

## TIPO DI OPERAZIONE

### 16.1.01 - Gruppi operativi del partenariato europeo per la produttività e la sostenibilità dell'agricoltura

**DELIBERAZIONE DELLA GIUNTA REGIONALE N. 1098 DEL 01/07/2019**

**FOCUS AREA ■ 2A  4B**

**RELAZIONE TECNICA  INTERMEDIA ■ FINALE**

**DOMANDA DI SOSTEGNO 5149540**

**DOMANDA DI PAGAMENTO 5698485; 5700575; 5699307; 5699165; 5699147; 5699111; 5700732.**

Titolo Piano		<b>Sviluppo di nuovi prodotti latte-fermentati a base di frutta e verdura</b>	
Ragione sociale del proponente (soggetto mandatario)		Open Fields Srl.	
Partner del GO		Open Fields srl; Azienda Agricola Sara Vespignani – Corte San Ruffillo; Azienda agricola Punto Verde di Castiglioni Emanuele; Azienda agricola Cà de Frà di Milani Maria; Università degli Studi di Parma - Centro Interdipartimentale sulla Sicurezza, Tecnologie e Innovazione Agroalimentare (SITEIA-UNIPR); EcorNaturaSi; Centoform.	
Durata originariamente prevista del progetto (in mesi)		30	
Data inizio attività'		27/04/2020	
Data termine attività' (incluse eventuali proroghe già concesse)		23/09/2023	
Relazione relativa al periodo di attività' dal		1/11/2021	Al 23/09/2023
Data rilascio relazione		13/11/2023	
Autore della relazione		Silvia Folloni	
telefono		email	<a href="mailto:s.folloni@openfields.it">s.folloni@openfields.it</a>
pec	<a href="mailto:postmaster@pec.openfields.it">postmaster@pec.openfields.it</a>		

# 1 - DESCRIZIONE DELLO STATO DI AVANZAMENTO DEL PIANO

Descrivere brevemente il quadro di insieme relativo alla realizzazione del piano.

Durante tutto il progetto l'attività di "Esercizio della cooperazione" ha assicurato il coordinamento, la corretta collaborazione tra i membri del Gruppo Operativo (GO), il controllo delle operazioni, il mantenimento delle relazioni con l'area Innovazione, formazione e consulenza del Settore Competitività delle imprese e sviluppo dell'innovazione della Regione Emilia-Romagna - Direzione generale agricoltura, caccia e pesca.

Gli "Studi necessari alla realizzazione del Piano" hanno permesso di selezionare le materie prime: succhi (di mela, pera, albicocca) e composte (nettarina e lamponi) per le fermentazioni, di individuare i siti per le prove in campo presso le aziende agricole, nonché raccogliere informazioni preliminari per la scelta dei ceppi di batteri lattici da impiegare.

Nell'Azione 1 sono state realizzate prove in campo per due annualità (2021 e 2022) presso due aziende partner in cui sono stati messi a confronto diversi trattamenti biostimolanti e ne è stato valutato l'effetto sulle rese e sulla qualità dei prodotti agricoli. Parallelamente, sempre nell'Azione 1, sono state effettuate le analisi dei suoli a diversi tempi.

Nell'Azione 2 sono stati selezionati i microrganismi al fine di produrre succhi e composte fermentati con sapore e aroma apprezzabili e sono state condotte prove aggiungendo zucchero di canna biologico, con lo scopo di rendere più appetibili i diversi prototipi fermentati. Puree di albicocca, lampone, mela e pesca nettarina sono state fermentate utilizzando diversi ceppi selezionati tramite numerose prove ed i prodotti ottenuti sono stati caratterizzati in termini di zuccheri riducenti (liberi e totali) e grado Brix.

Nell'Azione 3 sono state ottimizzate le condizioni di fermentazione valutando, nelle diverse fasi di sviluppo, oltre alla crescita microbica, la concentrazione di zuccheri riducenti, polifenoli e antiossidanti dei prodotti fermentati. Per il prodotto fermentato target, rappresentato da succo di albicocca fermentato con lo specifico ceppo *L. plantarum* 4193, oltre alla crescita microbica, la concentrazione di zuccheri riducenti, polifenoli e antiossidanti, sono stati analizzati gli acidi organici, i composti aromatici ed è stato condotto uno studio di shelf-life. Le stesse analisi sono state effettuate anche per il prodotto target realizzato presso una azienda partner nell'azione 4.

Nell'Azione 4, dedicata alle attività di trasferimento tecnologico, le aziende agricole hanno prodotto campioni di succo e composte per le prove di fermentazione in laboratorio ed hanno effettuato prove presso i laboratori aziendali applicando il protocollo definito da Siteia-UNIPR, che descrive le fasi di fermentazione e stabilizzazione termica. In particolare, presso il laboratorio di una azienda partner, è stato prodotto un succo di albicocca latte-fermentato stabilizzato mediante pastorizzazione (con postbiotici).

Nell'azione 5 è stato strutturato e somministrato un questionario volto a rilevare il vissuto del consumatore nei confronti dei potenziali nuovi prodotti, a confronto con i prodotti sostitutivi di acquisto abituale. Sono stati inoltre valutati i trend attuali e potenziali, sono stati analizzati i canali di commercializzazione preferibili e sono state individuate le caratteristiche di un possibile conto economico di progetto.

Nell'ambito dell'Azione divulgazione sono stati realizzati:

- logo di progetto;
- pagine web sui siti internet dei partner del GO;
- il sito web [www.gocefermento.it](http://www.gocefermento.it) in lingua italiana ed inglese;
- cartelli e roll-up di progetto;
- due articoli divulgativi, pubblicati sulla rivista Assaggiarmi e sul sito della Rete Alta Tecnologia nella sezione dedicata alla descrizione di Siteia-Unipr (*technology report 2022*);
- diverse presentazioni ad eventi pubblici e fieristici come SANATECH (Bologna fiere), corso "Le fermentazioni in cucina" presso Azienda Stuard (Parma), Festival "Semi Piaci" (Dovadola, FC), MACFRUT (Rimini fiere), R2B – research to business", salone internazionale della ricerca e delle competenze per l'innovazione (Bologna fiere);
- il Festival "Biodiversità in Fermento" (<https://biodiversitainfermento.it/>) a Parma;
- il convegno finale presso il Campus dell'Università di Parma.

Sono stati inoltre presi contatti con il progetto internazionale PimenTo "Promoting Innovation of ferMENTed fOods" (European Cooperation in Science and Technology - COST action).

L'Attività di formazione ha permesso di realizzare due corsi di formazione a cui hanno partecipato in totale 27 persone.

## 1.1 STATO DI AVANZAMENTO DELLE AZIONI PREVISTE NEL PIANO

Azione	Unità aziendale responsabile	Tipologia attività	Mese inizio attività previsto	Mese inizio attività effettivo	Mese termine attività previsto	Mese termine attività effettivo
--------	------------------------------	--------------------	-------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	---------------------------------

Esercizio della Cooperazione	Open Fields	Coordinamento	1	1	30	41
Studi necessari	Open Fields	Studi preparativi	1	1	12	12
Azione 1	Open Fields	Prove in campo	1	5	11	35
Azione 2	Siteia-Unipr	Prove in laboratorio	2	2	8	22
Azione 3	Siteia-Unipr	Prove in laboratorio	9	17	20	36
Azione 4	Siteia-Unipr	Prove di trasformazione in azienda	19	7	30	36
Azione 5	EcorNaturaSi	Studi di mercato	1	5	30	37
Divulgazione	Open Fields	Divulgazione	1	1	30	37
Formazione	Centofarm	Formazione alle aziende agricole	6	20	30	36

## 2 - DESCRIZIONE PER SINGOLA AZIONE

Di seguito sono descritte le attività e i risultati di tutte le azioni eccetto “Studi necessari alla realizzazione del Piano”, conclusa nel mese di maggio 2021 e pertanto descritta nella relazione intermedia.

### 2.1 ATTIVITÀ E RISULTATI

Azione	<b>ESERCIZIO DELLA COOPERAZIONE</b>
Unità aziendale responsabile	Open Fields Srl.
Descrizione delle attività	<p>L'azione ha previsto lo svolgimento delle attività necessarie all'attivazione (inclusa la preparazione e registrazione dell'ATS), gestione e funzionamento del gruppo operativo (GO). Il monitoraggio delle attività, delle tempistiche e la comunicazione interna sono stati assicurati attraverso l'organizzazione ed esecuzione di riunioni generali e tra il capofila ed i singoli partner, visite ai partner, raccolta dati e documentazione tecnica.</p> <p>L'azione è stata condotta da Open Fields con la collaborazione di tutti i partner in funzione del proprio ruolo nel piano.</p> <p>Open Fields (Open Fields) e Siteia-Unipr (SITEIA-UNIPR), responsabile scientifico, si sono relazionate durante tutto il progetto per garantire il raggiungimento degli obiettivi ed una efficace cooperazione tra i partner. I partner sono stati supportati nella pianificazione delle attività e nell'analisi dei risultati.</p> <p>I partner si sono riuniti in meeting generali, nella maggior parte dei casi svoltisi in videoconferenza.</p> <p>Dopo ogni riunione è stato condiviso con i partner del GO un report delle principali tematiche discusse e delle azioni da intraprendere.</p> <p>Open Fields ha condotto, come previsto, un monitoraggio delle registrazioni dei contratti e delle fatture relative alle attività di progetto in relazione alla conformità con le diverse voci di spesa.</p> <p>Open Fields ha supportato i partner nella preparazione dei documenti necessari alla rendicontazione intermedia e a saldo e nell'utilizzo del SIAG.</p>

	<p>Open Fields ha predisposto ed inviato le richieste di proroga necessarie a completare le attività previste.</p> <p>Durante tutto il progetto, Open Fields ha garantito la comunicazione con l'area Innovazione, formazione e consulenza del Settore Competitività delle imprese e sviluppo dell'innovazione della Regione Emilia-Romagna - Direzione generale agricoltura, caccia e pesca.</p>
Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate	<p>Gli obiettivi sono stati pienamente raggiunti. Vi è stato uno scostamento tra la durata del progetto indicata sul Piano e quella effettiva.</p> <p>La durata del progetto era stata indicata sul Piano del GO in 30 mesi. Tuttavia, a causa del contesto globale (COVID-19) in cui il piano si è trovato ad operare nelle annualità 2020 e 2021, alcune attività, tra cui la formazione, hanno avuto un rallentamento. Per completare le attività progettuali dunque, oltre ai 30 mesi previsti sono state richieste una proroga di 90 giorni che ha prorogato il termine del progetto al 23/12/2022 (DETERMINAZIONE Num. 12751 del 01/07/2022) ed una ulteriore proroga di 9 mesi, con termine al 23/09/2023, come previsto dalla Delibera Num. 833 del 23/05/2022 (approvata con DETERMINAZIONE Num. 16838 del 07/09/2022).</p>

## Costi personale: esercizio della cooperazione

Cognome e nome	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Costo orario	Ore	Costo totale
	impiegato TI	gestione progetto	€ 27,00	37,00	€ 999,00
	impiegato TI part time 80%	gestione progetto	€ 27,00	16,00	€ 432,00
	impiegato TI part time 50%	gestione progetto	€ 27,00	6,00	€ 162,00
	impiegato TI / quadro	responsabile organizzativo	€ 27 / € 43	75,50	€ 2.694,50
	impiegato TI part time 80%	attività amministrative inerenti al progetto	€ 27,00	86,50	€ 2.335,50
Totale:					€ 6.623,00

Azione	<b>STUDI NECESSARI ALLA REALIZZAZIONE DEL PIANO (DI MERCATO, DI FATTIBILITÀ, PIANI AZIENDALI, ECC.):</b>
Unità aziendale responsabile	Open Fields Srl
Descrizione delle attività	<p>L'azione si era conclusa entro i tempi della rendicontazione intermedia.</p> <p>Gli Studi necessari alla realizzazione del piano hanno permesso di definire le particelle per le prove di campo e le specie da impiegare (pera Williams per l'Azienda Punto Verde e nettarine per l'Azienda Sara Vespignani). In questa Azione sono stati anche definiti, per ogni azienda partner coinvolta nell'azione 4, i succhi di frutta e le composte di partenza fermentati nelle azioni successive:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Pura di Pesca (Azienda agricola Punto Verde BIO)</li> <li>✓ Pura di Mela (Azienda agricola Punto Verde BIO)</li> <li>✓ Pura di Albicocca (Azienda agricola Punto Verde BIO)</li> <li>✓ Pura di Pesca varietà nettarina (Azienda agricola Sara Vespignani)</li> <li>✓ Pura di Lampone (Azienda agricola Sara Vespignani)</li> </ul>

	L'Università di Parma ha selezionato, per le fasi successive di fermentazione, 51 ceppi appartenenti a 9 specie diverse.
Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate	Gli obiettivi sono stati pienamente raggiunti.

