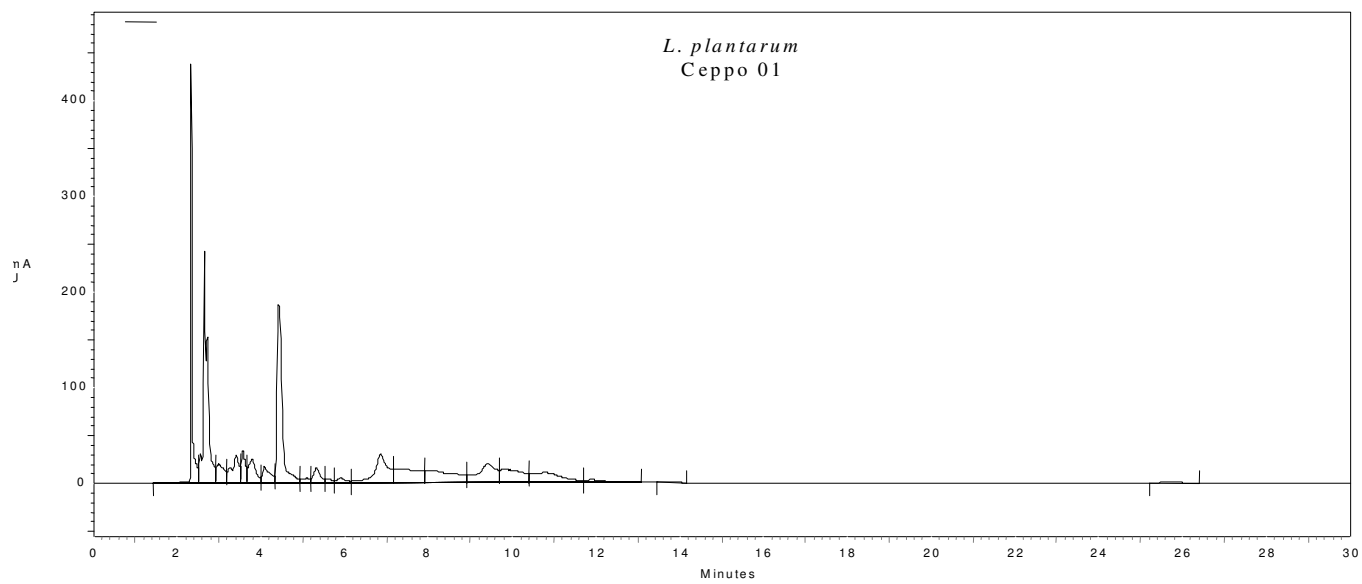
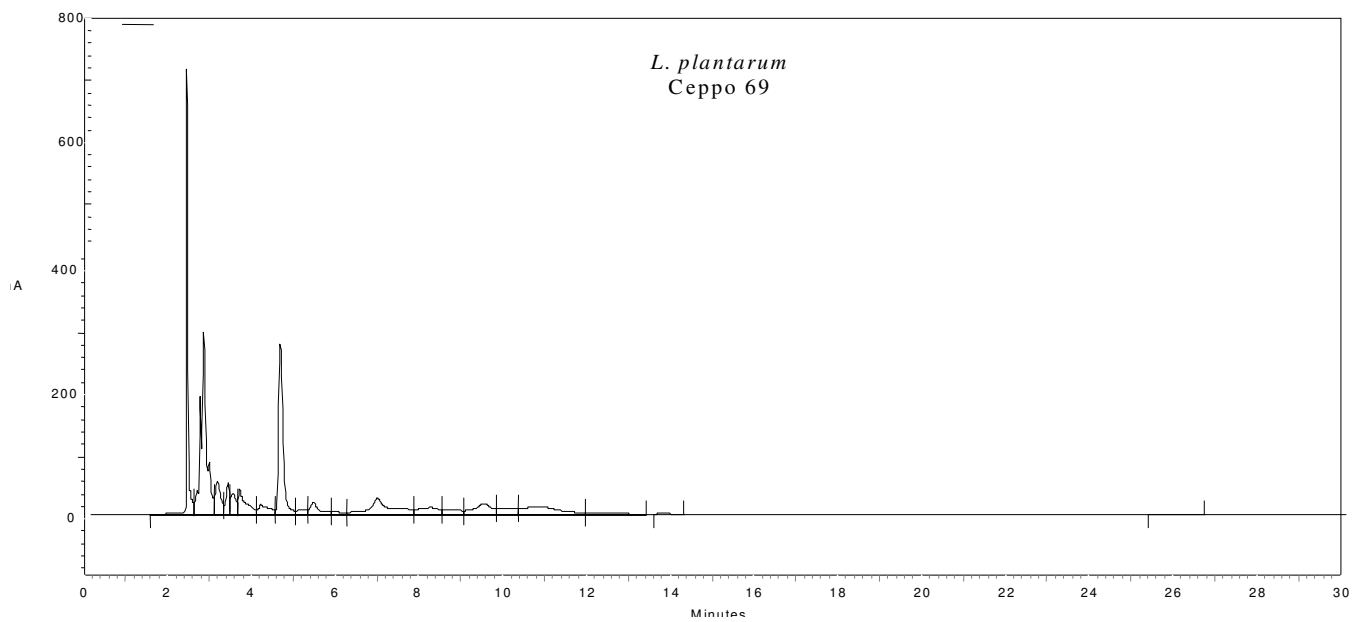
1. E' stata osservata la presenza di un picco specifico nei campioni inoculati con i batteri lattici, assente nel controllo.
2. Si registra la diminuzione del primo picco del cromatogramma, comune a tutti i surnatanti, nel caso dei campioni inoculati. Con buona probabilità tale composto viene trasformato dai batteri lattici ed è in grado di produrre nuovi composti o incrementare la concentrazione di altre molecole che a sua volta generano un picco specifico nel cromatogramma. Infine i primi tre picchi nel controllo corrispondono ai primi tre presenti nei campioni, mentre il picco con tempo di ritenzione attorno a 4,5 minuti e' tipico dei fermentati, compreso il ceppo tipo.

