



FERMENTAZIONE DEL GRANO CON PASTA MADRE

Per ottenere lisato di grano con
importanti proprietà nutraceutiche

La fermentazione dei cereali è utile per il rilascio e la biotrasformazione di una quantità di molecole, come polifenoli e altri antiossidanti, rispetto al prodotto di partenza. Durante questo processo, la componente microbica ha un ruolo attivo perché se da una parte facilita il rilascio dei fenoli legati ad altri composti rendendoli maggiormente assorbibili, dall'altra sintetizza nuovi composti bioattivi come gli acidi organici, non presenti nella farina, responsabili di promuovere un effetto benefico sulla composizione batterica intestinale e sulla salute delle cellule del colon-retto.

* **Vincenzo Longo,**
** **Laura Quintieri,**
** **Leonardo Caputo,**
* **Luisa Pozzo**

L'Italia è un forte produttore di grano duro (*Triticum durum* Desf.) e tenero (*Triticum aestivum* L.), grazie a un'antica tradizione agraria e al clima favorevole la coltivazione del frumento comprende attualmente circa il 62% dei terreni seminativi con una produzione totale nel 2020 di quasi di 66 milioni di quintali di granella (Dati ISTAT, 2020).

La cariosside del grano è costituita principalmente da tre parti: il pericarpo, corrispondente agli strati più esterni e da cui, durante la molitura deriva la crusca, l'endosperma, ossia la parte amilacea, e il germe, costituito dall'embrione che darà luogo alla pianta. L'assunzione del germe di grano e della crusca favorisce la riduzione del livello di colesterolo cattivo nel sangue e dell'ipertensione e, inoltre, può contribuire alla prevenzione di artriti e patologie cutanee. I principi attivi del grano favoriscono l'attività cellulare e coadiuvano il fegato nell'eliminazione delle tossine. Le cariossidi contengono quindi composti di elevato valore nutrizionale come carboidrati, proteine e grassi, anche la preziosa vitamina E, coadiuvante nella disintossicazione dalle scorie, e il complesso vitaminico B, che favorisce il metabolismo e la crescita (1). Dal grano, attraverso processi di raffinazione, si arriva alle farine (2); ciò comporta la perdita degli strati più esterni del chicco di grano e di conseguenza



Foto di Forest and Kim Starr

Triticum aestivum degli elementi che forniscono sostanze preziosissime per il nostro organismo (3-4). L'eliminazione della crusca provoca, infatti, un impoverimento in cellulosa e sali minerali, mentre l'allontanamento dell'embrione riduce al minimo il contenuto in lipidi; si ha, inoltre, la perdita di fibre, vitamine (A, E, F), oligoelementi quali Mn, Co, Cu, Zn, Se, Cr. La farina risulta così impoverita specialmente in micronutrienti, ossia quegli elementi essenziali per il funzionamento del nostro organismo. Da qui l'importanza di consumare alimenti meno raffinati e se è possibile fermentati (5-6). La fermentazione dei cereali è infatti utile per il rilascio e la biotrasformazione di una maggiore quantità di molecole, come polifenoli e altri antiossidanti,

rispetto al prodotto di partenza (7-8). Durante il processo di fermentazione, la componente microbica ha un ruolo attivo perché se da una parte facilita il rilascio dei fenoli legati ad altri composti rendendoli così più accessibili all'assorbimento, dall'altra sintetizza nuovi composti bioattivi come acidi organici (non presenti nella farina) responsabili di promuovere un effetto benefico sulla composizione batterica intestinale e sulla salute delle cellule del colon-retto (9-11).