### Costi personale: Studi necessari alla realizzazione del piano

Cognome e nome	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Costo orario	Ore	Costo totale
	Agronomo	studi preliminari prove agronomiche	€ 27,00	32,00	€ 864,00
	Responsabile area R&D	studi preliminari prove fermentazione	€ 27,00	28,00	€ 756,00
Totale:					€ 1.620,00

### Costi trasferta: Studi necessari alla realizzazione del piano

nome e cognome	descrizione	Costo
	Trasferta Parma UNIPR / presso Trasferta Parma UNIPR	€ 80,54
	Pianificazioni rilievi e prodotti / presso Corte San Ruffillo	€ 134,75
	Valutazione con UNIPR e visita a Punto Verde per pianificazione prodotti e rilievi / presso Punto Verde	€ 92,36
Totale:		€ 307,65

Azione 1	<b>PROVE IN CAMPO</b>
Unità aziendale responsabile	<i>Open Fields - EcorNaturaSi</i>
Descrizione delle attività	<p>Come da piano sperimentale, il secondo anno di sperimentazione prevedeva di ripetere lo schema di campo e i trattamenti agronomici effettuati durante il primo anno di sperimentazione, attività descritta nella relazione tecnica allegata al rendiconto intermedio.</p> <p>Ad inizio della seconda annualità quindi, i tecnici Open Fields ed EcorNaturaSi, insieme alle aziende agricole interessate, hanno effettuato un sopralluogo dei campi e un incontro con le aziende agricole per programmare le attività.</p> <p>Di seguito la descrizione dei siti e dei protocolli applicati:</p> <p>Presso l'Azienda <b>PUNTO VERDE</b>, situata a Savignano sul Panaro (Modena), la sperimentazione ha riguardato un impianto di pere Williams di 14 anni. Nell'impianto il suolo è inerbito tra le file e scalzato sulla fila, l'irrigazione è a goccia. In autunno tutto l'impianto viene fertilizzato con Phenix (concime organico Italpollina).</p> <p>Presso l'Azienda <b>Sara Vespignani (CORTE SAN RUFFILLO)</b>, situata a Marzeno di Brisighella (Ravenna), la sperimentazione ha riguardato un impianto di nettarine var. Alma di 12 anni. Nell'impianto il suolo è inerbito tra le file e scalzato sulla fila, l'irrigazione è a goccia. In autunno tutto l'impianto viene fertilizzato a Letame maturo aziendale (100 q.li/ha).</p> <p>In entrambi i campi di sperimentazione sono stati individuate 3 parcelle di circa 1.500 mq dove sono stati applicati i seguenti protocolli di trattamenti:</p> <p><b>TESI 1: Ceres Biotics</b>  Trattamento 1 in primavera (pre-fioritura) con temperature del suolo &gt; di 10°C da ripetere dopo 30-45 giorni /post-allegazione: - Simbiotic NPK 100 g/ha + Siapton 3 l/ha;  Trattamento 2 dopo altri 30 giorni: Nutribio N 50 g/ha + Siapton 3 l/ha.</p> <p><b>TESI 2: Micosat</b>  Trattamento 1 metà aprile e da ripetere dopo 15 gg: Micosat F DP 10 WP 5 kg /ha + Nutribacter 5 kg/ha + Vegafert kg/ha 25;  Trattamento 2 ad inizio primavera - trattamento spray fogliare da ripetere dopo 7/10 gg:  - Micosat tab plus 1,5 kg/ha + Nutribacter SF 1,5 kg.</p> <p><b>TESI 3: Controllo non trattato.</b></p> <p>Il calendario effettivo dei trattamenti ha rispettato in linea di massima quello descritto dal protocollo.</p> <p><i>Ceres Biotics</i> (Simbiotik Npk - Nutribio N) è un ammendante organico semplice non compostato costituito da micorrize (2%) e batteri della rizosfera azotofissatori (<i>Azotobacter salinestris</i> ceppo CECT 9690; <i>Bacillus megaterium</i> CB1802 strain). Il suo utilizzo è consentito in agricoltura biologica. Adatto a tutte le colture (seminativi, orticole ed arboree) alla dose di 50 gr/ha, è raccomandato il trattamento in fertirrigazione e insieme ad un attivatore dei microrganismi (es. Siapton - epitelio animale idrolizzato, 8% N).  Il suo utilizzo permette la Cattura e la fissazione dell'azoto atmosferico (fino al 35 - 40 % del fabbisogno in N) e solubilizza P e K; migliorano l'utilizzo delle sostanze nutritive; permette l'aumento del vigore e miglioramento delle caratteristiche qualitative delle produzioni; stimola lo sviluppo radicale, la captazione del ferro e i meccanismi di difesa della pianta.</p> <p><i>MICOSAT (Centro Colture Sperimentali)</i> è costituito da micorrize vescicolo-arbuscolari, batteri benefici della rizosfera (<i>Bacillus</i> spp BP 79 <i>Bacillus subtilis</i> BR62 <i>Streptomyces</i> spp SB14 <i>Streptomyces</i> spp. SP80), funghi saprofiti (<i>Trichoderma harzianum</i> TH01 <i>Trichoderma</i> spp TV60) e Lieviti (<i>Pichia pastoris</i> PP59) in rapporto di tipo simbiotico con le radici delle piante. Si può distribuire con trattamenti spray alla vegetazione o in fertirrigazione. E' raccomandato distribuire Micosat con attivatori dei microrganismi (es. Vegafert - estratto fluido di lieviti con alghe).  Il suo utilizzo permette il ripristino flora microbica terreno, l'Induzione di resistenza, l'effetto micorrizzazione radice, stimolo radicale, nutrizione e Induttore di resistenza.</p>

**Tabella 1.1.** Calendario dei trattamenti

Trattamenti 2022		Punto verde	Vespignani sara
tesi 1 ceres	prodotto		
	1° tratt	simbiotik npk 15 gr + siapton 0,45 lt	15-apr 12-apr
	2° tratt	simbiotik npk 15 gr + siapton 0,45 lt	24-mag 19-mag
3° tratt	nutribio 7 gr + siapton 0,45 lt	17-giu 21-giu	
tesi 2 micosat			
1° tratt fogl.	Micosat TAB 0,22 kg + nutribacter 0,75 kg	15-apr	12-apr
	Micosat F 0,75 kg + nutribacter 0,75 kg	29-apr	26-apr
3° tratt fogl.	Micosat TAB 0,22 kg + nutribacter 0,75 kg	4-mag	23-mag
	Micosat F 0,75 kg + nutribacter 0,75 kg	11 mag	30-mag

I rilievi sono stati condotti con l'obiettivo di valutare gli effetti dei trattamenti sulla fertilità del suolo e gli effetti sulla pianta e sulla produttività. In particolare:

- SALUTE DEL SUOLO: analisi del terreno nell'area interessata dall'apparato radicale (tessitura, carbonio totale, carbonio organico, azoto disponibile, P2O5, K2O, MgO, SO3). Per ogni tesi sono stati raccolti al termine del progetto (autunno 2022) campioni di suolo che sono stati analizzati per le principali caratteristiche qualitative presso un laboratorio accreditato. Sono stati raccolti circa 1,5 kg di terreno nella fascia 0-30 cm di profondità. Il campionamento del suolo è stato fatto con una trivella apposita raccogliendo aliquote di circa 300 grammi di terreno (0-30 cm di profondità) in 4 punti scelti casualmente all'interno di una singola tesi ad una distanza media di circa 50 cm dalla fila. Alla fine del campionamento sono stati ottenuti 3 campioni (T1, T2 e T3) di circa 1,5 kg ognuno. I tre campioni di suolo delle diverse tesi sono stati analizzati dal laboratorio di EcorNaturaSì.
- STATO GENERALE DELLA COLTURA: vigore vegetativo, malattie;
- QUALITÀ E QUANTITÀ DELLE PRODUZIONI:
  - o Il primo parametro considerato è stata la **produttività** considerando le produzioni totale delle singole tesi (considerando che ogni tesi era composta dallo stesso numero di piante);
  - o Il secondo parametro considerato è stato il contenuto totale di **solidi solubili** misurato mediante analisi rifrattometrica ed i risultati sono stati espressi come °Brix su 20 frutti scelti casualmente dopo la raccolta;
  - o L'ultimo parametro considerato è stato il **calibro** (extra, AAA, AA, A, B) su 100 frutti scelti casualmente dopo la raccolta.

*Al termine dell'acquisizione dei risultati, i dati raccolti sono stati elaborati utilizzando il pacchetto statistico MINITAB (Pennsylvania State University) al fine di verificare la significatività dei risultati ottenuti.*

*I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA). I confronti tra le medie sono stati eseguiti secondo il test di Tukey (\*\* $p \leq 0.001$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \* $p \leq 0.05$ , ove  $p$  è la probabilità che un determinato risultato sia imputabile al caso. Se  $p$  è inferiore a 0.01, la probabilità che quel risultato sia imputabile al caso è inferiore a 1%).*





**Figura 1.1.** Schema di campo nell'Azienda Punto Verde e vista generale dell'impianto



**Figura 1.2.** Schema di campo nell'Azienda Sara Vespignani e vista generale dell'impianto

#### **RISULTATI SECONDO ANNO**

I risultati delle analisi del suolo al termine dei trattamenti per l'azienda **Punto Verde** sono riportati nella tabella sottostante.

I terreni risultano ricchi in sostanza organica e ben dotati di tutti gli elementi nutritivi tranne il boro solubile.

Tutti i valori osservati sono compatibili con una gestione biologica di un frutteto.

**Tabella 1.2.** Risultati delle analisi del suolo al termine delle attività per l'azienda Punto Verde



analisi chimiche varie	T1 2023	T2 2023	T3 2023	Media 2023	
Calcare totale	6,9	6,1	6,6	6,5	lievemente calcareo
Calcare attivo	2,3	2,9	2,7	2,6	medio
Carbonio organico	3,9	3,2	3,09	3,4	
<b>Sostanza organica</b>	<b>5,2</b>	<b>5,1</b>	<b>5,3</b>	<b>5,2</b>	<b>ben dotato</b>
azoto totale	0,57	0,6	0,58	0,6	ricco
fosforo assimilabile	78,3	78,9	76,9	78,0	ricco
boro solubile	0,3	0,32	0,33	0,3	povero
rapporto Carbonio/azoto	10,8	10,9	10,9	10,9	carenza C
analisi strumentali varie					
Scheletro	0,2	0,2	0,2	0,2	
Tessitura					Arg-lim
pH	8	8	8	8,0	alcalino
CSC	27,1	27,8	27,7	27,5	eccesso
Cationi					
Calcio Ossido scambiabile	6601	6601	6601	6601,0	
Calcio scambiabile	4790	4790	4789	4789,7	ben dotato
Magnesio ossido scambiabile	583	583	583	583,0	
magnesio scambiabile	381	380	380	380,3	ricco
potassio ossido scambiabile	699	699	699	699,0	
Prova					
Potassio scambiabile	595	590	588	591,0	molto ricco
sodio scambiabile	31	31	32	31,3	
rapporto					
Magnesio/potassio	2,2	2,9	2,4	2,5	eccesso K
Rapporto Calcio/magnesio	9,6	9,6	9,6	9,6	
Rapporto Calcio/potassio	17,5	17,5	17,9	17,6	

Riguardo ai risultati produttivi, l'annata è stata caratterizzata da una primavera secca e assenza di sintomi di malattia, mentre la raccolta è stata effettuata il 15 agosto, in linea con gli ultimi anni.

Le rese sono state di circa 40 t/ha, i °brix 14,7 e il 55% dei frutti avevano un calibro categoria I o extra (Tabella 1.3).

**Tabella 1.3.** Dati produttivi 2022 - nettarine per le prove presso l'Azienda Sara Vespignani

anno	Resa ton/ha				°brix 50 frutti				% calibro > 60 mm diametro (cat I o extra)			
	tesi 1 (Nut)	tesi 2 (Mic)	tesi 3 (con)	media	tesi 1 (Nut)	tesi 2 (Mic)	tesi 3 (con)	media	tesi 1 (Nut)	tesi 2 (Mic)	tesi 3 (con)	media
2022	40,33	40,66	39,66	40,22	15,1	14,7	14,1	14,7	73%	53%	40%	55%

I risultati delle analisi del suolo al tempo zero per l'azienda **Sara Vespignani** sono riportati nella tabella sottostante. I terreni risultano ricchi in sostanza organica e ben dotati di tutti gli elementi nutritivi tranne il boro e fosforo assimilabile, tutti i valori osservati sono compatibili con una gestione biologica di un frutteto.