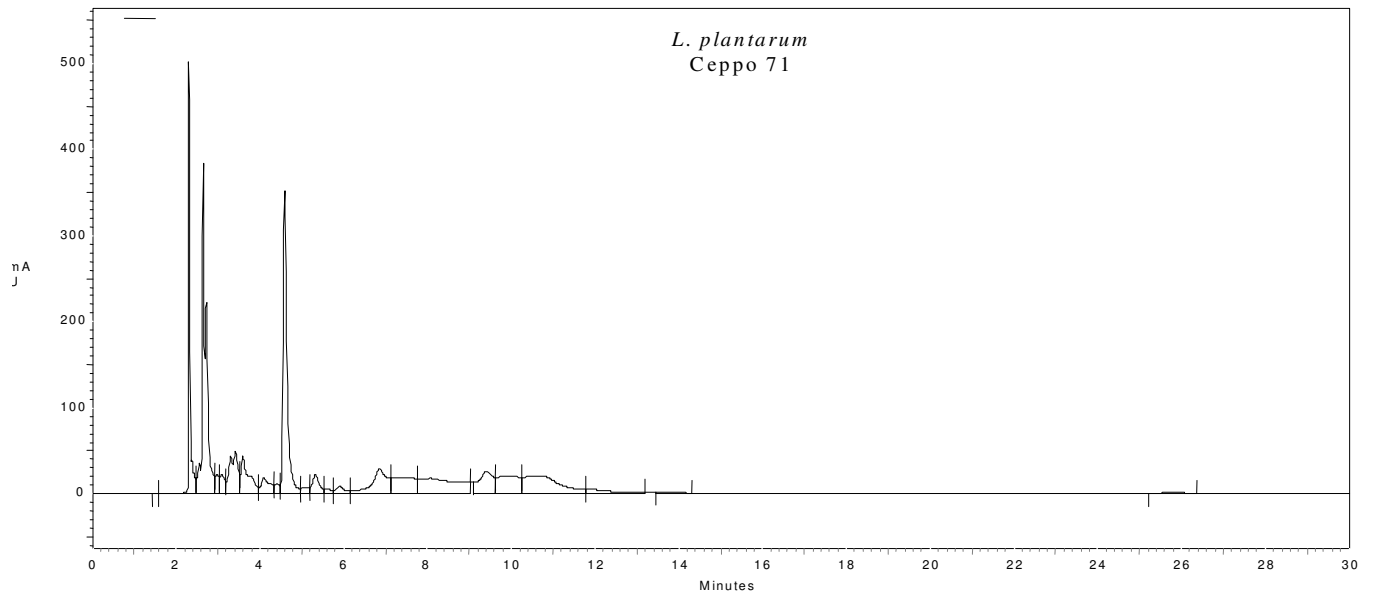
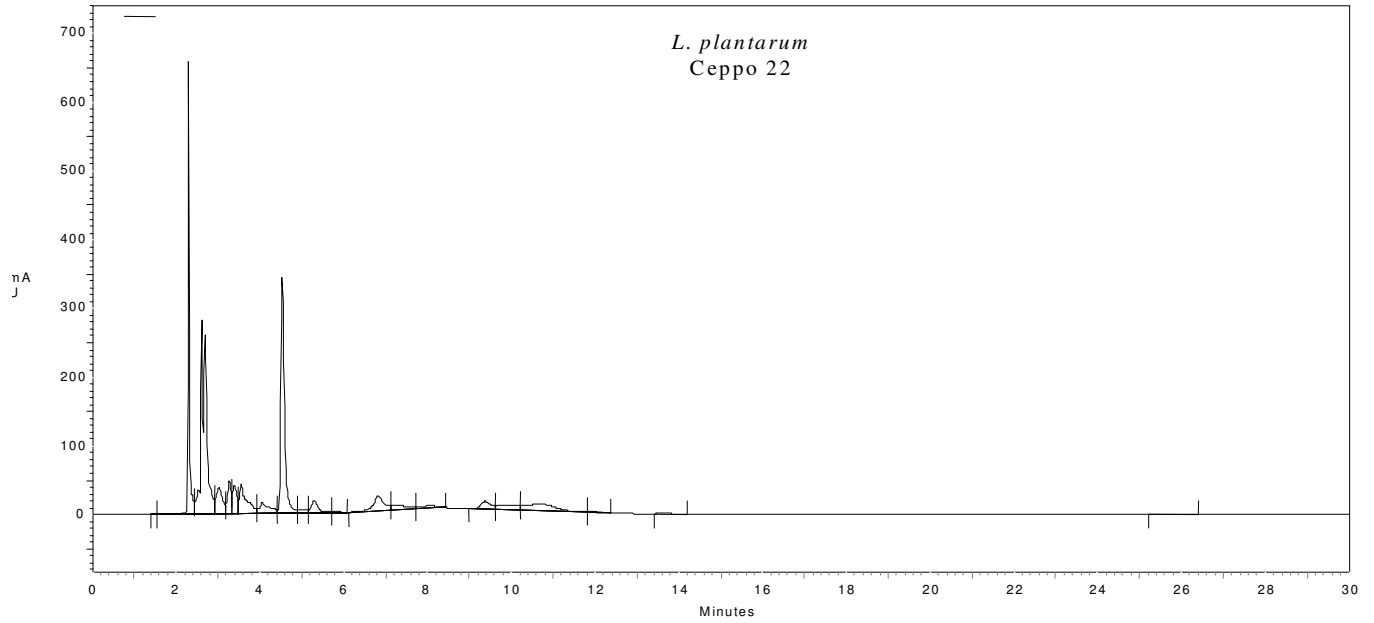


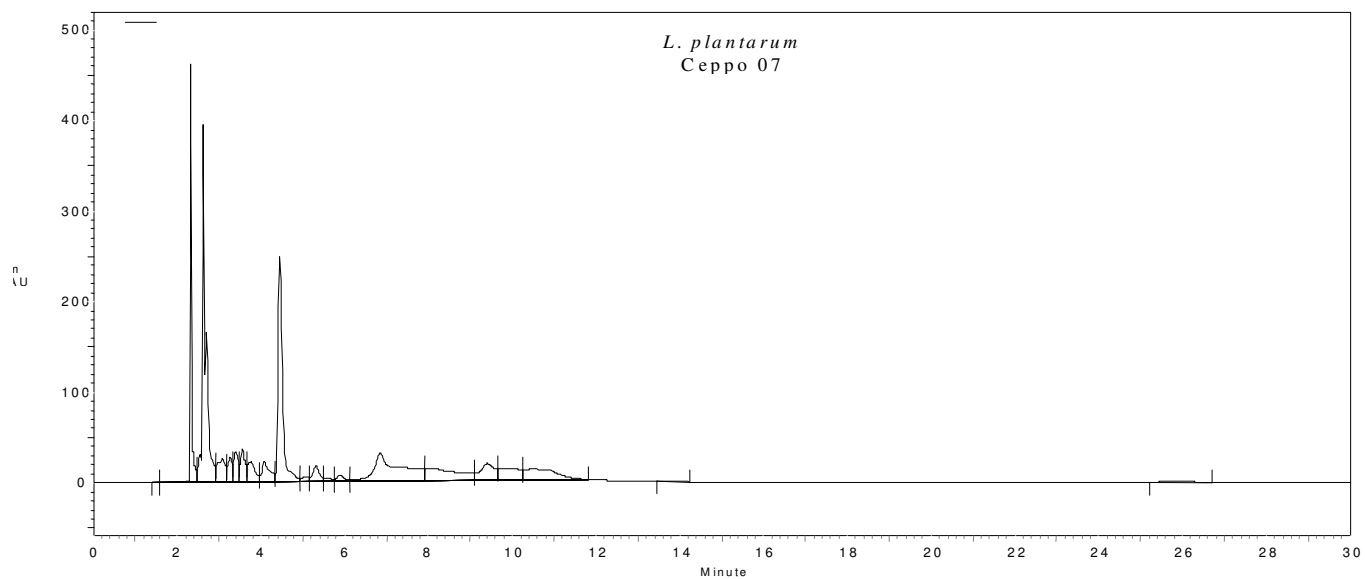
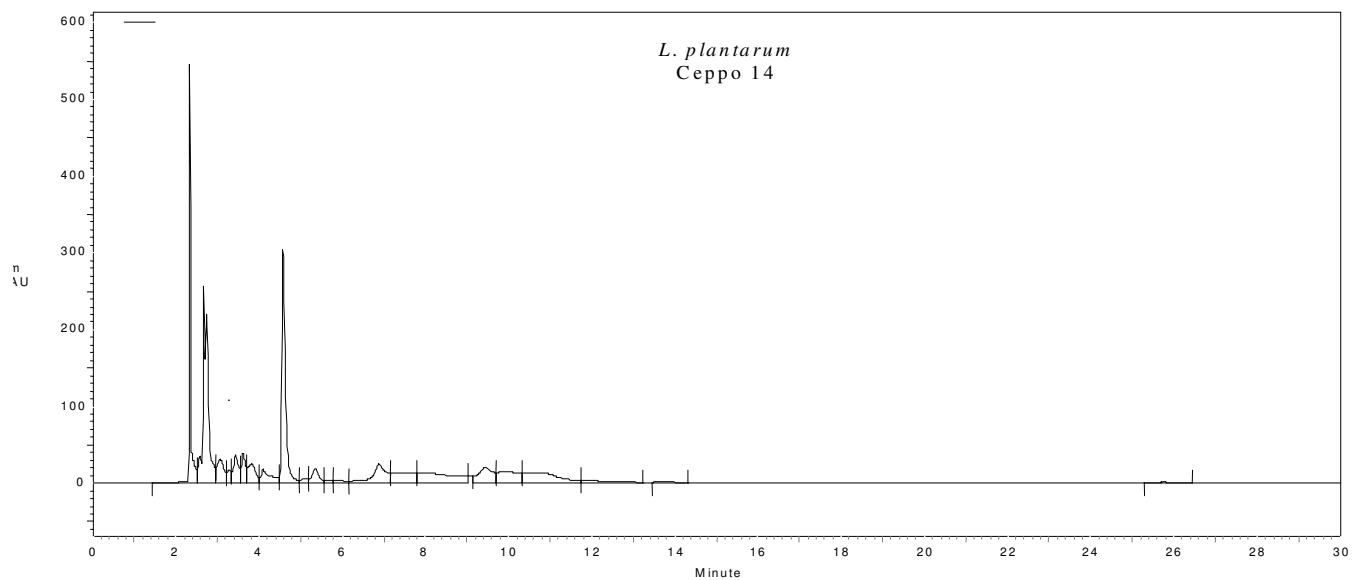


