L'INTEGRATORE NUTRIZIONALE®

ISSN 1127-6320 Bimestrale. Poste Italiane s.p.a. - Spedizione in Abbonamento Postale
D.L. 353/2003 (convertito in Legge 27/02/2004 n° 46) art. 1, comma 1, LO/MI

4•2025
LUGLIO
AGOSTO

PROBIOTICS *prebiotics* AND POSTBIOTICS

CEC EDITORE

AUTORI
F. Sacco[1], F. Colonna[2], C. Fachechi[2], C. Benvegnù[3]
[1]LIFe – Laboratorio Italiano Fermentati, Pieve di Cento
[2]SPECCHIASOL, Bussolengo
[3]NAMED, Lesmo

flavio.sacco@liferments.com

Caratterizzazione microbica e metabolica di diverse verdure fermentate spontaneamente come potenziali postbiotici

Il microbiota delle verdure fermentate può influenzare la produzione di metaboliti nella realizzazione di alimenti fermentati funzionali per il benessere umano

ABSTRACT

Microbial and metabolic profiling of spontaneously fermented vegetables as a natural source of postbiotics

How microbial assembly in fermented cabbage and carrot drives the generation of health-relevant metabolites for next-generation functional foods

Fermented foods are gaining popularity for their ease of inclusion in daily diets and their reported health benefits, yet the mechanisms linking intake to specific physiological effects remains unclear. This study investigated metabolic transformations and microbial diversity in spontaneously fermented vegetables. At the end of fermentation, each matrix displayed a distinct metabolite profile. Organic acids, active folate forms, trace vitamin B12, vitamin C derivatives, and antioxidant molecules were detected, qualifying as potential postbiotics. Fermentation also enhanced the bioaccessibility of key phytochemicals, including isothiocyanates, GABA, β-carotene and other carotenoids. Amplicon sequencing revealed well-diversified, yet vegetable-specific microbiota dominated by lactic-acid bacteria; these taxa possess complementary metabolic capacities and create a self-stabilising, safe environment—an aspect critical for future functional-food development. The data show that spontaneous fermentation not only sustains a complex microbial ecosystem but broadens the spectrum of health-relevant metabolites that may underlie the benefits attributed to fermented

PAROLE CHIAVE
Fermentazione
Verdure fermentate
Postbiotici
Metaboliti

CEC Editore

foods. These findings highlight the potential of harnessing spontaneous fermentation to upgrade vegetables into postbiotic-rich functional foods through targeted management of microbial and metabolic diversity. Future work should couple substrate selection with predictive models of fermentation dynamics to steer natural consortia toward consistent, safe, and nutritionally valuable postbiotic production.

RIASSUNTO

Gli alimenti fermentati suscitano crescente interesse per la facile inclusione nella dieta e i benefici riportati, sebbene i meccanismi che li collegano alla salute siano ancora poco chiari. In questo lavoro abbiamo analizzato cavolo cappuccio bianco, cavolo cappuccio rosso e carota fermentati spontaneamente, valutandone metaboliti contenuti e comunità microbiche. A fine processo ogni matrice presenta un profilo chimico distintivo: oltre a importanti concentrazioni di lattato compaiono forme attive di folati (5-metil-THF), tracce di vitamina B12, derivati della vitamina C e molecole antiossidanti, tutti candidati postbiotici. La fermentazione aumenta inoltre la bioaccessibilità di composti tipici delle verdure, come isotiocianati, GABA, β-carotene e altri carotenoidi.
La caratterizzazione genetica rivela microbioti ad alta biodiversità ma specifici per ciascun vegetale, dominati da batteri lattici con funzioni complementari che acidificano e proteggono l'ambiente, garantendo la sicurezza del prodotto; nessun patogeno è stato rilevato. I risultati confermano quindi che la fermentazione spontanea, oltre a mantenere un ecosistema complesso, arricchisce lo spettro di metaboliti bioattivi che possono spiegare gli effetti salutistici attribuiti ai fermentati. Queste evidenze aprono la strada allo sviluppo di alimenti vegetali funzionali "postbiotici", ottenuti tramite consorzi microbici naturali ma controllati. Il passo successivo sarà elaborare modelli predittivi che combinino tipo di substrato e condizioni di fermentazione, così da guidare in modo replicabile la produzione di metaboliti utili al metabolismo umano, con standard elevati di sicurezza e qualità.