**Tabella 1.4.** Risultati delle analisi del suolo al termine delle attività per l'azienda Sara Vespignani.

analisi chimiche varie	T1 2023	T2 2023	T3 2023	Media 2023	
Calcare totale	16,9	16,4	15,9	16,4	mediamente calcareo
Calcare attivo	7	7,8	6,9	7,2	ricco
Carbonio organico	2,04	2,12	1,8	2,0	
<b>Sostanza organica</b>	<b>4,34</b>	<b>4,12</b>	<b>3,98</b>	<b>4,1</b>	<b>ben dotato</b>
azoto totale	0,97	0,67	0,39	0,7	ben dotato
fosforo assimilabile	9,7	9,1	8,9	9,2	scarsamente dotato
boro solubile	0,4	0,29	0,26	0,3	scarsamente dotato
rapporto Carbonio/azoto	12,9	12,2	12,9	12,7	carenza di azoto
analisi strumentali varie					
Scheletro	0,4	0,4	0,5	0,4	
tessitura					
pH	8,3	8,5	8,9	8,6	alcalino
CSC	31	31	31	31,0	eccesso
Cationi					
Calcio Ossido scambiabile	7455	7467	7466	7462,7	
Calcio scambiabile	5329	5321	5323	5324,3	ricco
Magnesio ossido scambiabile	578	570	579	575,7	
magnesio scambiabile	369	367	367	367,7	molto ricco
potassio ossido scambiabile	745	745	745	745,0	

I risultati produttivi per l'azienda Sara Vespignani sono riportati in Tabella 1.5. La produttività generale del campo è stata in linea con l'atteso. La raccolta è iniziata il 5 agosto 2022 ed è continuata l'11 e il 15 agosto (in genere le nettarine vengono raccolte in più passaggi man mano che maturano). La produttività media è stata di 6,9 t/ha, i °Brix pari a 18,8, e l'89% dei frutti aveva un calibro maggiore di A.

**Tabella 1.5.** Dati produttivi 2022 - nettarine per le prove presso l'Azienda Sara Vespignani

anno	Resa ton/ha				brix 100 frutti				calibro > A (%) 100 frutti			
	tesi 1 (Nut)	tesi 2 (Mic)	Tesi 3 (con)	media	tesi 1 (Nut)	tesi 2 (Mic)	Tesi 3 (con)	media a	tesi 1 (Nut)	tesi 2 (Mic)	Tesi 3 (con)	media
2022	7,03	6,84	6,87	6,91	19,4 a	18,4 b	18,6 ab	18,8	92,7%	93,3%	83,3%	89,8%

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate

*Le attività sono state portate avanti come da programma ad eccezione della cromatografia circolare, un'analisi qualitativa per immagini usata in agricoltura biodinamica, che, seppur prevista nel Piano, non è stata eseguita in quanto si è preferito svolgere analisi chimico-fisiche più complete dei suoli.*

Attività ancora da realizzare

*Tutte le attività sono state completate.*

## Costi personale: Azione 1

Cognome e nome	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Costo orario	Ore	Costo totale
	impiegato TI	gestione prove agronomiche	€ 27,00	111,00	€ 2.997,00
	operaio agricolo	attività di campo	€ 19,50	66,00	€ 1.287,00
	Agronomo	attività di campo	€ 27,00	216,00	€ 5.832,00
	Imprenditore agricolo	attività di campo	€ 19,50	58,00	€ 1.131,00
	operaio agricolo	attività di campo	€ 19,50	94,00	€ 1.833,00
	Analista Biologa	analisi terreno	€ 27,00	277,00	€ 7.479,00
	Responsabile area R&D	gestione prove in campo ed analisi	€ 27,00	71,00	€ 1.917,00
	operaio agricolo	attività di campo	€ 19,50	78,00	€ 1.521,00
	operaio agricolo	attività di campo	€ 19,50	117,00	€ 2.281,50
Totale:					€ 26.278,50

## Costi trasferte: Azione 1

nome e cognome	descrizione	Costo
	incontro necessario per consegna prodotti per trattamenti e valutazione del campo / Azione 1 - prove in campo	€ 60,41
	visite per trattamenti / Azione 1 - prove in campo	€ 163,28
	trasferta per trattamenti e rilievi / Azione 1 - prove in campo	€ 145,84
	trasferta per raccolta e rilievi / Azione 1 - prove in campo	€ 156,60
	trasferta per raccola e rilievi / Azione 1 - prove in campo	€ 64,49
	trasferta per raccola e rilievi / Azione 1 - prove in campo	€ 62,34
	Panel test a Bologna Ecor e UNIPR / presso Panel test a Bologna Ecor e UNIPR	€ 89,91
	Panel test a Bologna Ecor e UNIPR / presso Panel test a Bologna Ecor e UNIPR	€ 89,91
	rilievisuolo / presso Corte San Ruffillo	€ 172,10
	Prelievi suolo 2 / presso Corte San Ruffillo	€ 190,83
	Rilievi suolo 1 / presso Punto Verde	€ 160,71
	Rilievi terreno 2 / presso Punto Verde	€ 146,08
	<b>Totale:</b>	€ 1.502,50

<b>Azione 2</b>	<b>SELEZIONE DEI MICRORGANISMI PER PRODOTTI FERMENTATI</b>
Unità aziendale responsabile	SITEIA-UNIPR
Descrizione delle attività	<p>Di seguito vengono riportati i materiali e metodi e i risultati inerenti all'Azione 2 non riportati nella rendicontazione intermedia precedente.</p> <p style="text-align: center;"><b>1 – Caratterizzazione di albicocca, lampone, mela e pesca nettarina fermentate</b></p> <p>Nell'ambito dell'Azione 2 a partire dalle 4 matrici puree di albicocca, lampone, mela e pesca nettarina, sono state condotte fermentazioni utilizzando diversi ceppi selezionati tramite numerose prove ed i prodotti ottenuti sono stati caratterizzati in termini di zuccheri riducenti (liberi e totali) e grado Brix. Lo scopo è stato quello di standardizzare il processo e capire quali parametri fossero utili al fine di avere informazioni sulla natura della matrice stessa.</p> <p><u>Materiali e metodi</u></p> <p><b>1.1 Determinazione della quantità di zuccheri riducenti mediante metodo di Fehling</b>  Il metodo di Fehling è basato sulla tecnica della titolazione per ossido-riduzione e prevede l'utilizzo di specifici reattivi quali il reattivo Fehling I composto da solfato di Cu (II) pentaidrato (<math>CuSO_4 \cdot 5 H_2O</math>) in <math>H_2O</math> distillata e il reattivo Fehling II composto da di tartrato di sodio e potassio (<math>KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O</math>) e NaOH in <math>H_2O</math> distillata (Kunz et al 2011). I reattivi di Fehling vanno miscelati usando uguali volumi di Fehling I e Fehling II (5 ml).  La metodica è suddivisa in 2 parti:  <u>1-Valutazione del tenore di zuccheri riducenti liberi sul campione tal quale</u>  Si pesa una quantità esatta di succo (2-3 g), si trasferisce in un matraccio tarato da 250 ml e si porta a volume con acqua distillata. Questa soluzione ben miscelata viene utilizzata per riempire la buretta e titolare la miscela di Fehling aggiungendo il blu di metilene come indicatore e si procede con la titolazione con viraggio da un blu-viola ad un rosso mattone. Tramite opportune tabelle è possibile poi correlare il volume utilizzato con la quantità di zuccheri riducenti presenti nel succo/purea, tenendo conto del volume iniziale della soluzione zuccherina (250 ml) e dei grammi pesati.  <u>2-Valutazione del tenore di zuccheri riducenti totali sul campione dopo idrolisi</u>  Il saccarosio non è riducente, quindi per determinare il quantitativo totale di zuccheri riducenti presenti, va eseguita l'idrolisi del saccarosio.  Si pesa una quantità esatta di succo/purea (2-3 g) in un matraccio tarato da 250 ml e si diluisce con acqua distillata aggiungendo 4 ml di HCl 6 N. Si scalda a 65°C per 15/20 minuti al fine di idrolizzare il saccarosio. Si raffredda, si aggiunge la fenolftaleina (2 – 3 gocce) e si neutralizza fino a viraggio rosa con NaOH (10%). Quindi si corregge il pH riportando verso la neutralità mediante l'aggiunta di qualche goccia di Ac. Acetico 12% fino a scomparsa del colore. Si porta a volume esattamente con acqua distillata e si procede alla titolazione come precedentemente descritto. Tramite opportune tabelle è possibile poi correlare il volume utilizzato con la quantità di zuccheri riducenti presenti nel succo/purea, tenendo conto del volume iniziale della soluzione zuccherina (250 ml) e dei grammi pesati.</p> <p><b>1.2 Determinazione della quantità di zuccheri totali e sostanze secca mediante rifrattometro</b>  Sui campioni in esame (quando possibile), è stato determinato il tenore di sostanza secca/zuccheri totali utilizzando un rifrattometro ed esprimendo il risultato in gradi Brix (°Brix). In caso un succo di frutta sia limpido, il grado Brix si avvicina alla % di zuccheri riducenti totali. Al contrario, più un campione risulta torbido o presenta particolato, più il grado Brix si discosta dalla percentuale di zuccheri riducenti totali. Per ovviare a questa problematica, il campione può essere diluito, ma è necessario tenere in considerazione il fattore di diluizione.</p> <p><u>Risultati</u></p>

Dai dati riportati in Tabella 2.1, si può notare come vi sia una discrepanza tra la percentuale di zuccheri totali riscontrata con il metodo di Fehling e quella determinata per via rifrattometrica. Il primo metodo è sicuramente più accurato ai fini di quantificare gli zuccheri riducenti totali in un campione di succo o purea di frutta. Spesso, infatti, i succhi di frutta e a maggior ragione le puree presentano naturalmente del particolato che potrebbe andare a inficiare la misura della sostanza secca o del grado zuccherino misurato con un rifrattometro.

Le analisi sono state utili a capire innanzitutto quale fosse il metodo migliore per determinare la percentuale di zuccheri totali.

**Tabella 2.1.** *Quantità di zuccheri riducenti liberi e totali riscontrate nei diversi campioni analizzati. I risultati sono espressi in percentuale.*

Campione	% Zuccheri liberi	% Zuccheri totali	% Saccarosio	°Brix
Mela controllo+saccarosio	8,50	14,69	6,30	14,6
Mela ferm.4186+saccarosio	7,55	10,51	3,02	-
Mela ferm.4461+saccarosio	7,13	9,72	2,64	10,80
Mela ferm.4093+saccarosio	7,15	10,57	3,48	-
Mela ferm.2184+saccarosio	7,25	9,48	2,27	-
Mela fer.4186	7,05	7,40	0,35	10,11
Mela ferm. 4186+saccarosio (prova2)	6,84	13,11	6,39	15,35
Pesca Nett. concentrato	19,62	27,00	7,51	31,91
Pesca Nett. controllo (succo) +saccarosio	5,07	16,58	11,72	12,98
Pesca Nett. ferm. 4199 +saccarosio	4,93	9,03	4,17	18,6
Pesca Nett. ferm.105+saccarosio	4,78	9,43	4,74	16,41
Pesca Nett. ferm.1019+saccarosio	5,15	9,29	4,21	16,35
Pesca Nett. ferm.1019	4,93	6,84	1,94	10,2
Pesca Nett. ferm.1019+saccarosio (prova2)	4,75	12,91	8,31	19,7
Lampone controllo (purea)	20,08	29,92	0,87	34,3
Lampone controllo (succo)	7,48	7,83	0,36	14,8
Lampone controllo +saccarosio	5,78	10,36	4,66	16,4
Lampone ferm.2233+saccarosio	6,16	11,76	5,70	19,2
Lampone ferm.4453+saccarosio	5,70	11,83	6,24	15,16
Lampone ferm.4932+saccarosio	5,80	11,85	6,16	23,36
Lampone ferm.4932	6,25	7,13	0,90	11,4
Lampone ferm.4932+saccarosio (prova2)	5,42	21,71	16,58	25,8
Albicocca purea	6,36	14,48	8,27	18,6
Albicocca succo	6,25	7,15	0,92	10,9
Albicocca ferm.2462+saccarosio	7,61	16,24	8,79	17
Albicocca ferm.4198+saccarosio	5,53	14,33	8,96	16,4
Albicocca ferm.4932+saccarosio	5,38	13,86	8,63	16,8
Albicocca ferm.4932	5,46	6,52	1,09	9,97
Albicocca ferm.4932+saccarosio (prova2)	5,11	12,76	7,79	19,74

#### **Bibliografia**

Kunz, T., Lee, E. J., Schiwek, V., Seewald, T., Methner, F.-J. (2011) Glucose – a Reducing Sugar? Reducing Properties of Sugars in Beverages and Food. *Brewing Science*, 64, 61-67.

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità

Gli obiettivi dell'Azione 2 sono stati ampiamente raggiunti. Rispetto alle fasi previste da progetto, come già riportato nella Relazione intermedia, è stato deciso, in accordo con tutte le aziende partner, di eseguire delle prove aggiuntive, aggiungendo zucchero di canna biologico, con lo scopo di rendere più buoni e appetibili i diversi prodotti fermentati.