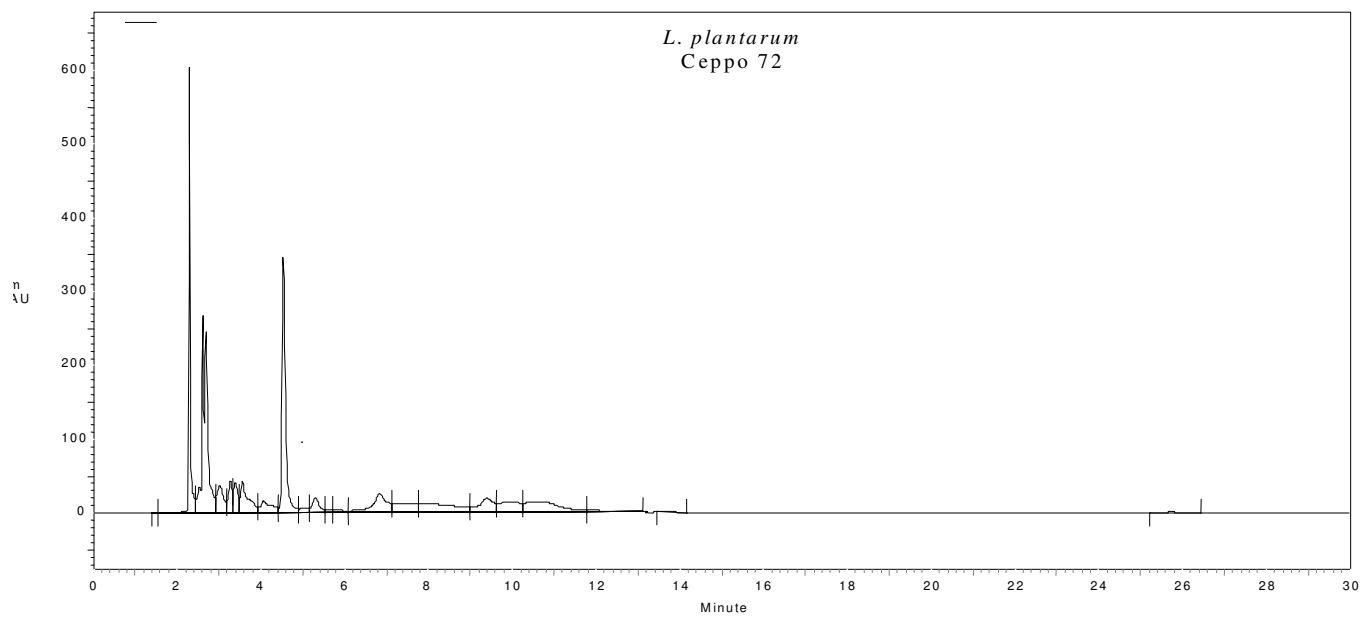
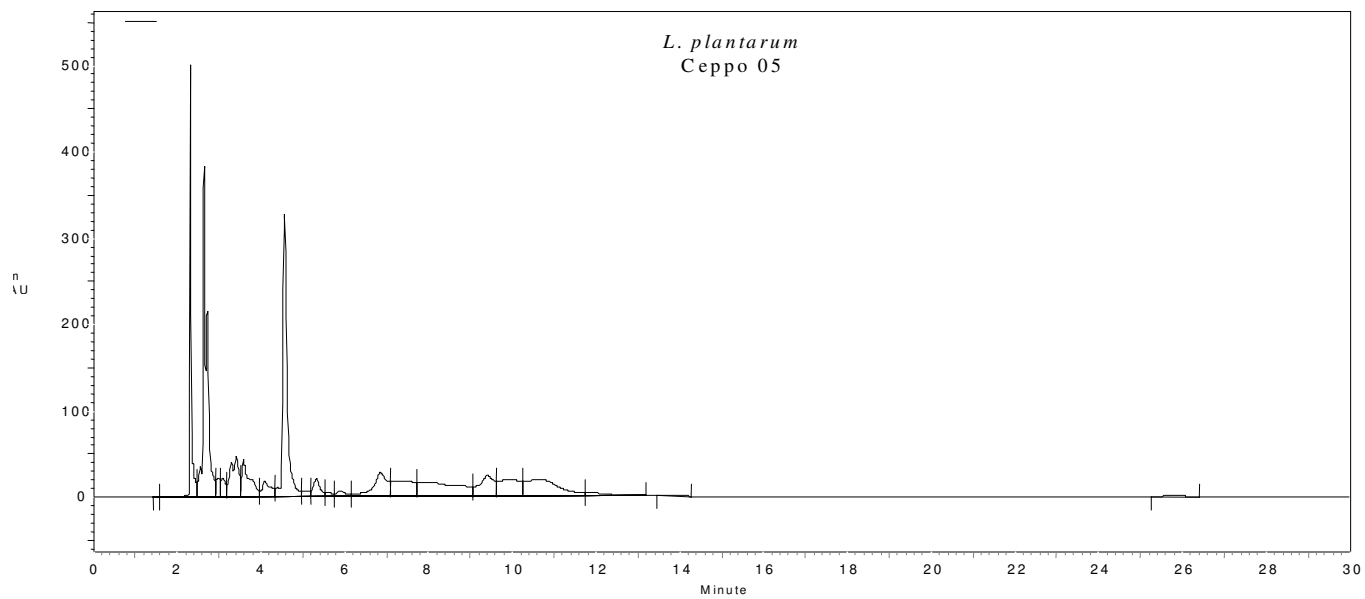