Da una particolare lavorazione dei chicchi di grano (*Triticum aestivum*) biologico nasce il Lisato di Grano, denominato Lisosan G, disponibile in polvere e in forma liquida. Lo sfarinato di grano viene fatto fermentare alla temperatura controllata di 35 °C per non far degradare gli enzimi e le altre molecole presenti, quindi essiccato, e durante questa fase si ottiene la parte acquosa chiamata Lisosan Acqua G. Il processo di asciugatura per mezzo di pompe a vuoto permette a molecole più piccole e volatili di passare nella parte acquosa. Il Lisosan G polvere ha mostrato un alto potere antiossidante; infatti 100 grammi di questo prodotto presentano un valore ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) di 5500 unità (12). L'alto valore di ORAC è dovuto alla presenza nel Lisosan G di vitamine, polifenoli, flavonoidi e altre componenti antiossidanti. Uno studio pubblicato qualche anno fa ha evidenziato un suo efficace ruolo nel difendere il fegato dalle sostanze inquinanti e nella sua incapacità di interferire con gli enzimi del metabolismo dei farmaci come i citocromi P450 e pertanto si possono escludere interazioni con eventuali farmaci assunti in contemporanea (13). La letteratura internazionale sostiene che i radicali liberi sono la causa di diverse malattie poiché svolgono una potente e progressiva azione dannosa per l'organismo. Diversi studi hanno

dimostrato che le lipoproteine a bassa densità native (LDL), a contatto con i radicali subiscono ossidazione diventando uno dei principali fattori di rischio per l'aterosclerosi e il danno vascolare. Una dieta con alimenti salubri e di qualità può contribuire a migliorare le difese del nostro organismo apportando sostanze antiossidanti capaci di neutralizzare i radicali liberi. Uno studio da noi pubblicato qualche anno fa ha dimostrato la capacità del Lisosan G di proteggere le cellule endoteliali umane del microcircolo dal danno indotto dalle LDL ossidate (14). Un altro studio ne ha evidenziato la capacità di proteggere dall'effetto tossico di farmaci. In particolare, l'inserimento del Lisosan G nella dieta ha ridotto in maniera significativa il danno provocato dal Cis-platino, un agente chemioterapico largamente utilizzato nella cura dei tumori, ma con una tossicità ben documentata (15). È stato inoltre visto che l'alimentazione con il Lisosan G migliora l'eliminazione dei grassi accumulati nel fegato in seguito a dieta iperlipidica (16). Altri studi effettuati evidenziano i meccanismi molecolari attraverso cui il prodotto agisce sul sistema di difesa antiossidante del nostro organismo, costituito da enzimi e molecole in grado di mantenere a livelli fisiologici sostanze tossiche come i radicali liberi, che si formano all'interno dell'organismo. Il sistema antiossidante è controllato da un fattore di trascrizione nucleare, chiamato Nrf2, che in seguito ad attivazione trasloca dal citoplasma al nucleo attivando l'espressione di enzimi target. I risultati sperimentali dimostrano la capacità del Lisosan G di attivare Nrf2 e, di conseguenza, indurre il sistema antiossidante presente nell'organismo. In aggiunta a questo meccanismo, Lisosan G è in grado di inibire NFκB, un fattore di trascrizione coinvolto nell'attivazione della risposta infiammatoria (17).

La caratterizzazione microbica recentemente eseguita su Lisosan G ha evidenziato tre principali generi di batteri presenti: *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Pediococcus* che sono riconosciuti sicuri e con alta capacità fermentativa. Questi batteri possono contribuire al rilascio di composti bioattivi capaci di modulare positivamente il microbiota intestinale (18). Inoltre, Lisosan G contribuisce fino a 6 volte all'aumento di crescita del *Lactobacillus reuteri*, importante componente del microbiota intestinale sia dell'uomo che degli animali e largamente utilizzato come probiotico per le sue proprietà salutistiche (18). L'azione positiva sulla crescita del *Lactobacillus reuteri* lascia ipotizzare che il Lisosan G abbia anche importanti proprietà prebiotiche. Meno studi sono riportati invece sull'altra componente della fermentazione denominata Lisosan Acqua G; quest'ultima ha mostrato un potere antiossidante totale con un valore di unità ORAC, espresso come $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$ di Lisosan Acqua G, di 160. Lisosan Acqua G inoltre contiene alcuni polifenoli come l'acido gallico presente alla concentrazione di 1 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ di peso secco) e la genisteina alla concentrazione di 0,011 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ di peso secco). Pertanto, alla luce di tali considerazioni l'obiettivo del seguente studio è stata la caratterizzazione della componente degli acidi organici rilasciati in Lisosan Acqua G e la valutazione dell'attività antibatterica e antibiofilm di tale prodotto contro patogeni alimentari; inoltre è stato determinato il contenuto totale di aminoacidi e piccoli peptidi che potrebbero contribuire al suo valore nutrizionale. I risultati ottenuti, comparati con quelli del Lisosan G polvere e con lo sfarinato non fermentato di frumento tenero (*FnF*), permetteranno di valorizzare ulteriormente le componenti nutrizionali e nutraceutiche di Lisosan Acqua G e Lisosan G.