Inoltre, come già descritto in precedenza, le analisi sono state eseguite su 4 matrici (albicocca, mela, pesca varietà nettarina e lampone), in quanto l'azienda agricola Punto Verde Bio non era più in grado di fornirci la purea di pesca.

Al fine di caratterizzare le matrici fermentate e selezionare il processo migliore, i campioni sono stati analizzati anche in termini di quantità di zuccheri riducenti totali determinati con metodo Fehling e concentrazione in sostanza secca/zuccheri, determinata con rifrattometro.

## Costi personale: Azione 2

Cognome e nome	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Costo orario	Ore	Costo totale
	Prof. Associato	responsabile scientifico	€ 48,00	€ 50,00	€ 2.400,00
	Borsista	analisi microbiologiche			€ 4.010,00
	Borsista	analisi microbiologiche e chimiche			€ 4.200,00
	Assegnista	analisi microbiologiche			€ 991,10
	Borsista	analisi microbiologiche			€ 2.560,00
	Prof. Associato	gestione analisi microbiologiche	€ 48,00	€ 100,00	€ 4.800,00
Totale:					€ 18.961,10

## Costi trasferta: Azione 2

nome e cognome	descrizione	Costo
	<b>Ritiro campioni per progetto PSR</b>	€ 10,40
	<b>Visita azienda partner Corte San Ruffillo</b>	€ 9,30
<b>Totale:</b>		€ 19,70

## Costi materiale consumabile: Azione 2

Fornitore	descrizione materiale	Costo
SARSTEDT - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	PROVETTA 50ML PP CONICA T.VITE STER.GRA	€ 73,20
SARSTEDT - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	PROVETTA 50ML PP CONICA T.VITE STER.GRA	€ 475,80
SARSTEDT - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	PIASTRA PETRI 92X16 PS CAMME AREAZ.STER	€ 966,24
SACCO - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	PUNT ST FIL RAC MAXREC 1-100 UL960	€ 210,51
SARSTEDT - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	PIASTRA PETRI 92X16 PS CAMME AREAZ.STER	€ 934,03
Merck Life Science - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	AMBERLITE IRA958, CL()FORM	€ 61,98
Merck Life Science - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	PK3 SPME ASSY 50/30UM DVB/CAR/PDMS SF 23	€ 579,68
SACCO - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	PUNTSTFILRAC MAXREC 100-1000 UL1000	€ 84,20
<b>Totale:</b>		€ 3.385,64

<b>Azione 3</b>	<b>OTTIMIZZAZIONE DEL PROCESSO DI FERMENTAZIONE</b>
Unità aziendale responsabile	SITEIA-UNIPR
Descrizione delle attività	<p>Le attività previste da progetto per il completo raggiungimento degli obiettivi dell'azione 3 erano le seguenti:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Valutazione del profilo nutrizionale e aromatico dei 5 prodotti fermentati migliori</li> <li>2. Prove di <i>shelf-life</i> al fine di valutare la stabilità e il mantenimento delle caratteristiche organolettiche e nutrizionali in diversi possibili scenari di vendita:             <ol style="list-style-type: none"> <li>i) conservazione a temperatura ambiente a seguito di trattamento termico di stabilizzazione; ii) conservazione in condizioni refrigerate.</li> </ol> </li> </ol> <p>Di seguito, in dettaglio, verranno riportate tutte le attività svolte, comprensive di materiali e metodi e risultati, inerenti a questa azione.</p> <p style="text-align: center;"><b>1. Valutazione contenuto polifenoli totali e attività antiossidante</b></p> <p>Al fine di valutare il contributo della fermentazione rispetto ai controlli non fermentati, i 4 prodotti migliori per matrice che erano stati assaggiati presso EcorNaturaSì nelle giornate del 15-16 luglio 2021, sono stati caratterizzati per il contenuto in zuccheri riducenti (liberi e totali), polifenoli totali e la concentrazione in polifenoli e composti antiossidanti.</p> <p>Le puree sono state fermentate utilizzando diversi ceppi. Dal momento che la fermentazione può influenzare soprattutto questi parametri, è stato deciso di focalizzarsi su queste proprietà, lasciando caratterizzazioni più approfondite per il o i prodotti target, selezionati per la fase di <i>scale-up</i> aziendale.</p> <p><b>1.1 Determinazione della quantità di zuccheri riducenti mediante metodo di Fehling</b></p> <p><u>Materiali e metodi</u></p> <p>Il metodo di Fehling utilizzato è quello descritto in precedenza.</p> <p><u>Risultati</u></p> <p>I risultati ottenuti sono riportati nella tabella seguente (<b>Tabella 3.1</b>).</p> <p><b>Tabella 3.1.</b> <i>Quantità di zuccheri riducenti liberi e totali riscontrate nei diversi campioni analizzati. I risultati sono espressi in percentuale.</i></p>



Campione	% Zuccheri liberi	% Zuccheri totali	% Saccarosio
Mela controllo+saccarosio	8,50	14,69	6,30
Mela ferm.4461+saccarosio	8,12	12,35	4,31
Mela ferm.4461+4186+saccarosio	7,99	13,41	5,52
Mela ferm.2093+saccarosio	11,42	13,94	2,57
Mela ferm.2093+4461+saccarosio	11,69	12,53	0,86
Pesca Nett. controllo (succo) +saccarosio	5,07	16,58	11,72
Pesca Nett. ferm.4199+saccarosio	5,11	14,96	10,03
Pesca Nett. ferm.105+saccarosio	6,60	17,72	11,31
Pesca Nett. ferm.105+2001+saccarosio	12,60	19,00	6,52
Pesca Nett. ferm.105+4199+saccarosio	12,99	15,00	2,04
Lampone controllo +saccarosio	5,78	10,36	4,66
Lampone ferm.4453	5,35	13,21	8,00
Lampone ferm.4932	7,56	8,54	1,00
Lampone ferm.4932+2125	5,91	8,88	3,02
Lampone ferm.4932+4341	6,14	8,50	2,41
Albicocca controllo+saccarosio	5,30	13,40	8,25
Albicocca ferm.4198+saccarosio	5,29	13,10	7,95
Albicocca ferm.2462+saccarosio	5,44	13,58	8,28
Albicocca ferm.4198+2467+saccarosio	5,01	13,77	8,92
Albicocca ferm. 4932+2467+saccarosio	5,44	14,34	9,06

Le analisi sono state utili ai fini di determinare se la fermentazione andasse a diminuire il contenuto in zuccheri rispetto al campione non fermentato (controllo), tenendo in considerazione il fatto che il saccarosio è aggiunto come ingrediente. Mentre per alcune matrici si sono evidenziati risultati altalenanti, la matrice albicocca è quella che presenta risultati maggiormente coerenti. Confrontando infatti il contenuto in zuccheri totali del campione controllo addizionato di saccarosio con quelli dei campioni esaminati dopo la fermentazione e contenenti anch'essi saccarosio, si nota come i dati ottenuti siano simili tra loro. La fermentazione non influenza quindi il contenuto in zuccheri su questa matrice. Per le altre 3 matrici in esame è invece più complesso trarre delle conclusioni.

### 1.2 Determinazione della concentrazione in polifenoli totali e composti antiossidanti tramite tecnica spettrofotometrica UV-Vis

Dal momento che i polifenoli, sostanze antiossidanti, sono composti sensibili a processi di ossidazione, si sono determinate le concentrazioni in polifenoli totali e composti antiossidanti in alcuni campioni di puree di frutta fermentati, allo scopo di valutare quale fosse l'effetto dello step di fermentazione su questi componenti.

#### *Materiali e metodi*

Al fine di determinare la quantità totale di polifenoli presenti nei campioni di puree di frutta fermentate e non, è stato utilizzato il test che prevede l'utilizzo del reattivo di Folin-Ciocalteu (Khanizadeh et al. 2008). In particolare, il reattivo di Folin-Ciocalteu è una miscela di acido fosfotungstico e acido fosfomolibdico in grado di ossidare i fenoli, con formazione di una miscela di ossidi di tungsteno e di molibdeno colorati di blu; l'intensità della colorazione è proporzionale alla concentrazione dei composti fenolici presenti. Il metodo si basa sull'utilizzo di uno standard di acido gallico con il quale costruire una

curva di taratura (0,01 – 0,1 mg/g, 5 punti). Il reattivo di Folin-Ciocalteu da aggiungere al campione deve essere diluito 1:10 (v/v) con acqua distillata. Si prepara anche una soluzione di carbonato di sodio al 10% (m/v) in acqua distillata. Per l'analisi: a 250 µl di soluzione standard o di campione (diluito, se necessario) viene aggiunto 1 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu diluito precedentemente e 2 ml di carbonato di sodio 10%. Si lascia reagire 30 min a temperatura ambiente, al buio. Quindi si procede con la lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 760 nm, usando uno spettrofotometro UV-Vis.

Analogamente, per determinare la concentrazione in composti antiossidanti, si utilizza il test del DPPH (reattivo: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Kedare & Singh, 2011). Questo è un radicale libero, quindi un forte ossidante, che viene inibito dalla presenza di antiossidanti, come i polifenoli o altre molecole che possono svolgere questa proprietà. Si prepara una soluzione di reattivo concentrata, alla concentrazione di 1 mM in Etanolo. La soluzione deve essere mantenuta al buio e sotto agitazione a temperatura ambiente per un paio di ore. Quindi si prepara la soluzione di lavoro alla concentrazione di 0.05 mM per diluizione. Come standard di riferimento si utilizza il Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), preparando soluzioni a concentrazione differente (0,1 – 1 mg/g, 5 punti) da utilizzare per costruire la curva di taratura. Per il test, si miscelano 0.1 ml di campione (diluito, se necessario) o standard con 2.9 ml di soluzione di DPPH 0.05 mM. Si prepara anche un "bianco" utilizzando 0.1 mL di acqua e 2.9 ml di soluzione di DPPH. Si lascia reagire 30 min al buio. Si misura l'assorbanza a 517 nm, usando uno spettrofotometro UV-Vis, analizzando prima il bianco poi le soluzioni standard e poi i campioni.

Per la curva di calibrazione si calcola la % di inibizione: *Inhibition percentage (%IP)*  
$$= ((Ab - As)/Ab) * 100$$

Dove: Ab = assorbanza del bianco e As = assorbanza standard/campione.

Analogamente, è stato condotto un ulteriore test utile per la determinazione della capacità antiossidante delle matrici contenenti composti aventi questa proprietà. Quest'ultimo test è basato sull'utilizzo del ABTS, 2,2 -azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), che essendo un composto radicalico, fortemente ossidante, viene inibito se reagisce con molecole antiossidanti (Nenadis et al. 2004). Per eseguire il test, si prepara una soluzione di radicale alla concentrazione di 7 mM che contenga anche il persolfato di potassio alla concentrazione di 2.45 mM. La soluzione viene opportunamente diluita e usata per le analisi. Come standard di riferimento si utilizza il Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), preparando soluzioni a concentrazione differente (0,1 – 1 mg/g, 5 punti) da utilizzare per costruire la curva di taratura. Il test viene effettuato miscelando 20 µL di campione, bianco o standard con 1980 µL di soluzione di ABTS diluito. Si lascia reagire 30 min al buio e si misura l'assorbanza a 734 nm. Si calcola la IP% come per il test del DPPH e quindi si costruisce la curva di calibrazione al fine di risalire alla concentrazione in antiossidanti del campione in esame.

### Risultati

I risultati ottenuti vengono riportati nelle tabelle seguenti. In **Tabella 3.2.** sono riassunti i risultati di prove di fermentazione condotte sulle 4 diverse matrici oggetto di studio utilizzando diversi ceppi di batteri (sia in mono cultura che miscele di ceppi).