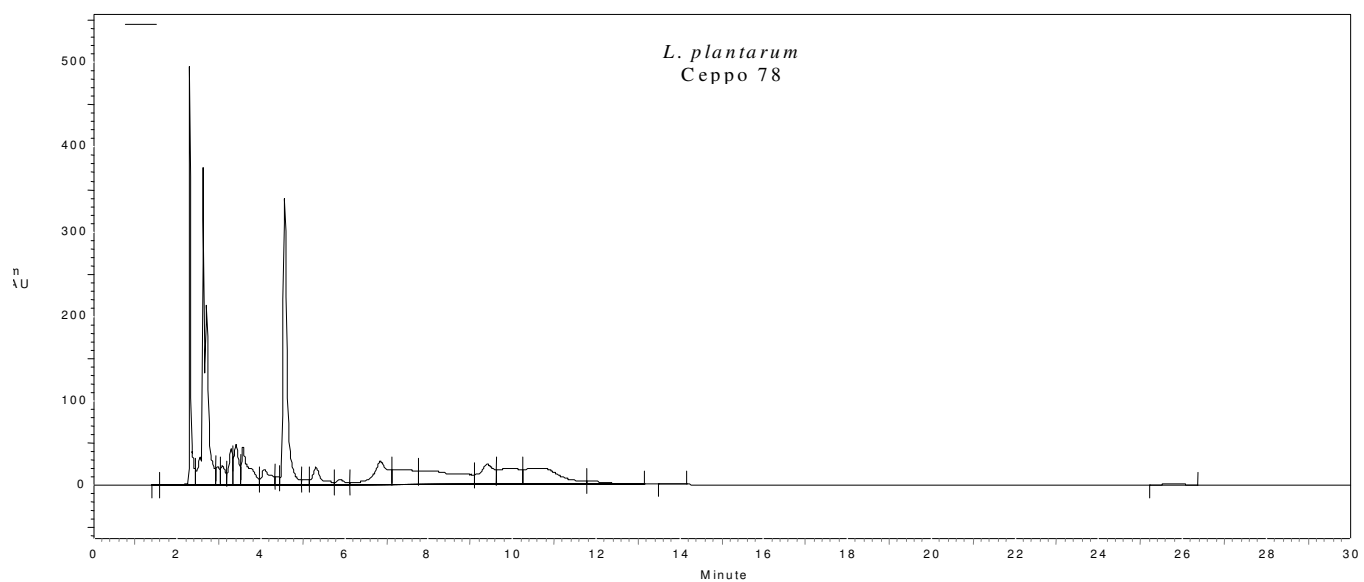
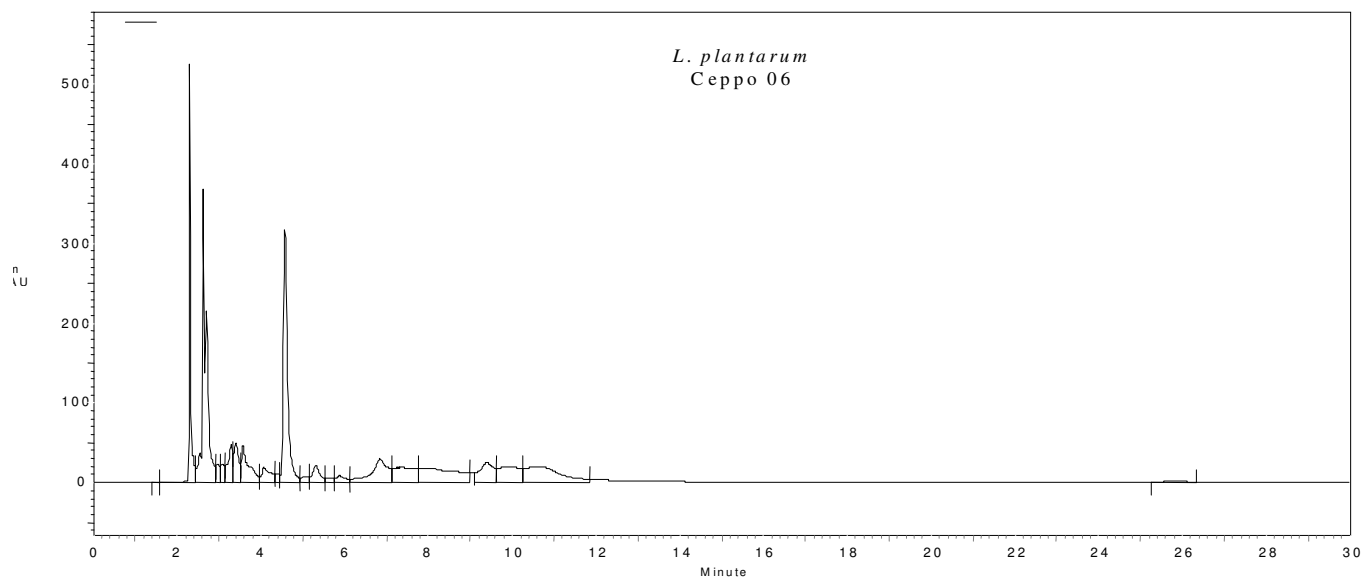












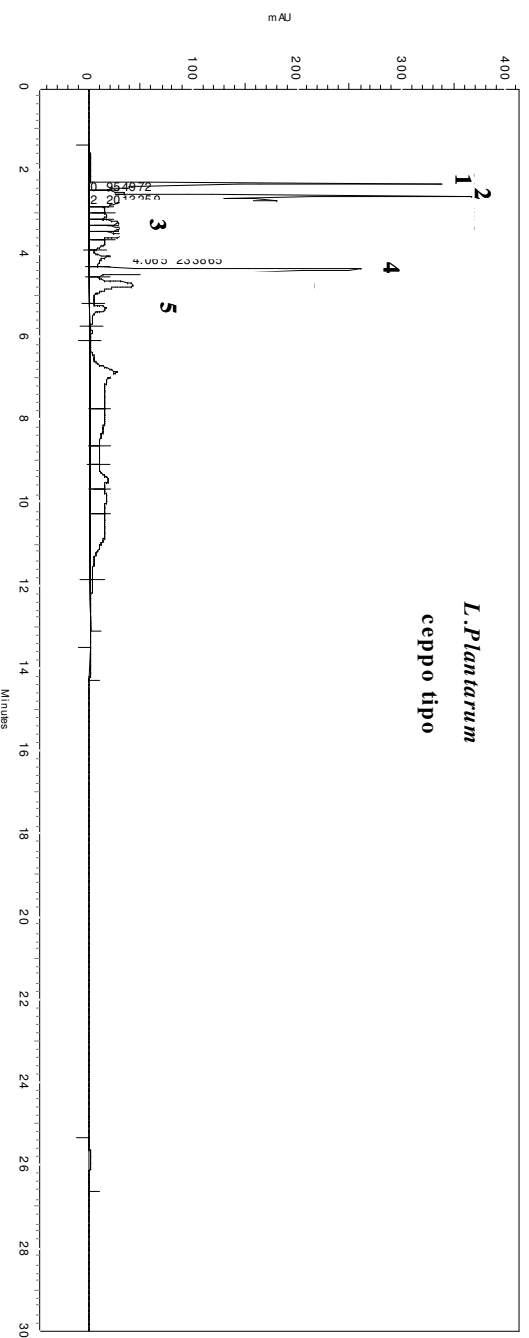


Grafico 4.15. Composti polifenolici presenti nel surnatante di radicechio inoculato con i ceppi di *L. hilgardii* e *L. plantarum*

In relazione ai due ceppi tipo (*L. plantarum* e *L. hilgardii*) è stata eseguita una raccolta frazionata dell'eluito, in modo da separare i singoli componenti costituenti il cromatogramma. Sono state raccolte 5 frazioni, sia per i ceppi di *L. plantarum* che di *L. hilgardii*, come indicato in figura **4.15**. I numeri 1-5 sui cromatogrammi rappresentano le frazioni raccolte, composte presumibilmente da un singolo picco, tranne la terza, che contiene tre picchi diversi. Nel tentativo di mettere in relazione i risultati ottenuti dall'analisi dei polifenoli con l'attività antiossidante, tutte le frazioni sono state saggiate per verificare tale attività. Una volta raccolte, sono state portate a secco, mediante "Speed Vac", e, successivamente, riospese in acqua, ad una concentrazione finale di 200mg/ml. I risultati sono riportati in tabella **4.12**. Tutti i picchi hanno mostrato attività. Il picco con maggiore percentuale di inibizione (43,78%) è risultato quello della quarta frazione, presente solo nel fermentato.