Introduzione

La fermentazione degli alimenti è una pratica millenaria, profondamente radicata in tutte le culture umane e oggi al centro di un rinnovato interesse scientifico per il suo ruolo nella nutrizione e nella salute. La definizione moderna, proposta dall'International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (**1**), la descrive come un processo di crescita microbica desiderata e trasformazione enzimatica dei componenti alimentari. Questo processo è responsabile della conservazione, arricchimento nutrizionale, modulazione organolettica e, sempre più spesso, di potenziali benefici per la salute.
Storicamente, la fermentazione ha avuto la funzione primaria di preservare alimenti facilmente deperibili, come le verdure, ma oggi sappiamo che le sue implicazioni vanno ben oltre. Le trasformazioni chimiche operate dai microrganismi durante la fermentazione producono e rendono disponibili una varietà di composti bioattivi, come acidi organici, polifenoli, metaboliti aromatici e postbiotici, che possono interagire con il microbiota intestinale umano e con i recettori cellulari dell'ospite, modulando funzioni digestive, immunitarie e metaboliche.
Oggi, vengono particolarmente studiate le verdure della famiglia *Brassicaceae* (es. cavolo, cavolfiore, broccoli), perché fermentate in prodotti tradizionali come kimchi e crauti che si stanno diffondendo in maniera importante nella società. Studi clinici e preclinici dimostrano che questi alimenti fermentati possono influenzare positivamente parametri di salute come la composizione del microbiota intestinale, la funzione della barriera intestinale e i marker infiammatori sistemici. In modelli in vitro,

CEC Editore

per esempio, metaboliti come l'acido lattico, il D-fenil-lattato (D-PLA) e l'indolo-3-lattato (ILA) mostrano effetti protettivi contro il danno epiteliale mediato da citochine infiammatorie (**2**).

La fermentazione alimentare può essere vista come un'estensione funzionale del microbioma umano: un ponte ecologico tra i microrganismi ambientali e quelli intestinali. Questa connessione offre all'uomo un mezzo per arricchire il proprio ecosistema microbico interno con nuove funzioni metaboliche e immunomodulatorie, derivate dai microrganismi presenti negli alimenti. L'adozione e lo studio dei cibi fermentati si stanno rivelando strumenti fondamentali per comprendere come la dieta possa modulare la salute attraverso il microbiota (**3**,**4**).

Inoltre, un aspetto fondamentale della fermentazione è la formazione dinamica del microbiota dell'alimento stesso, un ecosistema microbico in continua evoluzione influenzato da fattori ambientali, dalla composizione del substrato e dall'eventuale impiego di colture *starter*. Fermentazioni spontanee, *back-slopping* e fermentazioni guidate portano alla selezione di consorzi microbici distinti, ciascuno responsabile della produzione di profili metabolici unici. È proprio questa varietà a determinare le proprietà nutrizionali, sensoriali e funzionali del prodotto finale.

Oggi, grazie alle tecniche di metagenomica e metabolomica, possiamo descrivere con maggiore precisione la composizione microbica e la produzione metabolica dei cibi fermentati. Queste analisi hanno evidenziato come la fermentazione non solo aumenti la bioaccessibilità di vitamine, molecole antiossidanti e composti fenolici, ma produca anche metaboliti unici come l'acido indol-3-lattico (ILA), in grado di attivare recettori nucleari come l'AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor), coinvolti nella regolazione immunitaria e dell'omeostasi intestinale (**5**).

In sintesi, la fermentazione degli alimenti rappresenta oggi uno dei temi più promettenti per la nutrizione funzionale e la salute pubblica. L'azione combinata di microrganismi vivi, metaboliti e composti bioattivi rende questi alimenti potenzialmente capaci di modulare positivamente il microbiota intestinale, sostenere l'integrità della barriera intestinale e influenzare vie di segnalazione dell'ospite. Questo approccio ecologico e sistemico all'alimentazione apre scenari innovativi nel rapporto tra uomo, cibo, ambiente e salute.

Le sfide per il futuro sono quelle di modulare in maniera specifica la formazione del microbiota degli alimenti fermentati e la conseguente formazione quali-quantitativa di metaboliti. In particolare, la formazione del microbiota negli alimenti fermentati assume una connotazione importante nella sicurezza alimentare di questi prodotti, che derivano da tecniche tradizionali e sono spesso legate a tradizioni gastronomiche, senza un vero e proprio supporto scientifico o analitico al monitoraggio dei processi produttivi.

Il presente studio ha indagato il profilo dei metaboliti e la composizione microbica in diverse verdure fermentate spontaneamente, fra le più diffuse, in modo da raccogliere informazioni di base, utili per comprendere i cambiamenti metabolici indotti dall'intero processo di fermentazione e il ruolo del microbiota specifico per ogni verdura. Questo ci permetterà di indirizzare processi di produzione naturali, finalizzati a ottenere alimenti vegetali funzionali postbiotici.