**Tabella 3.2.** *Quantità di polifenoli totali e antiossidanti riscontrate nei diversi campioni analizzati (prove con monoculture e co-culture).*

Campione	Polifenoli totali (mg/g)	Antiossidanti DPPH (mM)	Antiossidanti ABTS (mM)
Mela controllo	0,91± 0,18	5,11± 0,37	14,03± 0,92
Mela ferm.4461+saccarosio	0,74± 0,12	9,06± 0,37	14,70± 0,70
Mela ferm.4461+4186+saccarosio	0,72± 0,09	7,79± 0,99	14,90± 0,32
Mela ferm.2093+saccarosio	0,75± 0,11	8,84± 0,04	15,76± 1,07
Mela ferm.2093+4461+saccarosio	0,74± 0,02	8,90± 0,03	15,52± 0,70
Pesca Nett. controllo	3,44± 0,76	1,65± 0,11	4,32± 0,43
Pesca ferm.4199+saccarosio Nett.	2,13± 0,10	0,49± 0,22	4,32± 0,10
Pesca ferm.105+saccarosio Nett.	1,77± 0,60	0,64± 0,39	4,12± 0,52
Pesca ferm.105+2001+saccarosio Nett.	1,42± 0,06	0,71± 0,35	4,51± 0,17
Pesca ferm.105+4199+saccarosio Nett.	2,45± 0,47	0,81± 0,18	4,39± 0,72
Lampone controllo	7,78± 0,57	33,15± 1,72	64,00± 4,56
Lampone ferm.4453	8,35± 0,72	40,20± 0,97	62,52± 0,84
Lampone ferm.4932	7,72± 0,57	39,92± 1,57	61,62± 5,23
Lampone ferm.4932+2125	6,86± 0,72	39,88± 0,11	63,45± 1,56
Lampone ferm.4P32+4341	7,50± 0,05	39,83± 1,21	61,65± 4,75
Albicocca controllo	4,85± 0,51	8,93± 0,16	22,00± 0,05
Albicocca ferm.4198+saccarosio	4,63± 0,46	9,08± 0,11	23,28± 0,80
Albicocca ferm.2462+saccarosio	5,12± 0,18	8,23± 0,58	23,40± 0,40

Lo scopo di questi test è stato quello di verificare il contributo della fermentazione in termini di componenti antiossidanti, dal momento che da studi precedenti condotti sul succo di sambuco è stato dimostrato come lo step di fermentazione porti ad un aumento della concentrazione di polifenoli e quindi ad una conseguente attività antiossidante più pronunciata (Ricci et al. 2019). Nei campioni considerati non si nota lo stesso effetto, se non per la mela, anche se le differenze non sono statisticamente rilevanti. In alcuni casi, sembra evidenziarsi un andamento opposto che porta ad una diminuzione delle quantità di polifenoli e di antiossidanti (pesca nettarina). Si osserva quindi una stabilità di questi composti in albicocca, lampone e mela fermentati.

## 2. Fase aggiuntiva: Valutazione profilo di crescita e contenuto polifenoli totali e attività antiossidante di nuovi prodotti fermentati

Dal momento che i risultati riguardanti il contenuto di polifenoli totali e l'attività antiossidante non avevano mostrato un incremento significativo per nessuno dei 16 campioni fermentati rispetto al controllo non fermentato, è stato deciso di eseguire diverse prove aggiuntive, al fine di migliorare il profilo di crescita dei microorganismi nelle matrici selezionate e allo stesso tempo osservare un incremento da un punto di vista nutrizionale tra fermentato e non fermentato.

Essendo noto da letteratura che frutta e vegetali, a causa del basso pH, alta concentrazione in zuccheri e presenza di polifenoli, rappresentano una matrice ostile per la crescita dei microorganismi, è stato deciso di effettuare due prove sperimentali modificando il substrato di partenza.

### 2.1 Fase aggiuntiva: Valutazione profilo di crescita

Al fine di selezionare i 3 batteri lattici con profilo fermentativo migliore per ogni matrice, si è proceduto con uno screening iniziale testando diversi ceppi appartenenti alla collezione UPCC (University of Parma Culture Collection).

Inizialmente, lo screening ha previsto l'allestimento di 30 fermentazioni, utilizzando:

- 9 ceppi per la purea di albicocca;
- 10 ceppi per la purea di mela;

- 11 ceppi per la purea di lampone.

I ceppi selezionati per lo screening appartengono a 7 diverse specie quali:

*Leuconostoc mesenteroides*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Leuconostoc citreum*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*.

Questo screening iniziale e le analisi successive non sono state eseguite nella purea di pesca fornita dall'azienda agricola Sara Vespignani, in quanto in fase di caratterizzazione, era l'unica purea dove nei prodotti fermentati si osservava un decremento della concentrazione di polifenoli totali e di attività antiossidante, rispetto al controllo non fermentato. Pertanto, è stato deciso di concentrarsi sulla purea di mela, albicocca e lampone, dove la concentrazione di questi composti rimaneva stabile tra fermentato e non fermentato.

Di seguito vengono riportati in dettaglio i diversi ceppi utilizzati nel processo fermentativo, suddivisi per matrice.

**Tabella 3.3.** Ceppi utilizzati nella purea di mela con le rispettive temperature ottimali

MELA		
Ceppo	Specie	Temperatura ottimale
2089	<i>Pediococcus acidilactici</i>	37°C
294	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	30°C
2352	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	30°C
2360	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	37°C
4360	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	37°C
4461	<i>Leuconostoc citreum</i>	30°C
4932	<i>Lacticaseibacillus plantarum</i>	37°C
4520	<i>Leuconostoc citreum</i>	30°C
224	<i>Lactococcus lactis</i>	30°C
4193	<i>Lacticaseibacillus plantarum</i>	37°C

**Tabella 3.4.** Ceppi utilizzati nella purea di albicocca con le rispettive temperature ottimali

ALBICOCCA		
Ceppo	Specie	Temperatura ottimale
2089	<i>Pediococcus acidilactici</i>	37°C
2204	<i>Leuconostoc citreum</i>	30°C
224	<i>Lactococcus lactis</i>	30°C
294	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	30°C
4193	<i>Lacticaseibacillus plantarum</i>	37°C
4360	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	37°C
4519	<i>Leuconostoc citreum</i>	30°C
4520	<i>Leuconostoc citreum</i>	30°C
4932	<i>Lacticaseibacillus plantarum</i>	37°C

**Tabella 3.5.** *Ceppi utilizzati nella purea di lampone con le rispettive temperature ottimali*

LAMPONE		
Ceppo	Specie	Temperatura ottimale
1935	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	37°C
2167	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	37°C
2178	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	37°C
2233	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	37°C
2352	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	37°C
4360	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	37°C
4932	<i>Lactocaseibacillus plantarum</i>	37°C
2089	<i>Pediococcus acidilactici</i>	37°C
2333	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	37°C
4193	<i>Lactocaseibacillus plantarum</i>	37°C
2411	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	37°C

Prima di procedere con la fermentazione, il substrato di partenza è stato modificato allestendo due differenti prove sperimentali, dettagliate di seguito:

- Prova 1 - Diluizione della matrice di partenza
- Prova 2 - Modulazione del pH della matrice di partenza

### **Prova 1. Diluizione della matrice di partenza**

#### Materiali e metodi

Prima di procedere con la fase di fermentazione, le matrici di partenza (mela, albicocca e lampone) sono state diluite al 15% con acqua demineralizzata sterile, al fine di diminuire la concentrazione di zuccheri e composti fenolici che, come riportato in letteratura, potrebbero interferire e inibire la crescita microbica.

Il processo fermentativo è stato condotto mediante l'inoculo di una carica elevata di microrganismi selezionati (7 Log UFC/g) seguito da un tempo di fermentazione di 48h alla temperatura di crescita ottimale del microrganismo selezionato. I campioni ottenuti sono stati valutati da un punto di vista nutrizionale e della crescita microbica con l'obiettivo di selezionare almeno una combinazione che permettesse di migliorare il profilo di crescita e di osservare un incremento significativo tra prodotto fermentato e controllo non fermentato.

La carica microbica è stata valutata subito dopo l'inoculo iniziale, per verificare l'effettiva carica inoculata, e alla fine del tempo di incubazione in termostato, tramite conta vitale in piastra su terreno elettivo De Man Rogosa and Sharpe Agar (MRS agar) (VWR, Radnor, Pennsylvania, Stati Uniti).

Le conte sono state realizzate partendo dal prelievo di un'aliquota del campione ed effettuando delle diluizioni decimali seriali, dalle quali sono stati prelevati 100 µL e diffusi su mezzo agarizzato con l'ausilio di una spatola sterile. Le piastre poi sono state incubate alla temperatura ottimale di crescita in una stufa termostata per 48 ore e in seguito sono state contate le colonie cresciute e con l'impiego della formula della media pesata sono state calcolate le unità formanti colonia su g (UFC/g).

I dati ricavati dalla formula della media pesata sono stati convertiti in unità logaritmiche in base 10 (Log UFC/g).

#### Risultati

Di seguito vengono riportati i dati riguardanti le prove di fermentazione eseguite dopo la diluizione al 15% della matrice di partenza.

Dai risultati ottenuti si è riscontrato che le puree di lampone e albicocca risultano essere matrici piuttosto "ostili", in quanto in queste matrici la maggior parte dei ceppi testati subisce un decremento della crescita, e soltanto pochi di essi mantengono pressoché costante la concentrazione di inoculo iniziale dopo le 48 h di fermentazione. Al contrario, nella purea di mela la maggior parte dei ceppi testati ha mantenuto costante la concentrazione di inoculo iniziale dopo le 48h di fermentazione.

I profili di crescita osservati associati alle misurazioni del pH (tra  $3,2 \pm 0,02$  e  $3,87 \pm 0,01$ ), fanno ipotizzare che il pH acido di queste matrici possa ostacolare e interferire con la

crescita microbica.

In letteratura (Wu et al., 2020), hanno dimostrato che l'aggiunta del bicarbonato di sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), che funge da tampone, potrebbe rendere l'*habitat* meno ostile, permettendo così la crescita dei vari ceppi.

È stato quindi deciso di allestire una seconda prova, modulando il pH con l'aggiunta di  $\text{NaHCO}_3$  alle puree, al fine di standardizzare tutte le matrici ad un pH di ca. 4.0.

## Prova 2. Modulazione del pH nella matrice di partenza

### Materiali e metodi

Per ciascuna matrice (mela, albicocca e lampone) è stato misurato il pH di partenza e successivamente ogni substrato è stato standardizzato aggiungendo  $\text{NaHCO}_3$  fino al raggiungimento di un pH di ca. 4.0, valore, come detto in precedenza, sufficientemente idoneo da letteratura per la crescita dei batteri lattici.

Il processo di fermentazione è stato condotto nelle stesse condizioni precedentemente descritte, con la differenza che nei campioni, oltre al bicarbonato di sodio è stata aggiunta anche acqua demineralizzata sterile per differenza, diluendo anche in questo caso la matrice al 15%.

Le matrici standardizzate sono state utilizzate come substrato per le fermentazioni.

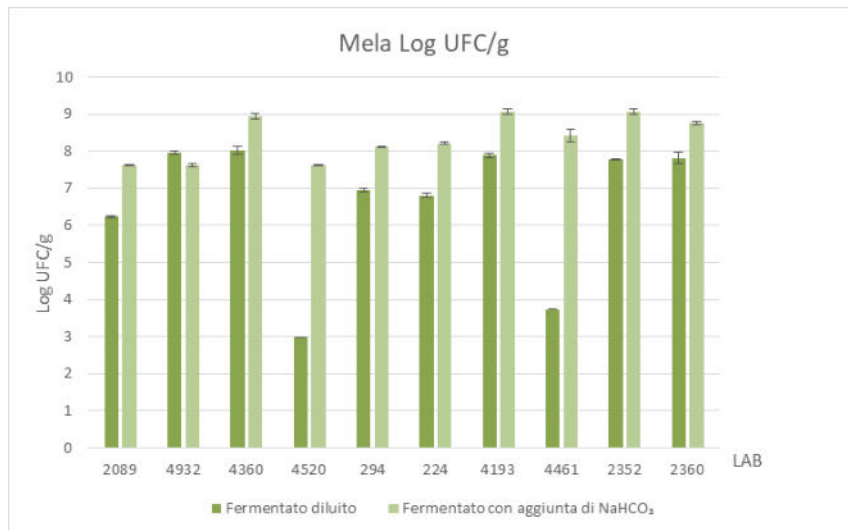
Sono state quindi allestite conte vitali in piastra al T0 (inoculo iniziale) e al T48 (dopo 48 h di fermentazione), su terreno elettivo MRS agar (VWR, Radnor, Pennsylvania, Stati Uniti). Attraverso il conteggio delle colonie e la formula della media pesata è stato possibile calcolare le UFC/g, che successivamente sono state convertite in Log UFC/g.

### Risultati

In **Tabella 3.6** è riportato il delta di crescita per ciascun microorganismo nelle due condizioni sperimentali testate ( $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{NaHCO}_3$ ). I dati (**Tabella 3.6**) mostrano che la maggior parte dei ceppi testati, in entrambe le prove effettuate, è in grado di crescere o mantenere stabile la concentrazione di inoculo iniziale. L'andamento della crescita microbica nella purea di mela (**Figura 3.1**) mostra, dopo l'aggiunta di  $\text{NaHCO}_3$ , un profilo di crescita migliore per tutti i ceppi testati, fatta eccezione per *L. plantarum* 4932, dove osserviamo una crescita paragonabile in entrambe le prove allestite.

**Tabella 3.6.**  $\Delta$  della crescita microbica nei campioni diluiti ed in quelli addizionati di soluzione di  $\text{NaHCO}_3$  espressi in Log UFC/g  $\pm$  DS, nella purea di mela. La variazione di crescita riportate sotto la colonna " $\Delta$ " è data dalla differenza tra la concentrazione cellulare al T48 e la concentrazione cellulare al T0.