MATERIALI E METODI

Determinazione degli acidi organici

FnF, Lisosan G polvere e Lisosan Acqua G sono stati gentilmente forniti da Agrisan SRL, Larciano, Pistoia. 4 g di ciascun campione (Lisosan G e *Triticum aestivum*) sono stati omogeneizzati per 90 s con 20 mL di acido solforico 0,013 N a 65 °C e centrifugati a $7.000 \times g$ per 10 min; i surnatanti sono stati filtrati su filtri centrifughi Amicon Ultra-4 con membrana di taglio di peso molecolare da 3 kDa (Sartorius AG, Göttingen, Germania) e centrifugati a $14.000 \times g$ per 20 min a 4 °C. Al contrario, Lisosan Acqua G liofilizzato (2,5 mg) è stato risospeso in 300 μL di acido solforico 0,013 N e filtrato come descritto sopra. I campioni (25 μL) sono stati iniettati in HPLC con una colonna Rezex ROA secondo il metodo riportato in Pinto *et al.* (19). Il software JASCO Chrome NAV (versione 1.19.03 Build 6) è stato utilizzato per l'acquisizione dei dati, l'integrazione dei picchi e la calibrazione degli standard. Ciascun campione, analizzato, in triplicato è stato quantificato, rispetto a una curva di calibrazione di una miscela di acidi organici.

Quantificazione di aminoacidi liberi (FAA) e piccoli peptidi

Ciascun campione filtrato (cut-off <3kDa) di Lisosan G, *Triticum aestivum* e Lisosan Acqua G è stato analizzato per la determinazione della concentrazione totale di aminoacidi liberi (FAA) e piccoli peptidi seguendo il metodo descritto da Church *et al.* (20). Questi valori sono stati calibrati rispetto a soluzioni di glicina a diverse concentrazioni (da 0,001 mg/mL a 1,5 mg/mL) ed espressi come concentrazione equivalente di glicina (Gly). Ogni analisi è stata eseguita in triplicato.

Attività antimicrobica e antibiofilm di Lisosan Acqua G

L'estratto di Lisosan Acqua G è

stato testato su tre ceppi batterici gram negativi: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* ser. *typhimurium* (ATCC 14028), e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) e due ceppi batterici Gram positivi: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Le colture sono state fatte crescere in terreno liquido in presenza di concentrazioni crescenti di Lisosan Acqua G (0,25mg-1/mL) per 16 h a 37 °C in condizioni aerobi. La densità ottica (OD) delle colture è stata determinata alla fine dell'incubazione. Colture di ciascun ceppo in terreno di crescita senza Lisosan Acqua G sono stati inclusi come controlli positivi della crescita. L'attività antibiofilm è stata determinata su *S. aureus* (ATCC 35556) come riportato in Frassinetti *et al.* (21).

Risultati

Nella tabella 1 sono stati messi a confronto il Lisosan G polvere con il Lisosan Acqua G e comparati con quelli dello sfarinato non fermentato di frumento tenero (*FnF*).

Il processo di fermentazione porta a una comparsa di molte molecole non presenti nel *Triticum aestivum* prima della fermenta-

Acidi organici	Lisosan Acqua G	Lisosan G $\mu\text{g}/\text{mg dm}$	<i>FnF</i>
Acido ossalico	n.d.	n.d.	0.129 ± 0.005
Acido fumarico	n.d.	n.d.	0.642 ± 0.015
Acido succinico	n.d.	n.d.	0.003 ± 0.001
Acido lattico	0.354 ± 0.034	0.399 ± 0.029	n.d.
Acido acetico	0.010 ± 0.004	0.001 ± 0.00	n.d.
Acido propionico	0.109 ± 0.027	0.023 ± 0.012	n.d.
Acido butirrico	0.226 ± 0.042	n.d.	n.d.
Acido isobutirrico	n.d.	0.083 ± 0.016	n.d.
Acido isovalerico	0.178 ± 0.057	0.202 ± 0.043	n.d.
Acido fenillattico	0.764 ± 0.102	0.388 ± 0.089	n.d.
Acido valerico	0.023 ± 0.011	0.001 ± 0.00	n.d.