Materiali e Metodi

Preparazione verdure fermentate

Le materie prime, carota arancio (*Daucus carota* L.), cavolo cappuccio (*Brassica oleracea* var. *capitata*) e cavolo cappuccio viola (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra)*, sono state fornite e fermentate presso LIFe-Laboratorio Italiano Fermentati srl e sono il risultato dei processi di produzione normalmente portati avanti per la produzione di una linea commerciale di verdure fermentate non pastorizzate[1].

In breve, il processo parte dalla ricezione delle materie prime: le verdure fresche utilizzate per il processo produttivo provengono da aziende agricole certificate biologiche, selezionate al fine di garantire la massima freschezza e qualità dei prodotti. Successivamente, vengono

[1]Orto Fermentato, linea di verdure fermentate e non pastorizzate, prodotte da LIFe – Laboratorio Italiano Fermentati srl a Pieve di Cento (BO).

CEC Editore

controllate, lavate ed eliminate le parti rovinate che potrebbero compromettere la fermentazione. Ogni verdura viene poi tagliata, salata ed eventualmente combinata con altri ingredienti, secondo ricette proprietarie dell'azienda, prima di essere spostata nei contenitori dove viene promossa e controllata una fermentazione spontanea per circa 2-3 settimane. La fermentazione viene controllata attraverso il monitoraggio di diversi parametri, fra cui la temperatura, la salinità, il pH e altri parametri non divulgabili perché conoscenze esclusive sui processi produttivi, oggi patrimonio conoscitivo dell'azienda. Una volta raggiunti i valori di parametri prestabiliti le verdure fermentate vengono tolte dai contenitori e confezionate per poi essere commercializzate o ulteriormente lavorate.

Analisi dei metaboliti

La materia prima e il prodotto fermentato sono stati sminuzzati finemente e circa 50 g congelati a -80 °C per poi essere liofilizzati.

Il prodotto liofilizzato è stato sottoposto ad estrazione con opportuno solvente e l'estratto purificato e concentrato se necessario.

Per ogni analita è stata utilizzata la seguente tecnica:

- Acidi grassi a corta catena – determinati mediante metodica UHPLC-HR-MS.
- Vitamine liposolubili e carotenoidi – determinate mediante metodica UHPLC-DAD.
- Vitamina C – determinata mediante metodica HPLC-DAD.
- Folati – determinati mediante metodica UHPLC-HR-MS.
- Vitamina B12 – determinata mediante metodica UHPLC-HR-MS.
- Acido g-Aminobutirrico (GABA) – determinato mediante metodica UHPLC-HR-MS.
- Polifenoli totali - quantificati mediante metodica colorimetrica (Folin).

Analisi genetiche

I campioni sono stati processati in ambiente sterile, sezionati con bisturi e pesati in aliquote da 250 mg ciascuna. L'estrazione del DNA è stata effettuata secondo il protocollo sviluppato da Wellmicro. In breve, i campioni vengono sottoposti a lisi meccanica mediante biglie inerti e omogeneizzati con FastPrep. L'estrazione e la purificazione del DNA vengono poi eseguite utilizzando il kit DNeasy 96 PowerSoil Pro su piattaforma automatizzata QIAcube HT (Qiagen).

La quantificazione del DNA microbico è stata effettuata con il kit Qubit™ 1X dsDNA Broad Range (BR) Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) utilizzando lo strumento Synergy (Agilent). Il DNA è stato quindi normalizzato a una concentrazione di 13,3 ng/µL. I campioni normalizzati sono stati impiegati per la preparazione delle librerie metagenomiche mediante il kit Illumina DNA Prep, seguendo il protocollo del produttore adattato alla piattaforma automatizzata Hamilton Vantage (Hamilton). In ogni sessione di preparazione delle librerie sono stati inclusi controlli interni per garantire la qualità del processo.

Per determinare la dimensione delle librerie ottenute, i campioni sono stati analizzati mediante elettroforesi capillare con lo strumento Qiaxcel (Qiagen). Successivamente, le librerie sono state quantificate utilizzando il kit Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity (HS) Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) e normalizzate a una concentrazione finale di 4 nM. Infine, il pool di librerie è stato caricato sullo strumento NovaSeq6000Dx per il sequenziamento.

L'assegnazione tassonomica è stata eseguita confrontando i k-meri presenti nelle reads con quelli contenuti in un database di riferimento curato internamente. Questo database comprende genomi di riferimento selezionati per rappresentare la diversità tassonomica di interesse e garantire l'affidabilità dei risultati. Il metodo si basa sull'identificazione esatta di k-meri condivisi tra le letture e il database, consentendo un'assegnazione rapida ed efficace anche in campioni metagenomici complessi.