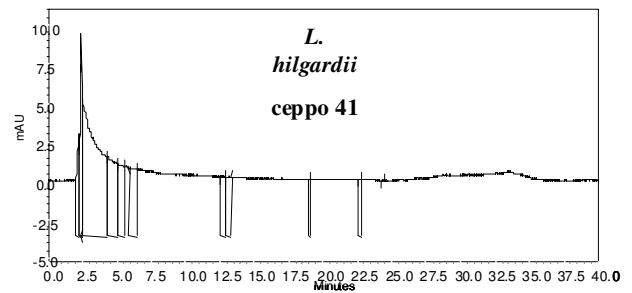
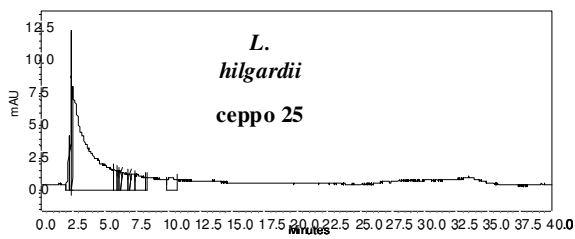
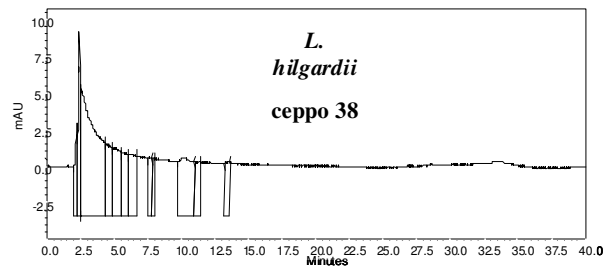
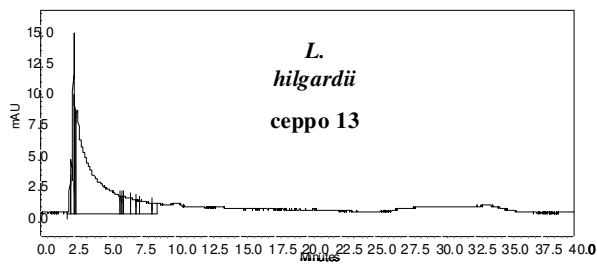
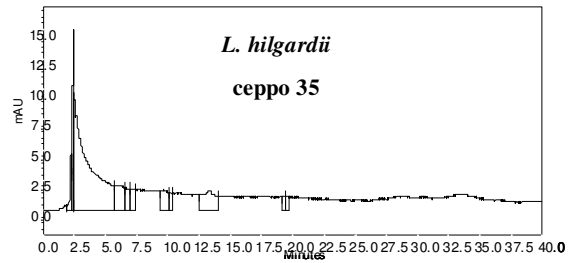
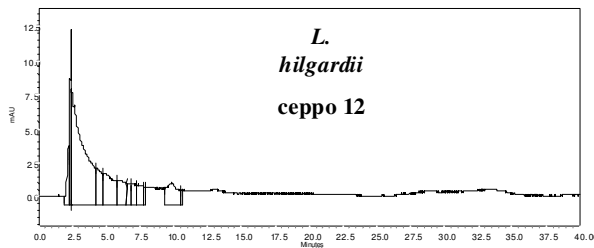
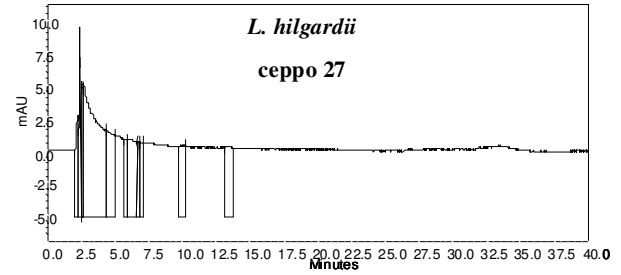
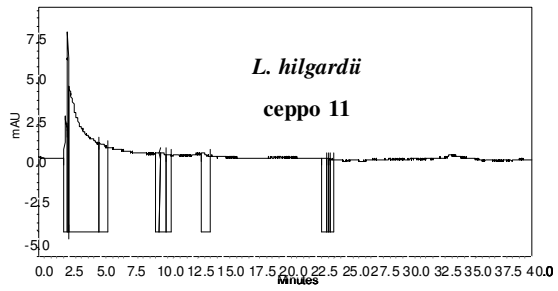
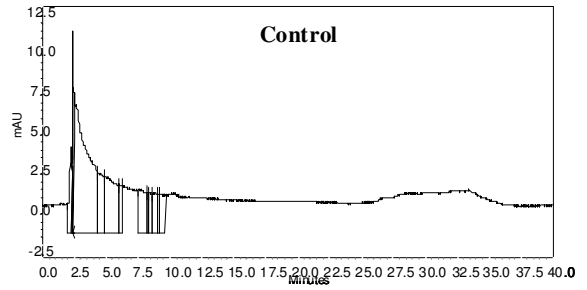
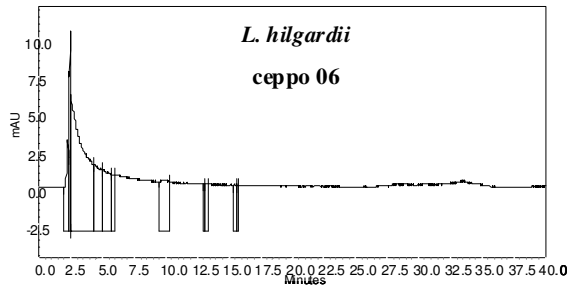
Tabella 4.12. Attività antiossidante (test del DPPH con 2mg di liofilizzato) presente in ciascuna frazione, ottenuta mediante separazione in HPLC, dei polifenoli

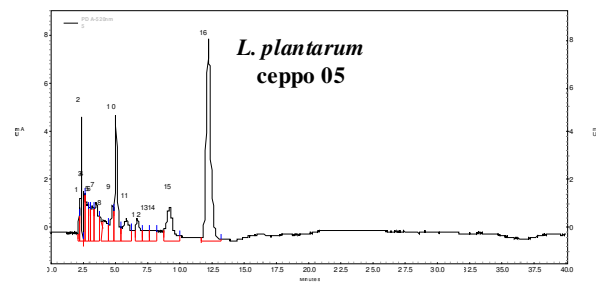
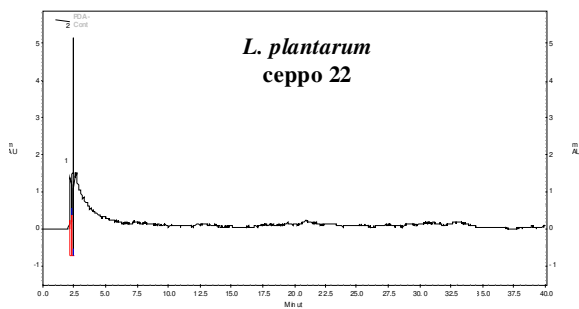
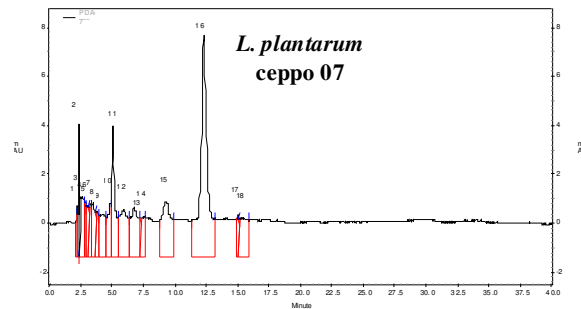
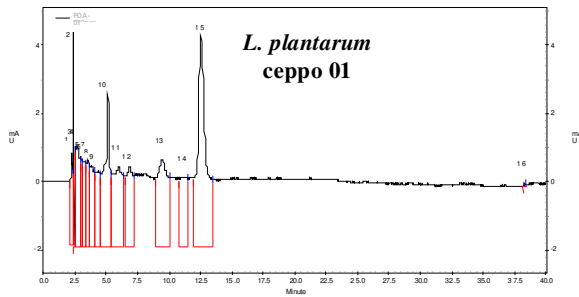
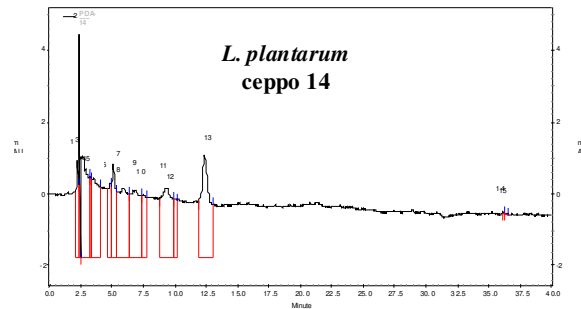
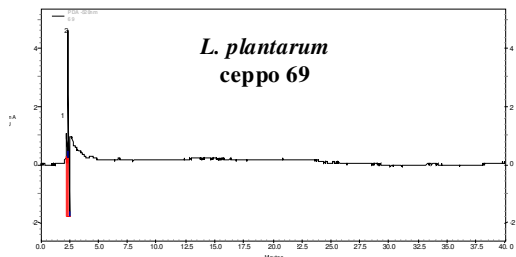
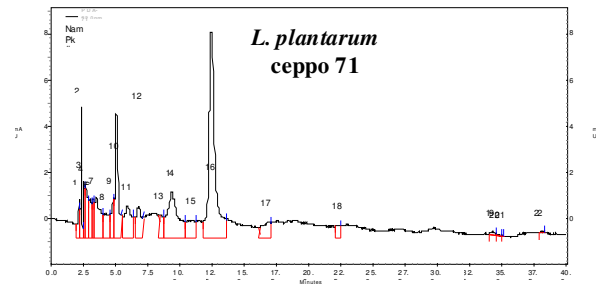
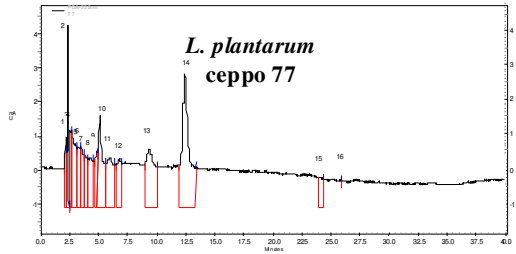
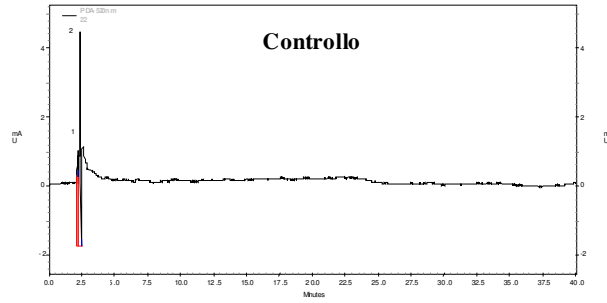
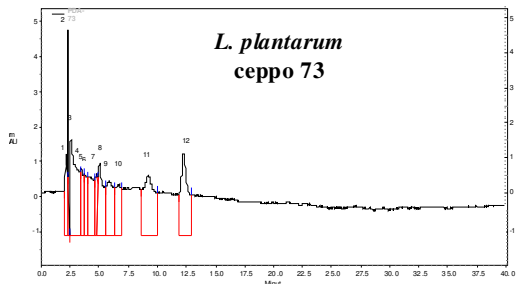
frazione	percentuale di inibizione
1	7%
2	56,49%
3	23,17%
4	43,78%
5	10,44%