Tabella 1. Concentrazione degli acidi organici ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso secco) di Lisosan Acqua G, Lisosan G polvere e farina non fermentata di frumento tenero (*FnF*). I valori sono la media di tre ripetizioni \pm SD.



Triticum aestivum

Campioni	Peptidi e FAA ($\mu\text{g Gly equiv/mg, ss}$)
Lisosan Acqua G	99,05 \pm 10,81
Lisosan G	328,31 \pm 25,27
FnF	16,77 \pm 1,09

Tabella 2. Peptidi e aminoacidi liberi (AA)

zione. Inoltre, è molto interessante la presenza dell'acido butirrico nell'acqua e non nella polvere. Esso è conosciuto per avere un'azione prebiotica molto importante per l'intestino. In tabella 1 sono riportate le concentrazioni (espresse come μg glicina (Gly) equivalente/mg di peso secco) di peptidi e aminoacidi liberi (FAA). I valori sono la media di tre ripetizioni \pm SD (N = 3).

Rispetto al prodotto non fermentato nei prodotti dopo fermentazione è stata registrata un'elevata quantità di peptidi e aminoacidi liberi, dovuta presumibilmente all'effetto della fermentazione. Inoltre è interessante notare come il Lisosan Acqua G sia ricco in molecole funzionali-nutraceutiche.

In figura 1 è riportata l'attività antibatterica del Lisosan Acqua G su tre ceppi batterici Gram-negativi: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium*

(ATCC 14028), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) e due ceppi batterici Gram positivi: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Si può notare una significativa inibizione su tutti i ceppi batterici studiati alle concentrazioni tra 0,25 e 1 mg/mL di prodotto.

La Figura 2 riporta l'attività antibiofilm contro *S. aureus* ATCC 35556 da parte di Lisosan Acqua G che alla concentrazione di 0,5

mg/mL causa un'inibizione del biofilm batterico di oltre l'80%. La vancomicina è stata utilizzata come controllo positivo dato che la sua attività antibiofilm è ampiamente nota. Il biofilm rappresenta una comunità batterica circondata da una matrice di esopolisaccaridi che favorisce la diffusione dei nutrienti, lo protegge dall'ambiente circostante e ne favorisce la resistenza ad antibiotici (22); sostanze naturali possono impedire la formazione o favorire

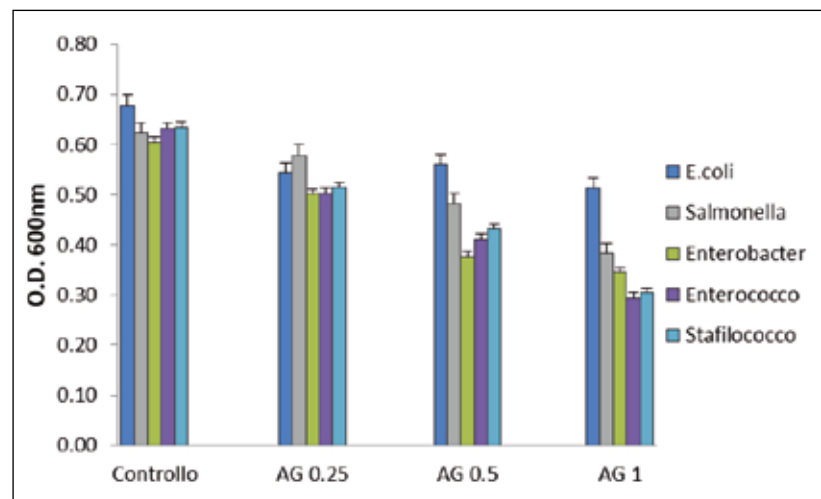


Figura 1. Attività antibatterica da parte di Lisosan Acqua G su *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*