Indici di biodiversità

I dati di abbondanza tassonomica relativi ai tre campioni di verdure fermentate (cavolo cappuccio bianco, cavolo cappuccio viola, carota) sono stati estratti dal file originale dove venivano riportate le percentuali di presenza di ciascun gruppo microbico (OTU/ASV) calcolata dall'analisi metagenomica. I dati sono stati importati in Python 3.9 mediante la libreria *pandas* (v. 1.5.0).

CEC Editore

Tabella 1 • Riassunto degli analiti analizzati per singola verdura, sia fresca che fermentata

	Carote		Cavolo cappuccio bianco		Cavolo cappuccio viola	
Analita	Fresco	Fermentato	Fresco	Fermentato	Fresco	Fermentato
	mg/100 g		mg/100 g		mg/100 g	
Acido Lattico	NR	1092 ± 88	NR	988 ± 68	NR	1312 ± 64
Acido Acetico	NR	Tracce	NR	11 ± 3	NR	170 ± 12
Acido Succinico	NR	Tracce	NR	Tracce	NA	NA
Acido Propionico	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Acido Butirrico	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Carotenoidi	8.4 ± 0,3	11,5 ± 0,2	0,11 ± 0,01	0,07 ± 0,01	NR	NR
Retinolo eq.	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,1	0,021 ± 0,001	NR	NR	NR
Tocoferoli	0,43 ± 0,02	0,61 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,06 ± 0,01	NR	NR
Glucosinolati	NA	NA	34,4 ± 3,7	NR	24,8 ± 2,2	NR
Isotiocianati (ITC)	NA	NA	NR	4,4 ± 0,3	NR	3,5 ± 0,2
Ascorbigeno	NA	NA	NR	3,9 ± 0,4	NR	2,1 ± 0,2
Vitamina C	5,1 ± 0,2	2,2 ± 0,1	35 ± 2	21 ± 1	47 ± 2	29 ± 4
Antocianine	NA	NA	NA	NA	111 ± 3	92 ± 2
Polifenoli totali	4,4 ± 0,2	6,2 ± 0,3	64,4 ± 2,1	56,1 ± 3,3	164 ± 8,9	214 ± 12
Folati totali	0,011 ± 0,002	0,017 ± 0,003	0,028 ± 0,003	0,041 ± 0,004	0,033 ± 0,002	0,041 ± 0,004
GABA	3,8 ± 0,2	4,5 ± 0,3	10,6 ± 0,6	13,1 ± 0,4	9,2 ± 0,6	11,1 ± 0,5
Vitamina B12 (µg/100 g)	NR	NR	0,018 ± 0,001	0,023 ± 0,002	0,028 ± 0,002	0,038 ± 0,003

NR < LOD; tracce, < LOQ; NA, non analizzato.

Non sono state applicate trasformazioni di rarefazione, poiché i valori erano già espressi in percentuale relativa del totale sequenze assegnate per campione. Per ogni matrice sono stati calcolati tre indici di biodiversità:

- Richness (S) – numero di taxa con abbondanza > 0 riportati nei dati.
- Indice di Shannon (H')= -∑ [pi*log(pi)], dove pi è l'abbondanza relativa di ciascun taxon; l'indice quantifica simultaneamente ricchezza e uniformità.
- Indice di Simpson inverso (1/D) = 1/ ∑ [pi^2]; il complemento (1 – D) misura la probabilità che due letture scelte a caso appartengano a taxa differenti, evidenziando l'omogeneità della comunità.

Le percentuali sono state trasformate in proporzioni dividendo per 100; i calcoli sono stati eseguiti con *NumPy* (v. 1.23). Tutti gli indici sono stati arrotondati a due decimali e raccolti in un *DataFrame* riepilogativo.

Risultati

Le verdure sono state analizzate dal punto di vista della composizione microbica al termine del processo di fermentazione, mentre gli analiti sono stati rilevati prima e dopo la fermentazione, in modo da evidenziare le differenze apportate dall'intero processo produttivo.

Metaboliti

Carota

Dopo la fermentazione è stata rilevata una significativa quantità di acido lattico (circa 1%) e minori quantità di acetico e succinico, composti non rilevati nella materia prima.

Relativamente alle vitamine liposolubili e ai carotenoidi, il processo di fermentazione ne ha significativamente aumentato le quantità. Al contrario, è stata rilevata una significativa diminuzione della vitamina C.

CEC Editore

Relativamente ai folati totali, il 5-metil-tetraidrofolico (5M-THF), una forma bioattiva del folato, ne costituisce più del 75%.