Per quanto riguarda la determinazione delle sostanze presenti in ciascun picco, non è stato possibile ottenere un'identificazione completa con gli standard esterni utilizzati; infatti, solo le frazioni 4 e 5 sono state riconosciute, in base al tempo di ritenzione, quali acido cicorico e acido clorogenico rispettivamente, che sostanze note per la loro attività antiossidante.

4.6.2 Antociani

I cromatogrammi relativi alla composizione in antociani sono riportati in figura **4.16**. Il cromatogramma ottenuto dal radicchio di controllo non inoculato non presenta picchi, indicando la completa mancanza di questo genere di molecole nel surnatante; lo stesso si osserva dai cromatogrammi ottenuti dai fermentati dei ceppi di *L. hilgardii* selezionati da vinaccia. Nel caso della specie *L. plantarum* sono presenti alcuni picchi in 9 dei 13 fermentati, come anche in quelli del ceppo tipo di *L. plantarum* e di *L. hilgardii*. Confrontando i cromatogrammi dei ceppi che presentano picchi, se ne osservano tre, costituiti da composti che hanno tempo di ritenzione e spettro di assorbimento nell'UV (520nm) uguali in tutti i campioni. Questi picchi non sono mai stati osservati nel controllo. In tutti i cromatogrammi, nonostante il fatto che siano stati aggiunti due standard interni, con tempi di ritenzione simili a quelli ottenuti per i picchi, non è stato possibile identificare nessuno dei tre composti presenti.





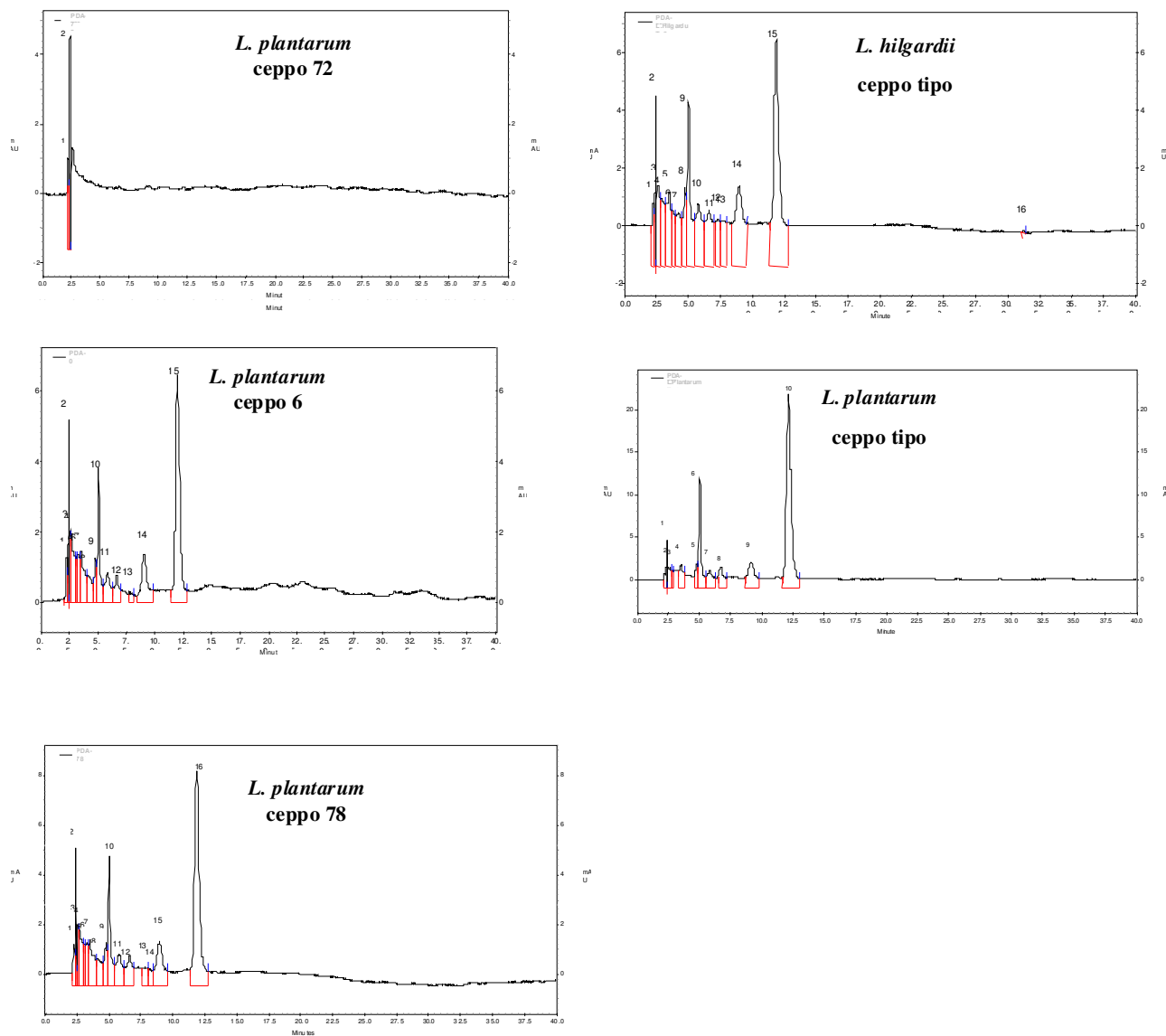


Grafico 4.16. Antociani dei campioni di *L. hilgardii* e *L. plantarum*.

Anche in questo caso, è stata eseguita una raccolta frazionata dell'eluato, in modo da separare i singoli componenti, riferibili alla famiglia degli antociani, costituenti il cromatogramma.. Tre sono state le frazioni raccolte dai ceppi tipo di *L. plantarum* e di *L. hilgardii*. I rispettivi tempi di ritenzione per ciascuna frazione sono i seguenti: F1, 4-7min.; F2, 7-11min.; F3, 11-15min. Tutte le frazioni sono risultate positive quando è stata saggiata l'attività antiossidante (tabella 4.12). Il composto riferibile al picco uno presenta l'attività maggiore.