MELA				
Ceppo	H <sub>2</sub> O Log UFC/g		NaHCO <sub>3</sub> Log UFC/g	
	$\Delta$	DS	$\Delta$	DS
<i>P. acidilactici</i> 2089	-0,74	0,06	0,47	0,05
<i>L. plantarum</i> 4932	0,71	0,03	0,84	0,04
<i>L. paracasei</i> 4360	0,24	0,17	1,47	0,08
<i>L. citreum</i> 4520	-3,40	0,07	0,54	0,02
<i>L. mesenteroides</i> 294	0,10	0,10	1,57	0,01
<i>L. plantarum</i> 4193	0,86	0,00	3,22	0,01
<i>L. citreum</i> 4461	-3,31	0,00	1,89	0,16
<i>L. rhamnosus</i> 2352	0,42	0,07	1,61	0,08
<i>L. rhamnosus</i> 2360	0,04	0,17	1,20	0,05
<i>L. lactis</i> 224	-1,15	0,08	0,45	0,03

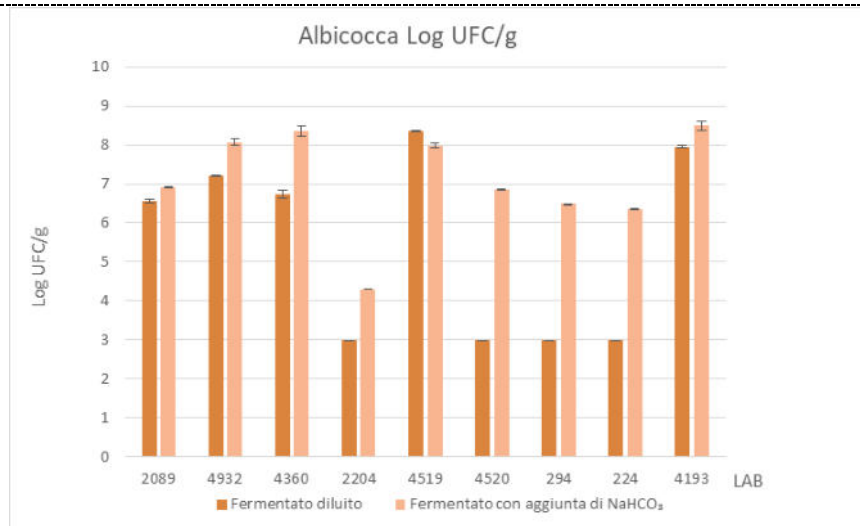


**Figura 3.1.** Andamento nella purea di mela della crescita microbica espressa in Log UFC/g per i campioni diluiti e per i campioni contenuti la soluzione di NaHCO<sub>3</sub>.

In **Tabella 3.7** è stato riportato il delta di crescita per ciascun microorganismo nelle due condizioni sperimentali testate (H<sub>2</sub>O e NaHCO<sub>3</sub>) nella purea di albicocca. Dai risultati, mostrati in **Tabella 3.7**, è possibile osservare come la maggior parte dei ceppi testati subisca un decremento della crescita dopo 48h di fermentazione, sia diluendo la matrice, che addizionando bicarbonato di sodio. L'unico ceppo in grado di crescere in entrambe le prove allestite è *L. plantarum* 4193. Anche in questa purea, addizionando NaHCO<sub>3</sub> al substrato, il profilo di crescita è migliore, fatta eccezione per il ceppo *L. citreum* 4520, dove la crescita è paragonabile in entrambe le prove allestite (**Figura 3.2**). Inoltre, i dati mostrano incrementi anche significativi, di ca. 4 Log UFC/g per alcuni ceppi testati (*L. citreum* 4520, *L. mesenteroides* 294 e *L. lactis* 224).

**Tabella 3.7.** Δ della crescita microbica nei campioni diluiti ed in quelli addizionati di soluzione di NaHCO<sub>3</sub> espressi in Log UFC/g ± DS, nella purea di albicocca. La variazione di crescita riportate sotto la colonna "Δ" è data dalla differenza tra la concentrazione cellulare al T48 e la concentrazione cellulare al T0.

ALBICOCCA				
Ceppo	H <sub>2</sub> O Log UFC/g		NaHCO <sub>3</sub> Log UFC/g	
	Δ	DS	Δ	DS
<i>P. acidilactici</i> 2089	-0,43	0,03	-0,13	0,01
<i>L. plantarum</i> 4932	-0,13	0,05	1,07	0,10
<i>L. paracasei</i> 4360	-0,93	0,13	0,67	0,13
<i>L. citreum</i> 2204	-4,50	0,02	-2,47	0,00
<i>L. citreum</i> 4519	-0,05	0,03	-0,04	0,07
<i>L. citreum</i> 4520	-3,55	0,11	-0,28	0,02
<i>L. mesenteroides</i> 294	-3,72	0,05	-0,07	0,00
<i>L. lactis</i> 224	-4,91	0,04	-0,64	0,00
<i>L. plantarum</i> 4193	0,79	0,03	1,49	0,11



**Figura 3.2.** Andamento della crescita microbica espressa in Log UFC/g per i campioni diluiti e per i campioni contenente la soluzione di NaHCO<sub>3</sub> nella purea di albicocca.

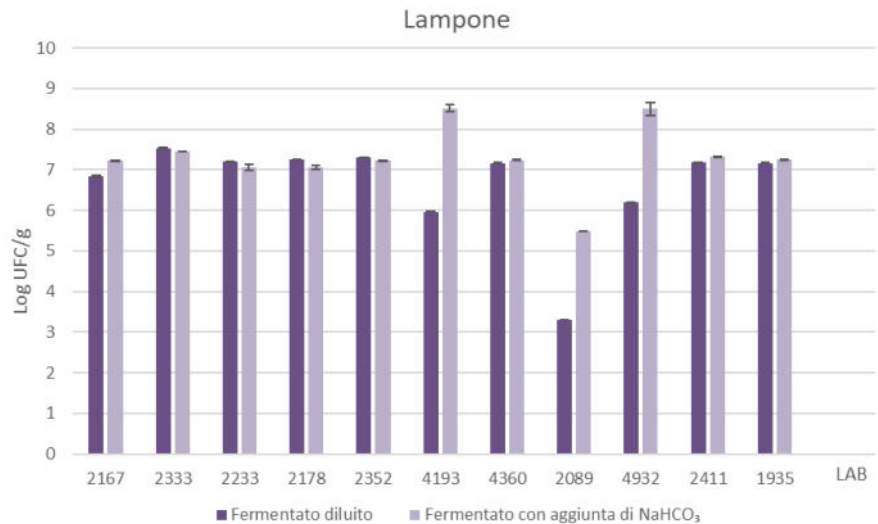
In **Tabella 3.8** è stato riportato il delta di crescita di ciascun microorganismo nelle due condizioni sperimentali testate (H<sub>2</sub>O e NaHCO<sub>3</sub>) nella purea di lampone. Dai risultati è possibile osservare come la maggior parte dei ceppi testati subisca un decremento della crescita dopo 48h di fermentazione, sia diluendo la matrice che aggiungendo bicarbonato di sodio. L'unico ceppo che è in grado, in entrambe le condizioni testate, di mantenere pressoché stabile la concentrazione di inoculo iniziale è *L. paracasei* 2333.

A differenza delle puree di mela e albicocca, l'andamento della crescita microbica nella purea di lampone (**Figura 3.3**) è piuttosto stabile in entrambe le prove allestite, per soli 3 ceppi (*L. plantarum* 4193, *L. plantarum* 4932 e *P. acidilactici* 2089) si osserva un incremento di ca. 2 Log UFC/g aggiungendo NaHCO<sub>3</sub> al substrato.

**Tabella 3.8.** Δ della crescita microbica nei campioni diluiti ed in quelli addizionati di soluzione di NaHCO<sub>3</sub> espressi in Log UFC/g ± DS, nella purea di lampone. La variazione di crescita riportate sotto la colonna "Δ" è data dalla differenza tra la concentrazione cellulare al T48 e la concentrazione cellulare al T0.

LAMPONE					
Ceppo	H <sub>2</sub> O Log UFC/g		NaHCO <sub>3</sub> Log UFC/g		
	Δ	DS	Δ	DS	
<i>L. rhamnosus</i> 2167	-0,49	0,02		0,02	0,02
<i>L. paracasei</i> 2333	0,05	0,05		0,50	0,00
<i>L. rhamnosus</i> 2233	-0,20	0,01		-0,06	0,06
<i>L. rhamnosus</i> 2178	-0,09	0,00		-0,25	0,05
<i>L. rhamnosus</i> 2352	0,30	0,02		-0,11	0,00
<i>L. plantarum</i> 4193	-0,97	0,00		1,55	0,09
<i>L. paracasei</i> 4360	-0,07	0,02		-0,23	0,02
<i>P. acidilactici</i> 2089	-3,02	0,00		-1,50	0,00
<i>L. plantarum</i> 4932	-0,80	0,00		1,49	0,17
<i>L. rhamnosus</i> 2411	-0,32	0,01		0,04	0,01
<i>L. rhamnosus</i> 1935	-0,20	0,01		-0,62	0,02





**Figura 3.3.** Andamento della crescita microbica espressa in Log UFC/g per i campioni diluiti e per i campioni contenente la soluzione di NaHCO<sub>3</sub> nella purea di lampone.

Lo screening preliminare sopra descritto ha permesso di selezionare i 3 ceppi migliori per ogni matrice.

La selezione è stata eseguita seguendo i criteri riportati di seguito:

- Ceppi che erano in grado di crescere dopo 48h di fermentazione
- Ceppi che mantenevano stabile la concentrazione di inoculo iniziale

In **Tabella 3.9.** sono riportati i 3 ceppi migliori selezionati per ogni matrice.

**Tabella 3.9.** Selezione dei 3 migliori ceppi per matrice.

ALBICOCCA		LAMPONE		MELA	
294	<i>L. mesenteroides</i>	4193	<i>L. plantarum</i>	294	<i>L. mesenteroides</i>
4193	<i>L. plantarum</i>	4932	<i>L. plantarum</i>	4461	<i>L. citreum</i>
4932	<i>L. plantarum</i>	2333	<i>L. paracasei</i>	2352	<i>L. rhamnosus</i>

Di seguito sono state eseguite nuovamente le fermentazioni, modificando il substrato di partenza e utilizzando i ceppi mostrati in **Tabella 3.9.** Successivamente i diversi prodotti fermentati sono stati caratterizzati per il contenuto in polifenoli totali e attività antiossidante.

#### Risultati

Di seguito si riportano i risultati delle prove di fermentazione eseguite modificando il pH della matrice di partenza. I campioni sono stati posti a confronto con il campione controllo e con il campione diluito nelle medesime proporzioni con acqua.

**Tabella 3.10.** Quantità di polifenoli totali e antiossidanti riscontrate nei diversi campioni analizzati (prove eseguite in seguito a variazione del pH iniziale).

Campione	Polifenoli totali (mg/g)	Antiossidanti DPPH (mM)	Antiossidanti ABTS (mM)
Alb. Controllo	0,94± 0,11	0,76± 0,07	0,88± 0,26
Alb. H <sub>2</sub> O 294	0,93± 0,01	0,54± 0,10	n.d.
Alb. NaHCO <sub>3</sub> 294	1,15± 0,08	0,53± 0,01	n.d.
Alb. NaHCO <sub>3</sub> (2) 294	1,05± 0,14	0,46± 0,14	n.d.
Alb. H <sub>2</sub> O 4193	1,04± 0,04	0,66± 0,01	1,00± 0,13
Alb. NaHCO <sub>3</sub> 4193	0,93± 0,01	0,67± 0,11	1,05± 0,23
Alb. H <sub>2</sub> O 4932	1,05± 0,02	0,67± 0,07	1,37± 0,26
Alb. NaHCO <sub>3</sub> 4932	1,00± 0,26	0,94± 0,36	1,17± 0,54
Mela Controllo	1,05± 0,02	1,11± 0,12	1,88± 0,21
Mela H <sub>2</sub> O 294	1,56± 0,03*	0,95± 0,14	n.d.
Mela NaHCO <sub>3</sub> 294	1,31± 0,16*	1,10± 0,03	n.d.
Mela H <sub>2</sub> O 2352	0,61± 0,17	0,59± 0,44	1,19± 0,24
Mela NaHCO <sub>3</sub> 2352	1,03± 0,41	1,22± 0,37	2,01± 0,95
Mela H <sub>2</sub> O 4461	1,38± 0,12*	0,93± 0,03	n.d.
Mela NaHCO <sub>3</sub> 4461	1,25± 0,22*	0,83± 0,17	n.d.
Lamp. NaHCO <sub>3</sub> Controllo	1,31± 0,20	2,06± 0,66	1,01± 0,23
Lamp. H <sub>2</sub> O 2333	1,27± 0,13	2,16± 0,43	1,15± 0,06
Lamp. NaHCO <sub>3</sub> 2333	1,37± 0,03	2,53± 0,00	1,32± 0,19
Lamp. H <sub>2</sub> O 4193	1,31± 0,06	2,32± 0,16	0,99± 0,23
Lamp. NaHCO <sub>3</sub> 4193	1,15± 0,00	2,05± 0,17	1,19± 0,01
Lamp. H <sub>2</sub> O 4932	1,35± 0,05	2,62± 0,92	1,31± 0,14
Lamp. NaHCO <sub>3</sub> 4932	1,39± 0,34	2,49± 0,18	2,15± 0,73
Lamp. NaHCO <sub>3</sub> (2) A 4932	1,41± 0,09	2,53± 0,72	1,81± 0,54
Lamp. NaHCO <sub>3</sub> (2) B 4932	1,64± 0,37	2,80± 1,28	2,24± 0,34
Lamp. NaHCO <sub>3</sub> (2) C 4932	1,27± 0,07	2,05± 0,05	1,34± 0,00

In generale, è possibile affermare che i campioni che hanno subito fermentazione presentano valori di polifenoli totali e capacità antiossidante confrontabili con quelle osservate per i rispettivi controlli. La fermentazione, quindi, sembra non influenzare il contenuto in polifenoli e antiossidanti, né andando ad aumentarlo né diminuendolo. In alcuni casi, in particolare per la matrice mela, è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa (t test per campioni indipendenti) nei campioni inoculati con i ceppi 294 e 4461. La concentrazione in polifenoli risulta infatti maggiore rispetto al controllo. I dati non sono però confermati dai valori riscontrati per i composti antiossidanti.