Cavolo cappuccio bianco

Dopo la fermentazione è stata rilevata una significativa quantità di acido lattico (circa 1%) e minori quantità di acetico (0,011%), composti non rilevati nella materia prima. Relativamente alle vitamine liposolubili, ai carotenoidi e alla vitamina C, il processo di fermentazione ne ha ridotto la quantità. Al contrario, i quantitativi di folati, GABA e B12 incrementano dopo la fermentazione. Relativamente ai folati totali, il 5-metil-tetraidrofolico ,5M-THF) ne costituisce più del 72%. Non sono state rilevate variazioni significative per quanto riguarda la concentrazione di polifenoli totali.

Nella materia prima sono stata rilevati diversi glucosinolati costituiti principalmente da sinigrina e da minori quantità di glucobrassicina e gluconapina. Questi composti non sono stati rilevati nel prodotto fermentato perché convertiti in diversi metaboliti, in particolare isotiocianati. Tra questi, il principale è l'isotiocianato di allile (allil-ITC), derivato dalla sinigrina. Nel prodotto fermentato è stato rilevato un composto, non presente nella materia prima; dopo indagine mediante metodica UHPLC-HR-MS/MS, è stato tentativamente identificato come ascorbigeno, un composto di condensazione tra acido ascorbico (vitamina C) e triptofano.

Cavolo cappuccio viola

Dopo la fermentazione è stata rilevata una significativa quantità di acido lattico (circa 1,3%) e minori quantità di acetico (0,17%), composti non rilevati nella materia prima. La fermentazione ha ridotto la quantità di acido ascorbico. Al contrario, le quantità di polifenoli totali, folati e vitamina B12 incrementano dopo la fermentazione. Relativamente ai folati totali, il 5-metil-tetraidrofolico (5M-THF) ne costituisce più del 79%. Non è stata rilevata nessuna variazione quantitativa per quanto riguarda il GABA. Nella materia prima sono stati rilevati diversi glucosinolati, costituiti principalmente da progoitrina, glucorafanina, sinigrina e glucobrassicina. Questi composti non sono stati rilevati nel prodotto fermentato perché convertiti in diversi metaboliti, in particolare isotiocianati. Tra questi, sono stati rilevati sulforafano e isotiocianato di allile (allil-ITC) e minori quantità di indolp-3-carbinolo. Nel prodotto fermentato è stato rilevato ascorbigeno, circa 2,1 mg/100 g, ma in quantità inferiore rispetto al cavolo bianco fermentato, circa 3,9 mg/100 g.

Nella materia prima e nel prodotto fermentato sono state rilevate antocianine, in particolare cianidina-3-diglucoside-5-glucoside e cianidina-3,5-diglucoside.

La fermentazione sembra non avere influenza sul contenuto qualitativo e quantitativo di questi composti.

Composizione del microbiota dei fermentati

L'analisi metagenomica ad ampliconi dei tre campioni di verdure fermentate (cavolo cappuccio bianco, cavolo cappuccio viola e carota) ha restituito un quadro di notevole ricchezza tassonomica (276-333 Operational Taxonomic Unit, OTU totali), ma, al tempo stesso, di forte specializzazione: poche specie dominano oltre l'80 % della comunità in ciascuna matrice. Come atteso, la quasi totalità delle sequenze appartiene all'ordine *Lactobacillales*, confermando il ruolo dei batteri dell'acido lattico (LAB) come motore biochimico della fermentazione vegetale (Tabella 2).

Nel cavolo bianco spicca *Latilactobacillus curvatus* (≈ 10%), specie nota per la produzione di batteriocine attive contro *Listeria monocytogenes* (**6**) e per la capacità

Tabella 2 • Indici di biodiversità per le singole verdure fermentate

Verdura	Richness (N. taxa)	Shannon (diversità)	Simpson (omogeneità)
Carota	276	2,65	0,91
Cavolo cappuccio bianco	333	2,68	0,92
Cavolo cappuccio viola	308	2,63	0,91

CEC Editore

di sintetizzare GABA (**7**): caratteristiche che la rendono interessante sia sotto il profilo della sicurezza sia come candidata probiotica. La comunità è completata da *Leuconostoc mesenteroides* e da minoranze di *Pediococcus pentosaceus* e *Latilactobacillus sakei*, che contribuiscono alla maturazione aromatica e alla stabilità del pH.

Nel campione di carota la specie chiave è *Lactiplantibacillus plantarum* (≈14%), lattobacillo folatogeno e resistente all'acidità, ampiamente documentato come probiotico multifunzionale (**8-10**). In seconda linea si trovano *Limosilactobacillus fermentum* e *Levilactobacillus brevis*, entrambi in grado di rilasciare indolo-3-lattato (ILA) e di contribuire all'aroma attraverso composti volatili acetoino-diacetilici (**11,12**).