Tabella 4.12. Attività antiossidante (test del DPPH con **1mg** di liofilizzato) presente in ciascuna frazione, ottenuta mediante separazione in HPLC degli antociani

Frazione	percentuale di inibizione
F1	12,52%
F2	4%
F3	5,97%

Con lo scopo di stimare la quantità dei composti bioattivi ignoti, presenti nelle frazioni uno e due, è stata calcolata l'area prodotta dai due picchi corrispondenti nei cromatogrammi per tutti i ceppi che li hanno presentati (grafico 4.17). Nel tentativo di mettere in relazione i risultati relativi alla presenza di diversi antociani, separati mediante HPLC, con l'attività antimicrobica, sono state saggiate le singole frazioni. Entrambe hanno dimostrato attività.

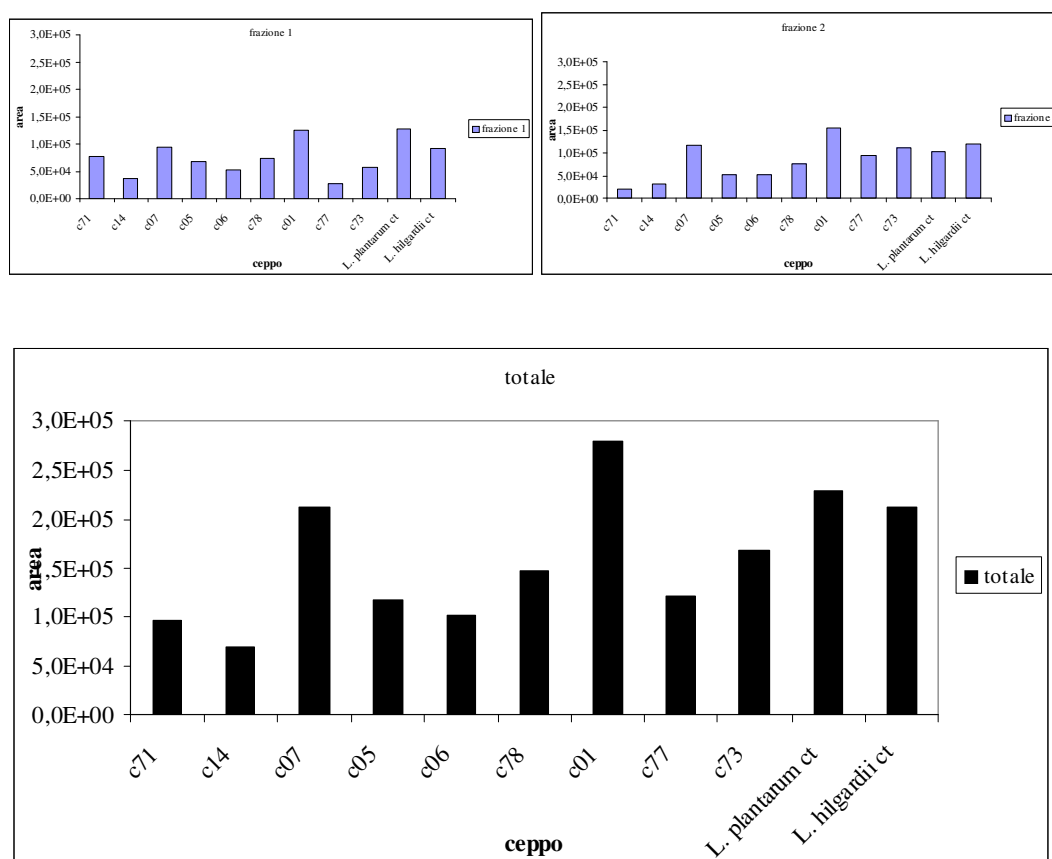


Grafico 4.17 Dimensione dell'area dei picchi raccolti con le frazioni 1 e 2 nei ceppi analizzati.

E' interessante notare, inoltre, che tutti i fermentati che non mostrano picchi nei cromatogrammi di separazione degli antociani non presentano attività antimicrobica. Come si può rilevare dal grafico

4.17, non sembra esserci una correlazione tra l'area sottesa dai singoli picchi frazionati e l'effetto antimicrobico, ma considerando la somma dell'area dei due picchi in questione si osserva che, sopra la soglia stimata di $1,5 \cdot 10^5$ unità di area, è sempre presente attività, ad eccezione del caso del ceppo 06, in cui l'effetto antimicrobico si presenta a valori lievemente inferiori. Una volta riportato il valore soglia alla quantità di principio attivo presente, nel momento in cui, identificate le molecole, sarà possibile determinare le esatte concentrazioni, probabilmente risulterà chiarito anche il caso rimasto dubbio. Si può, comunque, concludere che l'attività antimicrobica è legata alla presenza di antociani piuttosto che di polifenoli, dato che questa si osserva soltanto in presenza dei primi. Le concentrazioni di entrambi i composti, o meglio il rapporto tra le concentrazioni delle due molecole, in grado di scatenare l'effetto antimicrobico sarà calcolato con precisione una volta identificati i picchi.

CONCLUSIONI

- Il radicchio rosso (varietà di Chioggia) è risultato un ottimo terreno di crescita per i microrganismi fermentanti saggiati.
- Tra questi *L. plantarum* e *L. hilgardii* sono le specie che meglio si adattano al tipo di substrato considerato, in termini di produzione di biomassa e capacità acidificante.
- Confrontando l'attività antiossidante posseduta dal radicchio fermentato con i ceppi tipo di *L. plantarum* e *L. hilgardii*, rispetto al controllo, in cui la matrice vegetale è stata solo pastorizzata, percentuali di inibizione, mediante il test del DPPH, sono state osservate solo nei surnatanti liofilizzati ottenuti dai fermentati. Lo stesso risultato è stato osservato valutando l'attività antimicrobica.
- Successivamente è stata saggiata la capacità di sviluppo in radicchio di una serie di isolati naturali, appartenenti alle specie *L. plantarum*, *L. hilgardii* e *O. oeni*, collezionati da vinaccia destinata alla produzione di grappa. Tutti i ceppi sono stati in grado di crescere nella matrice vegetale.
- In relazione all'attività antimicrobica posseduta dai surnatanti liofilizzati, prodotti dai fermentati, soltanto quelli relativi ai ceppi di *L. plantarum* hanno inibito i microrganismi indicatori.
- Dei liofilizzati ottenuti da terreno di coltura di laboratorio, quelli relativi agli isolati naturali *L. plantarum* e *O. oeni* hanno inibito alcuni dei ceppi indicatori. In questo caso il trattamento con proteinasi-K ha evidenziato la natura proteica dell'agente antimicrobico, permettendo di ipotizzare la presenza batteriocine.
- In relazione alla capacità antiossidante (determinata mediante il metodo del DPPH) gli isolati di *L. plantarum* e *O. oeni* manifestano l'attività più elevata, anche se quest'ultima sembra sia specifica per il singolo ceppo piuttosto che attribuibile alla specie.
- Confrontando l'attività antiossidante posseduta dal radicchio fermentato, rispetto al controllo, in cui la matrice vegetale è stata solo pastorizzata, l'apporto della sola matrice è risultato molto limitato. L'attività di fermentazione sembra, in qualche modo, favorire la produzione o la conservazione, durante tutta la fase di crescita microbica, dei composti bioattivi.
- La composizione in polifenoli dei fermentati, ottenuti con i ceppi di *L. plantarum* e *L. hilgardii*, rivela la presenza di un composto specifico (identificato da un picco nell'analisi HPLC) assente nel controllo non inoculato.