Si può quindi affermare che l'andamento può dipendere da diversi parametri quali la natura della matrice stessa, il ceppo di batteri utilizzati per la fase di fermentazione e il tipo di composti fenolici presenti nella matrice.

### 3. Fase aggiuntiva: Modificazione del processo fermentativo

Poiché le caratterizzazioni chimiche riguardanti il profilo dei polifenoli totali e l'attività antiossidante non avevano mostrato incrementi, si è deciso di modificare il processo fermentativo abbassando la temperatura di fermentazione, al fine di migliorare il profilo di crescita e il profilo nutrizionale. Da lavori precedenti eseguiti dal nostro gruppo di ricerca, era stato osservato che abbassando la temperatura di fermentazione, il ceppo era in grado di migliorare il profilo di crescita e allo stesso tempo era in grado di apportare al prodotto modificazioni nutrizionali e sensoriali interessanti.

Viste le numerose prove effettuate, ci siamo concentrati solo sulla purea di albicocca. La scelta è ricaduta su questa matrice, poiché nel test di accettabilità svolto presso EcorNaturaSì, tutti i panelisti, per questa purea, avevano preferito i prodotti fermentati rispetto al controllo non fermentato. Come *starter* è stato selezionato il ceppo *L. plantarum* 4193, in quanto era l'unico ceppo in grado di crescere di ca. 1 Log UFC/g sia diluendo la matrice che modulando il pH con il bicarbonato di sodio (Tabella 3.7).

#### Materiali e metodi

La fermentazione è stata condotta, come riportato in precedenza, mediante l'inoculo di

una carica elevata di microorganismi (7 Log UFC/g) seguito da un tempo di fermentazione di 48h a 25°C.

Al fine di valutare la crescita microbica, la fermentazione è stata monitorata attraverso le conte vitali in piastra su terreno elettivo MRS agar (VWR, Radnor, Pennsylvania, Stati Uniti), che sono state effettuate al T0 (inoculo iniziale) e dopo 48h di fermentazione.

Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti.

#### Risultati

Dai dati ottenuti si evince un miglioramento nel profilo di crescita. Nelle nuove condizioni testate, il ceppo è in grado di crescere, nella purea di albicocca tal quale, di ca. 1.5 Log UFC/g.

La nuova condizione di fermentazione messa a punto ha permesso di ottenere un ottimo profilo di crescita in un substrato che risultava essere piuttosto ‘ostile’, come osservato in precedenza.

#### **4. Prodotto target: purea di albicocca fermentata**

Nell’ambito dell’azione 3 il gruppo di ricerca di Chimica degli Alimenti si è in seguito occupato della caratterizzazione del prodotto selezionato come “prodotto target”, ovvero in particolare la purea di albicocca che è stata sottoposta a fermentazione (su piccola e larga scala) e a prove di *shelf life*. Sono stati analizzati sia il prodotto fermentato preparato in laboratorio presso SITEIA-UNIPR e quindi prodotto su piccola scala, sia la purea fermentata prodotta presso l’azienda Punto Verde Bio, preparata quindi su più ampia scala. Allo stesso tempo, sono stati presi in considerazione alcuni campioni di controllo, ovvero costituiti da purea di albicocca non fermentata, al fine di determinare quale fosse, sia in termini qualitativi che quantitativi, l’apporto dato dalla fermentazione. I parametri di interesse sono stati determinati al tempo zero, ovvero al momento della produzione. Alcuni parametri di interesse nutrizionale come zuccheri totali e i composti antiossidanti, sono stati determinati sul prodotto anche dopo 3 mesi di *shelf life* (conservazione a temperatura ambiente). Inoltre, si è ritenuto necessario svolgere la caratterizzazione anche sul prodotto trattato termicamente, al fine di verificare che il trattamento termico non apportasse modifiche al prodotto finito.

In particolare, sono stati presi in considerazione per la caratterizzazione: il profilo e la quantità degli zuccheri semplici, profilo e concentrazione degli acidi organici, concentrazione in polifenoli e relativa attività antiossidante, il profilo in composti fenolici e profilo e quantità di composti aromatici.

Ai fini di caratterizzare i campioni in esame, cioè purea di albicocca fermentata prodotta presso SITEIA-UNIPR al tempo zero e dopo 3 mesi di *shelf life* e i campioni preparati eseguendo un scale-up presso l’azienda Punto Verde Bio (azione 4), analizzati al tempo zero sono stati applicati diversi metodi descritti di seguito. Come accennato in precedenza, è stato analizzato anche un prodotto trattato termicamente, al fine di verificare che il trattamento termico non apportasse modifiche al prodotto finito.

**Tabella 3.11.** Schema dei campioni presi in esame per la valutazione chimica e nutrizionale

<b>Codice campione</b>	<b>Descrizione</b>
CONTR-UNIPR	Purea Albicocca controllo (SITEIA-UNIPR)
ALB-FERM-UNIPR	Purea Albicocca fermentato 4193 (SITEIA-UNIPR)
ALB-TR-UNIPR	Purea Albicocca fermentato 4193 e trattato termicamente (SITEIA-UNIPR)
CONTR-AZ	Purea Albicocca controllo (Azienda)
ALB-FERM-AZ	Purea Albicocca fermentato 4193 (Azienda)
ALB-TR-AZ	Purea Albicocca fermentato 4193 e trattato termicamente (Azienda)
CONTR-UNIPR-3M	Purea Albicocca controllo (SITEIA-UNIPR) – 3 mesi shelf life T° amb

ALB-TR-UNIPR-3M	Purea Albicocca fermentato 4193 e trattato termicamente (SITEIA-UNIPR) – 3 mesi shelf life T° amb
-----------------	---

Nota: ciascun campione viene analizzato in doppio.

#### 4.1 Determinazione della quantità di zuccheri riducenti mediante metodo di Fehling

##### Materiali e metodi

Il metodo applicato è lo stesso descritto in precedenza.

##### Risultati

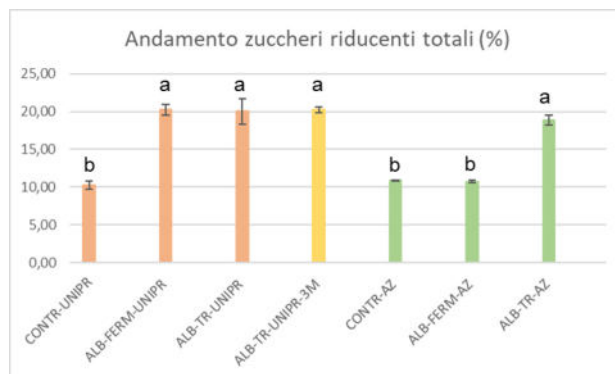
I risultati ottenuti sono riassunti di seguito.

**Tabella 3.12.** *Quantità di zuccheri riducenti liberi e totali riscontrate nei diversi campioni di purea analizzati. I risultati sono espressi in percentuale.*

	% zuccheri liberi Dev.St.		% zuccheri totali Dev.St.	
CONTR-UNIPR	6,9	0,5	10,3	0,5
ALB-FERM-UNIPR	8,0	0,2	20,2	0,7
ALB-TR-UNIPR	8,2	0,1	20,0	1,7
ALB-TR-UNIPR-3M	10,5	0,2	20,2	0,4
CONTR-AZ	9,0	0,1	10,9	0,0
ALB-FERM-AZ	9,3	0,2	10,7	0,2
ALB-TR-AZ	8,9	0,1	18,8	0,7

L'aumento delle percentuali di zuccheri totali e in parte anche dei liberi che si nota confrontando i risultati ottenuti per il campione controllo con quelli osservati nei campioni fermentati, è dovuto all'aggiunta di saccarosio al prodotto. Analizzando i dati, anche dal punto di vista statistico eseguendo l'analisi dell'anova a una via, è possibile concludere che il trattamento termico non determina una diminuzione degli zuccheri presenti e che la percentuale si mantiene in *shelf life* (risultati contrassegnati dalla lettera "a" nel grafico seguente).

Il contenuto in zuccheri risulta quindi pari al 20%, valore desiderato al fine di produrre un prodotto a ridotto contenuto di zuccheri rispetto alle composte normalmente prodotte dalle aziende partner (contenuto in zuccheri = 29%). Il valore si mantiene costante nel tempo.



**Figura 3.4.** *Quantità di zuccheri riducenti totali riscontrate nei diversi campioni di purea analizzati. I risultati sono espressi in percentuale.*

A fine di caratterizzare dal punto di vista molecolare la frazione zuccherina viene applicata la tecnica più sofisticata ed avanzata della gas-cromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS). Dal momento che il prodotto risulta stabile in *shelf life*, la caratterizzazione tramite GC-MS è stata effettuata sui campioni al tempo zero (controllo, fermentato e trattato termicamente).

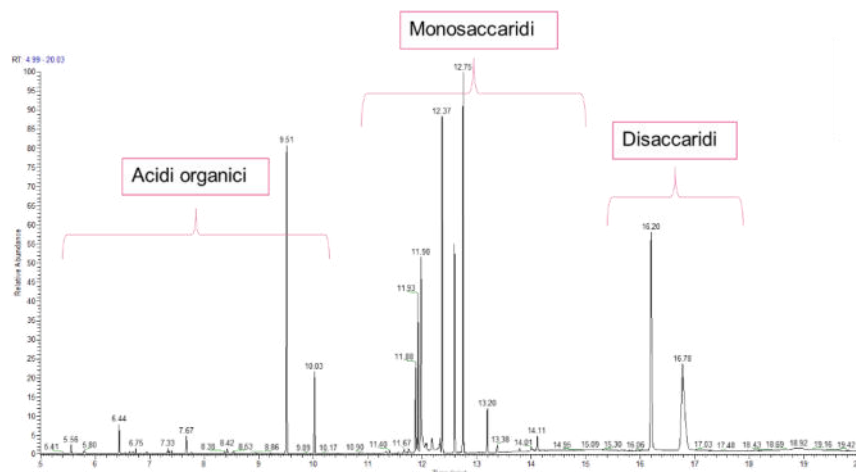
## 4.2 Determinazione del profilo in zuccheri semplici e acidi organici tramite tecnica GC-MS

### Materiali e metodi

Ai fini di caratterizzare il profilo in zuccheri semplici e acidi organici dei campioni in esame, è stato applicato lo stesso metodo descritto nella Relazione intermedia. Brevemente, per ciascun campione è stata misurata la percentuale di sostanza secca (misurata in grado Brix tramite un rifrattometro) e quindi si è proceduto con una diluizione dei campioni in modo da portarli ad una concentrazione di 5-10° Brix. Per determinare il profilo in zuccheri semplici (mono- e di-saccaridi) e in acidi organici dei campioni in esame si sono utilizzati 100 mg di campione diluito aggiunto di una soluzione di standard interno ( $\beta$ -fenil-glucoside 500 ppm in 100 mL, per quantificare gli zuccheri presenti e acido glutarico 500 ppm in 100 mL, per quantificare gli acidi organici). Il campione è stato quindi portato a secchezza tramite rotavapor a 35-40°C e quindi derivatizzato con agenti silanizzanti utilizzando 0,6 mL di Esametildisilazano e 0,3 mL di trimetilclorosilano, riscaldando la miscela a 60°C per almeno 30 min. Infine, il campione è analizzato tramite GC-MS, equipaggiato con una colonna capillare DB5-MS, applicando una programmata di temperatura (Cirlini et al. 2009; Cirlini et al. 2020).