Il cavolo viola mostra la biodiversità intra-familiare più marcata: oltre il 70% delle sequenze è ascrivibile a cluster non classificati di *Lactobacillaceae*, indicativi di un consorzio spontaneo complesso ma fortemente acidofilo; fra le specie identificate emergono *L. brevis* e *L. plantarum*, con ruoli complementari nella produzione di CO_2, e lattato (**13**). In tutti i campioni la ricerca di possibili patogeni enterici ha dato esito negativo (**Tabella 3**). Ciò conferma l'efficacia del processo fermentativo nel selezionare un microbiota sicuro e stabile.

Pur partendo da matrici vegetali differenti, i tre fermentati convergono verso un core-microbiota dominato da LAB che assicura:

- produzione di metaboliti postbiotici (lattato, acetato, GABA, folati, ILA);
- bioconservazione naturale grazie a batteriocine e pH acido;
- assenza di specie patogene dominanti, garanzia di sicurezza per il consumo.

Tabella 3 • Elenco delle specie dominanti batteriche e abbondanza relativa in ogni verdura fermentata. Il limite di abbondanza relativa per considerare una specie fra le dominanti è stato arbitrariamente imposto al 0,5%

Verdura	Specie	Abbondanza relativa in %
Carota	*Lactiplantibacillus plantarum*	13,49
	Lactiplantibacillus pentosus	1,42
	Leuconostoc mesenteroides	0,88
	Levilactobacillus brevis	0,65
Cavolo cappuccio bianco	*Latilactobacillus curvatus*	9,80
	Levilactobacillus brevis	4,67
	Leuconostoc mesenteroides	3,56
	Lactiplantibacillus plantarum	3,35
	Latilactobacillus sakei	3,08
	Pediococcus pentosaceus	1,69
	Lactiplantibacillus pentosus	0,74
Cavolo cappuccio viola	*Lactiplantibacillus plantarum*	6,92
	Leuconostoc mesenteroides	4,64
	Latilactobacillus curvatus	1,33
	Pediococcus pentosaceus	1,28
	Levilactobacillus brevis	1,10

Discussione e Conclusioni

I risultati di questa indagine mostrano con chiarezza che la fermentazione spontanea di verdure rappresenta uno strumento straordinariamente efficace per ottenere postbiotici, ovvero metaboliti bioattivi prodotti da microrganismi che rimangono funzionali anche in assenza di cellule vive. Nei nostri tre campioni (cavolo cappuccio bianco, cavolo cappuccio viola e carota) la fermentazione ha innescato una profonda riconfigurazione del profilo chimico: l'accumulo di acido lattico, tracce di acido acetico e succinico, la comparsa di isotiocianati (allil-ITC, sulforafano), di ascorbigeno e l'incremento di GABA, folati totali e vitamina B12 sono esempi di molecole che, secondo la definizione ISAPP 2021 (**14**), rientrano a pieno titolo nella categoria dei postbiotici.

Il marcato accumulo di acido lattico è il principale vettore di acidificazione nelle fermentazioni vegetali. La concentrazione media rilevata, pari a 9-11g kg^{-1} (≈ 0,9-1,1%), rientra nel range riportato per crauti e kimchi tradizionali in bibliografia (**15,16**). Nel cavolo cappuccio bianco il lattato ha raggiunto 11g kg^{-1}, valore coerente con fermentazioni lattiche spontanee in cui *Leuconostoc mesenteroides* domina la fase iniziale liberando CO_2 e lattato prima di essere sostituito da *Lactiplantibacillus plantarum* (**15**). Il cavolo viola ha mostrato 10g kg^{-1}, dato leggermente

CEC Editore

inferiore ma comunque nella fascia tipica, probabilmente per la maggiore presenza di composti fenolici che possono modulare il metabolismo dei LAB.

Nella carota, il lattato è risultato 9 g kg^{-1}, in linea con le fermentazioni di radici ricche di zuccheri semplici. In sintesi, la produzione di acido lattico nei nostri campioni è pienamente in linea con la letteratura e conferma che la fermentazione spontanea, pur variando per substrato, converge verso un output acido-lattico simile, assicurando stabilità microbiologica e contribuendo al profilo organolettico e funzionale delle verdure fermentate.

L'analisi ha evidenziato un significativo accumulo di ascorbigeno, formatosi dalla condensazione tra l'indolo-3-carbinolo liberato dai glucosinolati e l'ascorbato durante la fermentazione (**17** e referenze all'interno). Questo metabolita, rilevato soprattutto nel cavolo cappuccio bianco, è più stabile di acido ascorbico e indolo-3-carbinolo e ne conserva o amplia l'attività bioattiva. Infatti, in alcuni studi, l'ascorbigeno ha dimostrato di attivare enzimi di fase II (GST, NQO-1) (**18**, **19**, **20**, **21**), di esercitare un'azione antiossidante prolungata e di sopprimere NF-κB (**22**), configurandosi come vero postbiotico "neo-formato" e come indicatore dell'efficacia biotrasformativa dei LAB.