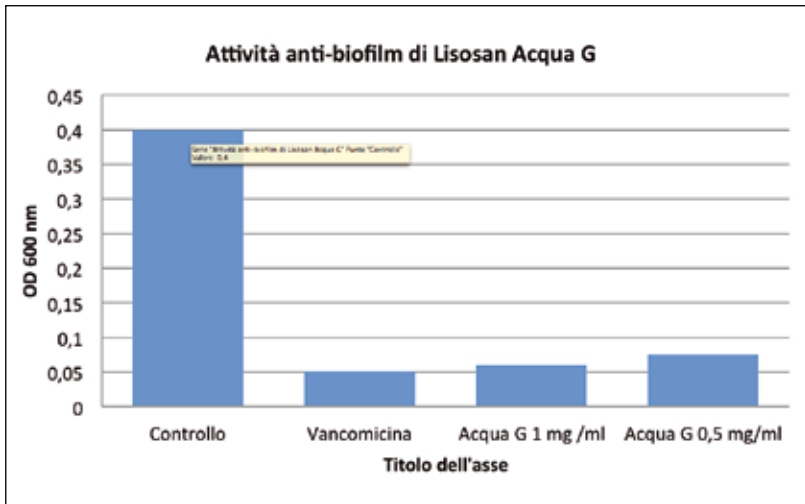


Figura 2. Attività anti-biofilm contro *S. aureus* ATCC 35556 da parte del Lisosan Acqua G ad differenti concentrazioni. Controllo: sfarinato di frumento non fermentato (FnF); Vancomicina 2 mM

la disgregazione del biofilm, perché sono in grado di interrompere i segnali inviati fra i batteri, evitando quindi la formazione della famigerata pellicola.

CONCLUSIONI

Durante la fermentazione controllata gli alimenti subiscono profonde trasformazioni che hanno effetto sulle loro caratte-

ristiche fisico-chimiche, meccaniche e qualitative-organolettiche. Grazie all'attività metabolica dei microrganismi coinvolti, molti costituenti degli alimenti sono sottoposti a processi di idrolisi o bioconversione determinando un sensibile arricchimento in composti a elevato valore nutrizionale come vitamine del gruppo B, E, acido lipoico, polifenoli, acidi grassi polinsaturi e microelementi come il calcio, selenio e ferro. Il Lisosan Acqua G si contraddistingue per un elevato quantitativo di acido lattico la cui assunzione migliora l'assorbimento e la biodisponibilità del ferro. A differenza del grano di partenza (*Triticum aestivum*) e del Lisosan G polvere l'acqua G contiene acido butirrico, che si forma durante il processo fermentativo e in virtù del suo

PURA
BONTÀ
A ZERO
COMPROMESSI!

Dal 1978, Probios il biologico italiano
tra etica, storia, passione e cura della terra





Scegli il dolce di Natale che rende tutti felici: i panettoni **Probios 100% biologici** sono disponibili in versione tradizionale, senza glutine, vegan e salata con il nuovo panettone gastronomico 2020!

Per augurare Buon Natale.
A tutti.

WWW.PROBIOS.IT
SEGUICI SU 



Foto di Matt Lavin

Un campo di grano nello Stato del Montana (USA)

basso peso molecolare, durante il processo di asciugatura, passa nell'acqua di fermentazione. Esso sotto forma di butirrato rappresenta una fonte energetica molto importante per le cellule della mucosa intestinale (23-24). L'acido butirrico sembra avere ottime proprietà antinfiammatorie grazie alla capacità di inibire l'attività di alcune proteine che scatenano l'infiammazione in quanto contribuisce al controllo della risposta immunitaria regolando l'attività dei linfociti T; si ipotizza, pertanto, un suo ruolo per eventuali applicazioni nel trattare patologie infiammatorie e autoimmuni. La fermentazione come si può notare nei risultati sopra descritti porta alla formazione di acidi organici come lattico, acetico, propionico, butirrico, isobutirrico isovalerico, fenilattico e valerico che si concentrano nel Lisosan G polvere. Il Lisosan acqua G contiene circa il doppio di acido fenilattico rispetto al Lisosan G polvere. L'acido fenilattico vanta proprietà antimicrobiche ad ampio spettro ed è in grado di inibire microrganismi patogeni causa di malattie di origine alimentare ed è in grado di bloccare le contaminazioni fungine (25). Esso si forma durante i processi di fermentazione spontanea condotta da microrganismi non selezionati e naturalmente presenti nella pasta madre. Nel Lisosan Acqua G troviamo anche peptidi e aminoacidi liberi; i