- Antociani sono presenti nei fermentati ottenuti con il ceppo tipo di *L. hilgardii* e con i ceppi di *L. plantarum*. Confrontando i cromatogrammi di separazione si osservano tre picchi costituiti da composti che hanno, rispettivamente, il medesimo tempo di ritenzione e spettro di assorbimento nell'UV (520nm) in tutti i campioni e non sono presenti nel controllo non inoculato. Tutte e tre le frazioni corrispondenti sono risultate positive al test del DPPH, quando è stata saggiata l'attività antiossidante, mentre due su tre mostrano attività antimicrobica.
- Le concentrazioni di entrambi i composti, presenti nelle due frazioni attive, o meglio, il rapporto tra le concentrazioni delle due molecole sembra essere implicato nello scatenare l'effetto antimicrobico.

BIBLIOGRAFIA

Alberto M. R., Arena M. E., Manca de Nadra M. C., **2007**. Production of putrescine from agmatine by *Lactobacillus hilgardii*: effect of phenolic compounds. *Food Control*, **18** (8):898-903.

Alberto M. R., Farias M. E., **2001**. Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w growth and metabolism of organic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **49** (9): 4359-4363.

Alwazeer D., Cachon R., Divies C., **2002**. Behavior of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* in fresh and thermally processed orange juice. *Journal of food protection*, **65** (10): 1586-1589.

Ammor M. S., Baltasar M., **2007**. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: an update. *Meat Science*, **76**: 138-146.

Beneduce L., Spano G., Vernile A., Tarantino D., Massa S., **2004**. Molecular characterization of lactic acid populations associated with wine spoilage. *Journal of Food protection*, **44** (1): 10-16.

Borchia E., Kant-Muermansh M. L., Blixta Y., **1997**. Bacterial spoilage of meat and cured meat productions. *International Journal of Food Microbiology*, **33**(1): 103-120.

Cabras P., Martelli A., **2004**. Chimica degli alimenti. Editore Zanichelli.

Carnacini A., Del Pozzo A., **1986**. Componenti volatili dei mosti e dei vini in relazione alle tecnologie di ottenimento. *Vigne-vini*, **12**: 17-27.

Casas E., Faraldi M., Bildstein M., **2008**. Guida ai composti bioattivi nei residui di lavorazione dell'uva. Bioactive-Net.

Cotter P. D., Hill C., Ross R. P., **2005**. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 777-778.

De Rosa T., Castagner R., **1994**. Tecnologia delle grappe e dei distillati d'uva. Ed agricole.

de Vries M. C., Vaughon E. E., Kleerebezem M., de vos W. M., **2005**. *Lactobacillus plantarum*-

survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, **33**(1): 103-120.

Drosinos E.H., Paramithiotis S., Kolovos G., Tsikouras I., Metaxopoulos. I., **2007**. Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiology*, **24**: 260-270.

Kleerebezem M., Boekhorst J., van Kranenburg R., Molenaar D., Kuipers O. P., Leer R., *et al.*, **2003**. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **100** (4): 1990-1995.

Lante A., Rossetto M., Vanzani P., Spettoli P., Scarpa M., Rigo A., **2005**. Red Chicories as potent scavengers of highly reactive radicals: a study on their phenolic composition and peroxy radical trapping capacity and efficiency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 8169-8175.

Lorenzetti S., **2007**. Interazione tra contaminanti e/o fattori preventivi presenti nella dieta. Convegno: Valutazione rischio-beneficio di alimenti di origine animale: i prodotti lattiero-caseari e ittici.

Maldonado A., Jimenez-Diaz R., Ruiz-Barba J. L., **2004**. Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. *J. Bacteriol.*, **186**: 1556-1554.

Miliauskas G., Venskutonis P.R., T.A. van Beek., **2004**. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, **85**: 231-237.

Odello L., Giomo A., Versini G., Zironi R., **1997**. Grappa: analisi sensoriale e tecnologie. Editore: Centro studi e formazione Assaggiatori s.c.a. r.l.

Pimpini F., Chillemi G., Lazzarin R., Giannini M., Tosini F., **2003**. Il calendario dell'offerta. *Terra vita*, **50**: 14-17.

Rodriguez A. Y., Manca de Nadra M: C., **2007**. Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus hilgardii* and its effects on *Leuconostoc oenos* growth. *Current microbiology*, **30**: 23-25.

Royo-Bezares B., Saenz Y., Navarro L., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., Torres C., **2007**. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J 23 isolated from grape must. *Food Microbiology*, **24**:482-491.

Singh S., Goswami P., Singh R., Heller K. J., **2008**. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: a review. *LWT-Food Science and Technology*, 1-10.

Southon S., **1996**. Ruolo delle sostanze antiossidanti nella dieta nel mantenimento della salute. Traduzione a cura di Peri C.

Spano G., Lanvaud-Funel A., Claisse O., Massa S., **2006**. In vivo PCR-DGGE analysis of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* populations in red wine. *Current Microbiology*, **54**: 9-13.

van Leeuwenhoek A., **1999**. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Kluwer Academic Publishers*, **76**: 317-331.

Yanagida F., Chen Y., Shinohara T., **2005**. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from soils in vineyards. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **51**: 313-318.

Zambonelli C., **2003**. *Microbiologia e Biotecnologia dei Vini. Edagricole.*

ALLEGATO -MEZZI COLTURALI

A. MRS AGAR Terreno in polvere per la coltivazione dei lattobacilli

Composizione MRS Agar g/l	
Peptone	10.00
Estratto di carne	10.00
Estratto di lievito	5.00
Glucosio	20.00
Potassio fosfato bib.	2.00
Sodio acetato	5.00
Ammonio citrato	2.00
Magnesio solfato	0.20
Manganese solfato	0.05
Tween 80	1.00
Agar	15.00

B. MRS BROTH Terreno in polvere per la coltivazione dei batteri lattici

Composizione MRS broth g/l	
Peptone	10.00
Estratto di carne	10.00
Estratto di lievito	5.00
Glucosio	20.00
Potassio fosfato bib.	2.00
Sodio acetato	5.00
Ammonio citrato	2.00
Magnesio solfato	0.20
Manganese solfato	0.05
Tween 80	1.00

C. Nutrient Broth (NB senza aggiunta di agar, NA con la aggiunta di 1,5% di agar): terreno generale di crescita

Composizione Nutrient broth g/l	
Estratto di carne	3.00
Peptone	5.00

D. Yeast Morphology Broth (YM): terreno di crescita di lieviti

Composizione Yeast Morphology Broth g/l	
Ammonio solfato	3.50
Asparagina	1.50
Glucosio	10.00
Amminoacidi	0.05
Vitamine	5.60
Sali	1.70

E. M17 BROTH/ AGAR terreno selettivo per la coltivazione dello *Streptococcus thermophilus*

Composizione M17 Broth g/l	
Idrolisato triptico di caseina	2.50
peptone	2.50
Peptone di soia	5.00
Estratto di lievito	2.50
Estratto di carne	5.00
Sodio glicerofosfato	19.00
Magnesio solfato	0.25
Acido ascorbico	0.50
Lattosio	5.00

F. BRAIN HEART INFUSION (BHI), terreno di uso generale

Composizione Brain Heart	
Infusion Broth	g/l
Cervello di vitello	12.50
Cuore di bue	2.50
Peptocomplex	10.00
Glucosio	2.00
Sodio cloruro	5.00
Sodio fosfato bibasico	2.50
Magnesio solfato	0.25
Acido ascorbico	0.50
Lattosio	5.00

G. COMPOSIZIONE BUFFER FOSFATO 50 nM pH 7.5

Reagente	g/l
Monosodium phosphate	1,298
Disodium phosphate	10,879

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare la Prof.ssa V. Corich per la possibilità per avermi concesso la possibilità di affrontare un progetto di studio particolarmente interessante e la Dr.ssa D. Kagkli per la pazienza e la disponibilità con cui mi ha seguito in tutte le fasi del mio internato di laurea

Vorrei ringraziare, inoltre, il personale e tutti coloro che in questi mesi hanno operato nel laboratorio di Biotecnologie Agrarie della facoltà di Agraria dell'Università di Padova per la disponibilità concessami e per l'aiuto prestatomi.

Un ringraziamento particolare va, infine, ai miei familiari per avermi dato la possibilità di intraprendere gli studi universitari e di essermi stati vicini nei momenti di difficoltà.