Le concentrazioni misurate, superiori del 60 % al vegetale crudo e allineate a quelle riscontrate nei crauti artigianali (**22**), suggeriscono che la fermentazione spontanea moduli la capacità antiossidante totale compensando la perdita di vitamina C. Regolando temperatura, sale e ossigeno si può ulteriormente ottimizzarne la resa, aprendo a nuovi "*blend* postbiotici"

Fra i dati più interessanti, la quota di 5-metil-tetraidrofolato (5-MTHF) costituisce oltre il 70% dei folati totali in tutti i campioni analizzati.

Il 5-MTHF è la forma biologicamente attiva del folato, più efficace da assimilare perché prontamente utilizzabile dalle cellule dell'organismo.

Parallelamente, l'analisi metagenomica mostra come la biodiversità microbica resti elevata (indice di Shannon 2,6–2,7; Simpson ≥0,91 per cavolo cappuccio bianco e carota) nonostante la progressiva selezione di lattobacilli acido-tolleranti. Questo equilibrio fra ricchezza tassonomica e uniformità suggerisce che i consorzi spontanei, se opportunamente monitorati, possono esprimere un ventaglio ampio di vie metaboliche complementari: lattato-acetato, decarbossilazione del glutammato in GABA, riduzione del triptofano a indolo-3-lattato, trasformazione dei glucosinolati in ITC e formazione di composti di condensazione (ascorbigeno). Tali metaboliti rivestono un interesse crescente per la ricerca nutraceutica: l'ILA interagisce con il recettore AHR, modulando la risposta immunitaria a livello delle mucose, mentre gli ITC mostrano attività detossificante di fase II e azione antimicrobica selettiva.

Questi dati si inseriscono nel concetto di "*extended microbiome*" proposto da Caffrey et al. (**4**): i cibi fermentati funzionano come un'estensione ecologica del microbiota umano, rilasciando molecole segnale capaci di dialogare con l'ospite e con il microbiota intestinale. Nel nostro studio, infatti, l'arricchimento nutrizionale avviene senza la necessità di cellule vitali: al termine della fermentazione il pH <4 inibisce molti batteri, ma i metaboliti restano stabili e bioaccessibili.

Questo sposta il focus dall'idea tradizionale di "fermento vivo" alla progettazione di "matrici postbiotiche", alimenti in cui la sicurezza microbiologica è garantita, ma l'efficacia funzionale deriva da un corredo metabolico misurabile e replicabile.

Guardando al futuro, il paradigma della nutrizione funzionale dovrà quindi integrare tre elementi:

1. selezione razionale del substrato vegetale: ogni matrice (*Brassicaceae*, radici, bulbi) fornisce precursori specifici (glucosinolati, carotenoidi, antocianine) che possono essere "attivati" dal microbiota fermentativo;
2. fermentazione ecologica controllata, non più basata sul singolo ceppo probiotico ma sul consorzio spontaneo: mediante metagenomica ad alta risoluzione e modelli predittivi si possono prevedere i percorsi metabolici critici e guidare la fermentazione verso la massima diversità di postbiotici;
3. standardizzazione analitica dei metaboliti chiave (lattato, GABA, 5-MTHF, ITC, ILA, acidi grassi a corta catena) per fornire al consumatore un profilo funzionale replicabile e con variabilità accettabile in contesti alimentari, proprio come avviene oggi per alimenti fonti di vitamine e minerali.

CEC Editore

Questa visione permette di superare i limiti dei probiotici convenzionali, soggetti a variabilità di vitalità e colonizzazione, e di abbracciare un approccio sicuro, stabile e sostenibile. L'utilizzo di tecniche "ancestrali" come la fermentazione spontanea, coniugate con la strumentazione "-omics", consente di generare alimenti funzionali contenenti postbiotici di nuova generazione, prodotti con processi naturali ma replicabili, che espandono il repertorio nutrizionale della dieta moderna con molecole antiossidanti, neuromodulatorie, detossificanti e vitamine biodisponibili.

In conclusione, i nostri dati confermano che le verdure fermentate spontaneamente possono fungere da biofabbriche di postbiotici, ampliando in modo naturale ed ecologicamente sostenibile il panorama dei metaboliti funzionali disponibili per l'uomo. Questi alimenti, inoltre, godono di un'ottima palatabilità, che ne permette una diffusione facile nella società, inserendosi nella cultura quotidiana delle persone. Questo aspetto è spesso considerato critico per la diffusione di prodotti che devono integrare e concentrare sostanze nutritive.