peptidi sono piccole sequenze di aminoacidi, che derivano dall'idrolisi delle proteine in seguito al processo fermentativo ed essi potrebbero giocare un ruolo benefico sulla salute che va oltre il loro valore nutrizionale (26). Il Lisosan Acqua G ha dimostrato una buona attività antibatterica contro i ceppi saggiati e antibiofilm contro *S. aureus*; esiste una stretta relazione tra la capacità di formare biofilm di molti batteri patogeni e la relativa antibiotico-resistenza e per questo si può ipotizzare che l'assunzione di Lisosan Acqua G possa avere un ruolo importante nell'impedire la formazione di biofilm.

Pertanto alla luce dei risultati ottenuti in questo lavoro si può concludere che Lisosan Acqua G, ottenuto durante il processo di essiccazione di Lisosan G, conserva alcune componenti con potenzialità nutraceutiche, quali l'acido butirrico, nonché una spiccata attività antimicrobica e antibiofilm contro patogeni. Sebbene ulteriori studi sono necessari, tali risultati potrebbero, tuttavia, contribuire alla valorizzazione di Lisosan Acqua G nell'ambito della produzione di formulati a elevato valore nutrizionale e proprietà nutraceutiche.

* **Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, Pisa**

** **Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, CNR, Bari**

BIBLIOGRAFIA

- 1 Flagella, Z. (2006). Qualità nutrizionale e tecnologica del frumento duro. *Ital. J. Agron*, 1, 203-239.
- 2 Serna-Saldivar, S. O. (2016). *Cereal grains: properties, processing, and nutritional attributes*. CRC press.
- 3 Saini, P., Kumar, N., Kumar, S., Mvaurah, P. W., Panghal, A., Attkan, A. K., & Singh, V. (2020). Bioactive compounds, nutritional benefits and food applications of colored wheat: a comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-14
- 4 Tan, B., Wu, N. N., & Zhai, X. T. (2020). Solutions for whole grain food development. *Nutrition Reviews*, 78(Supplement_1), 61-68.
- 5 Liu, S., Zhao, L., Wang, L., & Liu, H. (2020). Microstructure-modified products from stone-milled wheat bran powder improve glycemic response and sustain colonic fermentation. *International journal of biological macromolecules*, 153, 1193-1201.
- 6 Carcea, M., Turfani, V., Narducci, V., Melloni, S., Galli, V., & Tullio, V. (2020). Stone Milling versus Roller Milling in Soft Wheat: Influence on Products Composition. *Foods*, 9(1), 3.
- 7 Mao, M., Wang, P., Shi, K., Lu, Z., Bie, X., Zhao, H., & Lv, F. (2020). Effect of solid state fermentation by *Enterococcus faecalis* M2 on antioxidant and nutritional properties of wheat bran. *Journal of Cereal Science*, 102997.
- 8 Zhao, Y., Zhang, J., Wei, Y., Ai, L., Ying, D., & Xiao, X. (2020). Improvement of Bread Quality by Adding Wheat Germ Fermented with *Lactobacillus plantarum* dy-1. *Journal of Food Quality*, 2020.
- 9 Adebo, O. A., & Gabriela Medina-Meza, I. (2020). Impact of fermentation on the phenolic compounds and antioxi-