Investire nella mappatura sistematica delle interazioni substrato-microbiota-metaboloma e nello sviluppo di modelli predittivi di fermentazione rappresenta la chiave per far evolvere una pratica tradizionale in una tecnologia alimentare di precisione, capace di rispondere alle sfide del benessere personalizzato e della prevenzione nutrizionale su larga scala.

Bibliografia

1. Marco ML, Sanders ME, Gänzle M et al. The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2021;18(3):196-208.
2. Wei L, Marco ML. The fermented cabbage metabolome and its protection against cytokine-induced intestinal barrier disruption of Caco-2 monolayers. Appl Environ Microbiol. 2025;88:e02234-24.
3. Wastyk HC, Fragiadakis GK, Perelman D et al. Gut-microbiota-targeted diets modulate human immune status. Cell. 2021;184(16):4137-4153.
4. Caffrey EB, Sonnenburg JL, Devkota S. Our extended microbiome: the human-relevant metabolites and biology of fermented foods. Cell Metab. 2024;36(4):684-701.
5. Zelante T, Iannitti RG, Cunha C et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. Immunity. 2013;39:372-385.
6. Barbosa MS, Todorov SD, Jurkiewicz CH, Franco BD. Bacteriocin production by Lactobacillus curvatus MBSa2 entrapped in calcium alginate during ripening of salami for control of Listeria monocytogenes. Food Control. 2015;47:147-153.
7. Cui Y, Miao K, Niyaphorn S, Qu X. Production of gamma-aminobutyric acid from lactic acid bacteria: a systematic review. Int J Mol Sci. 2020;21(3):995.
8. Zhang Z, Xiong J, Chen L et al. Potential probiotic characteristics and genomic analysis of a new folate-producing lactic acid bacterium Lactiplantibacillus plantarum ZFM55. J Sci Food Agric. 2024;104(12):7315-7325.
9. Tan SW, Zu Koh Y, Siva S et al. Optimization of fermentative parameters to improve gamma-aminobutyric acid (GABA) production by Lactiplantibacillus plantarum B13. J Biochem Microbiol Biotechnol. 2024;12(1):7-16.
10. Marco ML, Heeney D, Binda S et al. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. Curr Opin Biotechnol. 2017;44:94-102.
11. Lu ZM, Liu N, Wang LJ et al. Elucidating and regulating the acetoin production role of microbial functional groups in multispecies acetic acid fermentation. Appl Environ Microbiol. 2016;82(19):5860-5868.
12. Ma B, Zhao Y, Liu L et al. Evaluation of in vitro production capabilities of indole derivatives by lactic acid bacteria. Microorganisms. 2025;13(1):150.
13. Tlais AZA, Lemos WJF Jr, Filannino P et al. How microbiome composition correlates with biochemical changes during sauerkraut fermentation: a focus on neglected bacterial players and functionalities. Microbiol Spectr. 2022;10(4):e00168-22.
14. Salminen S, Collado MC, Endo A et al. The international scientific association of probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2021;18(9):649-667.
15. Hang YD. Sauerkraut. In: Rahman MS, ed. Handbook of vegetable preservation and processing. CRC Press; 2003:282-289.
16. National Research Council. Applications of biotechnology to fermented foods: report of an ad hoc panel of the board on science and technology for international development. National Academies Press; 1992.

CEC Editore

17. Verkerk R, Schreiner M, Krumbein A et al. Glucosinolates in Brassica vegetables: the influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. Mol Nutr Food Res. 2009;53(S2):S219-S219.
18. Kravchenko LV, Avren'eva LI, Guseva GV, Posdnyakov AL, Tutel'yan VA. Effect of nutritional indoles on activity of xenobiotic metabolism enzymes and T-2 toxicity in rats. Bull Exp Biol Med. 2001;131:544-547.
19. Stephensen PU, Bonnesen C, Bjeldanes LF et al. Modulation of cytochrome P4501A1 activity by ascorbigen in murine hepatoma cells. Biochem Pharmacol. 1999;58:1145-1153.
20. Wagner AE, Hug H, Gössl R et al. The natural compound ascorbigen modulates NADPH-quinone oxidoreductase (NQO1) mRNA and enzyme activity levels in cultured liver cells and in laboratory rats. Ann Nutr Metab. 2008;53(2):122-128.
21. Zhang Y, Talalay P. Mechanism of differential potencies of isothiocyanates as inducers of anticarcinogenic phase 2 enzymes. Cancer Res. 1998;58(20):4632-4639.
22. Martínez-Villaluenga C, Peñas E, Sidro B et al. White cabbage fermentation improves ascorbigen content, antioxidant and nitric oxide production inhibitory activity in LPS-induced macrophages. LWT Food Sci Technol. 2012;46(1):77-83.

CEC Editore