- dant activity of whole cereal grains: A mini review. *Molecules*, 25(4), 927.
- 10 Paesani, C., Sciarini, L. S., Moiraghi, M., Salvucci, E., Prado, S., Pérez, G. T., & Fabi, J. P. (2020) Human colonic *in vitro* fermentation of water-soluble arabinoxylans from hard and soft wheat alters *Bifidobacterium* abundance and short-chain fatty acids concentration. *LWT*, 134, 110253. –
 - 11 Caputo, L., Visconti, A., & De Angelis, M. (2015). Selection and use of a *Saccharomyces cerevisiae* strain to reduce phytate content of wholemeal flour during bread-making or under simulated gastrointestinal conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 400-407
 - 12 Frassinetti S, Della Croce CM, Caltavuturo L, Longo V (2012) Antimutagenic and antioxidant activity of Lisosan G in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem* 135: 2029-2034
 - 13 Longo V, Chirulli V, Gervasi PG, Nencioni S, Pellegrini M (2007) Lisosan G, a powder of grain, does not interfere with the drug metabolizing enzymes and has a protective role on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Biotechnol Lett* 29: 1155-1159
 - 14 Lubrano V., Baldi S, Napoli D, Longo V (2012) Beneficial effect of lisosan G on cultured human microvascular endothelial cells exposed to oxidised low density lipoprotein. *Indian J Med Res*, 136, 82-88
 - 15 Longo V, Gervasi PG, Lubrano V (2011) Cisplatin induced toxicity in rat tissues: the protective effect of Lisosan G. *Food Chem Toxicol* 49: 233-237
 - 16 Laus MN, Denoth F, Ciardi M, Giorgetti L, Pucci L, Sacco R, Pastore D, Longo V (2013) The antioxidant-rich food supplement Lisosan G induces reversion of hepatic steatosis. *Med. Weter.* 69, (4): 235-240
 - 17 La Marca M, Befy P, Pugliese A, Longo V. A fermented powder of wheat, is an inducer of the antioxidant/detoxifying system in primary rat hepatocytes (2013) *PLOSone* 8, n. 12: 1-9
 - 18 Balli D, Bellumori M, Paoli P, Pieraccini G, Di Paola M, De Filippo C, Di Gioia D, Mulinacci N, Innocenti M (2019) Study on a Fermented Whole Wheat: Phenolic Content, Activity on PTP1B Enzyme and In Vitro Prebiotic Properties. *Molecules* 24, 1120; doi:10.3390/molecules24061120
 - 19 Pinto, L., Caputo, L., Quintieri, L., de Candia, S., & Baruzzi, F. (2017). Efficacy of gaseous ozone to counteract postharvest table grape sour rot. *Food microbiology*, 66, 190-198.
 - 20 Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H., Catignani, G.L., 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66, 1219e1227.
 - 21 Frassinetti, S., Gabriele, M., Moccea, E., Longo, V., & Di Gioia, D. (2020). Antimicrobial and antibiofilm activity of *Cannabis sativa* L. seeds extract against *Staphylococcus aureus* and growth effects on probiotic *Lactobacillus* spp. *LWT*, 124, 109149.
 - 22 Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358(9276), 135-138.
 - 23 Ashaolu, T. J., Ashaolu, J. O., & Adeyeye, S. A. (2020). Fermentation of prebiotics by human colonic microbiota *in vitro* and short chain fatty acids production: a critical review. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/jam.14843>
 - 24 Bridgeman, S. C., Northrop, W., Melton, P. E., Ellison, G. C., News-holme, P., & Mamotte, C. D. (2020). Butyrate, generated by gut microbiota, and its therapeutic role in metabolic syndrome. *Pharmacological Research*, 105174
 - 25 Mu, W., Yu, S., Zhu, L., Zhang, T., & Jiang, B. (2012). Recent research on 3-phenyllactic acid, a broad-spectrum antimicrobial compound. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(5), 1155-1163.
 - 26 Tondo, A. R., Caputo, L., Mangiatordi, G. F., Monaci, L., Lentini, G., Logrieco, A. F., & Quintieri, L. (2019). Structure-Based Identification and Design of Angiotensin Converting Enzyme-Inhibitory Peptides from Whey Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(2), 541-548

Kimmuno Kyma

IL CUSTODE DELLE TUE DIFESE

con
*Sambuco, Astragalo, Saposchnikovia,
Atractylodes e Acerola*

laboratori
biokyma

Anghiari - Toscana +39 0575 749989 - www.biokyma.com