### Risultati

Per quanto riguarda il profilo in zuccheri semplici, i risultati sono simili a quanto evidenziato nelle prime fasi della ricerca. La purea di albicocca risulta caratterizzata dalla presenza di monosaccaridi come  $\alpha$ - e  $\beta$ -xilosio,  $\alpha$ - e  $\beta$ -fruttosio (forma furanosidica e piranosidica) e  $\alpha$ - e  $\beta$ -glucosio (forma piranosidica), polialcoli come sorbitolo e mio-inositolo e di-saccaridi come il saccarosio. I componenti maggiormente rappresentativi sono fruttosio, glucosio e saccarosio, come descritto anche in letteratura (Bureau et al. 2009). I primi due sono zuccheri naturalmente presenti nella frutta, mentre il saccarosio, anche se in piccole percentuali può essere anch'esso naturalmente presente nella purea di albicocca, è stato determinato in quanto utilizzato come ingrediente.



**Figura 3.5.** Profilo gas-cromatografico di un campione di purea di albicocca fermentata in cui si nota la contemporanea presenza di acidi organici, zuccheri monosaccaridi e zuccheri disaccaridi.

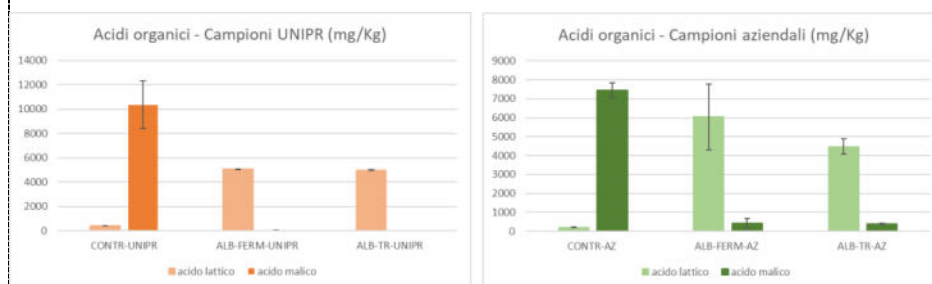
**Tabella 3.13.** Quantità di zuccheri riscontrate nei diversi campioni di purea prodotti presso SITEIA-UNIPR. I risultati sono espressi in ppm (mg/Kg).

(ppm)	CONTR-UNIPR		ALB-FERM-UNIPR		ALB-TR-UNIPR	
		(Dev.St)		(Dev.St)		(Dev.St)
acido malico	10348	1952	57	34	n.d.	
acido lattico	432	2	5072	28	5001	11
$\alpha$ -xilosio	344	62	193	63	217	19
$\beta$ -xilosio	525	156	342	63	342	9
$\alpha$ -fruttofuranosio	9149	1696	7101	518	8749	1386
$\beta$ -fruttofuranosio	14938	2365	12123	295	15472	709
$\beta$ -fruttopiranosio	21276	7415	8796	1493	11318	1363
$\alpha$ -glucopiranosio	37730	5073	26253	3737	30644	1232
sorbitolo	21037	3508	14552	1140	15433	373
$\beta$ -glucopiranosio	44563	6530	36044	1179	39480	638
myo-inositolo	789	206	607	13	643	66
saccarosio	44510	650	84892	952	82603	1383

**Tabella 3.14.** Quantità di zuccheri riscontrate nei diversi campioni di purea prodotti presso l'azienda Punto Verde Bio. I risultati sono espressi in ppm (mg/Kg).

(ppm)	CONTR-AZ (Dev.St)		ALB-FERM-AZ (Dev.St)		ALB-TR-AZ (Dev.St)	
acido malico	7449	386	419	250	395	35
acido lattico	213	16	6045	1737	4463	406
$\alpha$ -xilosio	123	25	140	23	88	13
$\beta$ -xilosio	198	4	209	50	121	24
$\alpha$ -fruttofuranosio	23543	165	17263	3416	18779	6492
$\beta$ -fruttofuranosio	23366	212	22339	4315	17809	4590
$\beta$ -fruttopiranosio	3870	102	9931	7643	2605	956
$\alpha$ -glucopiranosio	36754	856	38811	6495	27022	7183
sorbitolo	31497	381	34666	4837	32608	2622
$\beta$ -glucopiranosio	52553	1573	53912	5467	44608	11844
myo-inositolo	631	6	599	26	712	113
saccarosio	17556	38	12579	46	105750	12988

Tra gli acidi organici, l'attenzione è stata focalizzata sulla presenza di acido malico e acido lattico. Questo al fine di determinare la possibile diminuzione del primo e la formazione del secondo, ad opera dei batteri lattici usati in fase di fermentazione e in grado di convertire l'acido malico in acido lattico. Di seguito si riportano i risultati (Figura 3.6). Si evidenzia come l'acido malico venga consumato dai batteri lattici al fine di produrre acido lattico. Questo andamento è messo in evidenza nei grafici seguenti. Lo stesso andamento si nota sia nei campioni prodotti su piccola scala presso l'università, sia nei campioni prodotti in più larga scala presso l'azienda.



**Figura 3.6.** Quantità di acidi organici nei diversi campioni di purea analizzati. I risultati sono espressi in ppm (mg/Kg).

Inoltre, sia per quanto riguarda il contenuto in acidi organici che per quello in zuccheri semplici, il trattamento termico non sembra influenzare le quantità di questi composti che rimane confrontabile tra il prodotto fermentato e quello successivamente trattato con calore. Per questo motivo e per il fatto che la quantità di zuccheri riducenti totali (determinata con metodo di Fehling) risulta stabile in shelf life, non sono stati effettuati ulteriori approfondimenti.

### 4.3 Determinazione della concentrazione in polifenoli totali e composti antiossidanti tramite tecnica spettrofotometrica UV-Vis

#### Materiali e metodi

Al fine di determinare la quantità totale di polifenoli e di antiossidanti presenti nei campioni di purea di albicocca, sono stati applicati i metodi spettrofotometrici che prevedono l'utilizzo dei reattivi di Folin-Ciocalteu e DPPH. Il protocollo applicato è lo stesso descritto in precedenza.

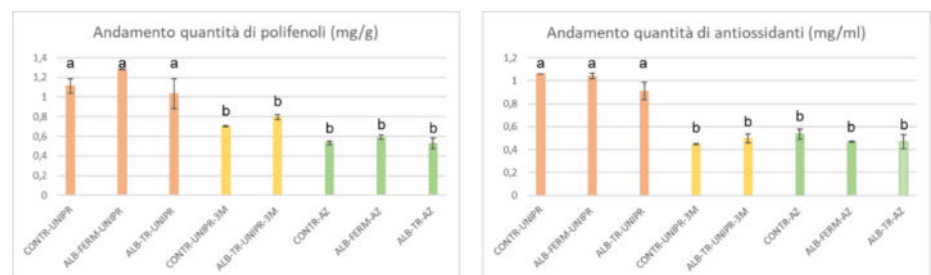
#### Risultati

I risultati ottenuti sono riassunti di seguito.

**Tabella 3.15.** *Quantità di polifenoli totali (mg/g) antiossidanti (mg/g) nei campioni in esame.*

	Polifenoli totali (mg/g)	Dev.St.	Antiossidanti – DPPH (mg/g)	Dev.St.
CONTR-UNIPR	1,11	0,07	1,06	0,00
ALB-FERM-UNIPR	1,28	0,00	1,04	0,02
ALB-TR-UNIPR	1,03	0,15	0,91	0,08
CONTR-UNIPR-3M	0,70	0,01	0,45	0,00
ALB-TR-UNIPR-3M	0,80	0,02	0,50	0,04
CONTR-AZ	0,53	0,02	0,53	0,04
ALB-FERM-AZ	0,59	0,02	0,47	0,01
ALB-TR-AZ	0,53	0,06	0,47	0,06

Si può notare come le fasi di fermentazione e di trattamento termico non vadano a modificare il contenuto iniziale di polifenoli e antiossidanti naturalmente presenti nella purea di albicocca. I campioni analizzati dopo 3 mesi di shelf life presentano un lieve calo rispetto al contenuto iniziale. Questo è un fenomeno naturale che solitamente avviene nel tempo nelle conserve di frutta come i succhi, così come anche nella frutta fresca (Matthes & Schmitz-Eiberger, 2009). I polifenoli, essendo antiossidanti, svolgono la loro naturale azione nel tempo, andando a contrastare quelli che sono i normali fenoli di ossidazione. E' quindi plausibile aspettarsi una leggera diminuzione di questi composti nel tempo, messa in evidenza dall'analisi statistica dei dati (anova a una via). L'andamento è meglio rappresentato nei grafici che seguono. Un andamento del tutto analogo è stato osservato per la quantità di componenti antiossidanti, determinati tramite il test del DPPH. Interessante notare come il comportamento dei campioni analizzati dopo 3 mesi di conservazione sia simile, confrontando il campione di controllo e quello fermentato e trattato termicamente. Questo dimostra ancora una volta che non sono i trattamenti tecnologici applicati sul prodotto a modificare quello che è il contenuto di polifenoli e antiossidanti.



**Figura 3.7.** *Andamento delle quantità di polifenoli e antiossidanti nei campioni analizzati (mg/g).*

Dal momento che le concentrazioni in polifenoli e antiossidanti risultano confrontabili tra campione di controllo e campione sottoposto a trattamenti tecnologici e che si evidenzia un comportamento analogo nel tempo, le ulteriori indagini che hanno come scopo quello di caratterizzare il profilo in polifenoli, al fine di determinarne la natura, sono state eseguite sui campioni prodotti al tempo zero.

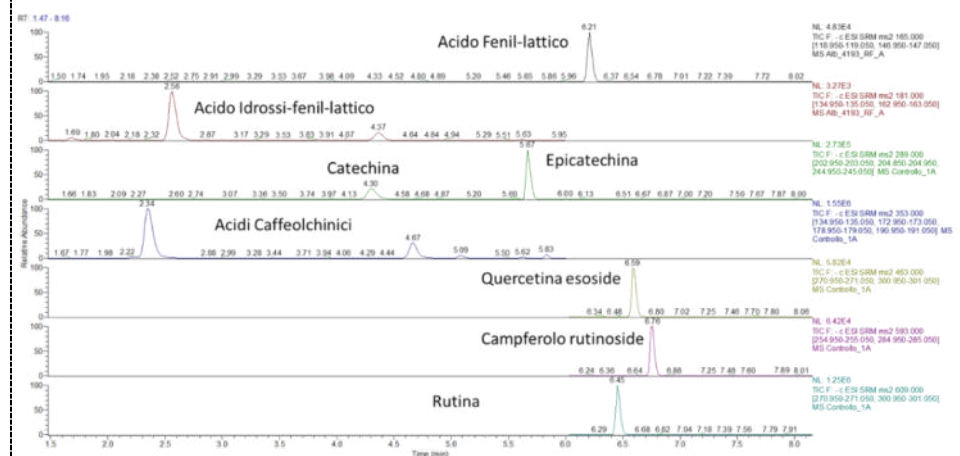
#### 4.4 Determinazione del profilo polifenolico tramite cromatografia liquida associata a spettrometria di massa tandem (UHPLC-MS/MS)

##### Materiali e Metodi

Al fine di caratterizzare il profilo in composti fenolici della purea di albicocca, è stata utilizzata la tecnica UHPLC-MS/MS che permette la contemporanea determinazione qualitativa e quantitativa dei componenti presenti, utilizzando opportuni standard di riferimento (Ricci et al. 2019). In particolare, i campioni di purea di albicocca sono stati trattati con una miscela di metanolo/acqua (70/30), quindi addizionati di acido formico e analizzati tramite UHPLC-MS/MS. I composti di interesse sono stati separati su di una colonna cromatografica con fase stazionaria RP-C<sub>18</sub> utilizzando come eluenti acqua bidistillata e metanolo, entrambi acidificati con acido formico. Per la rivelazione, è stato utilizzato uno spettrometro di massa equipaggiato con una sorgente di tipo “elettro-spray” (ESI) e un analizzatore a triplo quadrupolo, monitorando i composti di interesse in modalità SRM (Single Reaction Monitoring), in modalità negativa.

##### Risultati

La caratterizzazione eseguita tramite tecnica UHPLC-MS/MS ha permesso di rilevare la presenza di: catechina, epicatechina, acidi caffeoilchinici (3 forme isomeriche), quercetina esoside, campferolo rutoside e rutina. Tutti questi composti sono caratteristici dell'albicocca (Dragovic-Uzelac et al. 2005). Inoltre, è interessante sottolineare la presenza di due composti fenolici derivati dalla fermentazione, riscontrati nel prodotto fermentato e in quello trattato termicamente: acido fenil-lattico e acido idrossifenil-lattico. Questi composti, derivanti dal metabolismo dell'ammino acido fenilalanina ad opera dei batteri lattici, sono interessanti perché presentano proprietà antibatteriche e quindi possono agire come inibitori della crescita di microrganismi indesiderati.



**Figura 3.8.** Profilo cromatografico di un campione di purea di albicocca.

Grazie all'utilizzo di opportuni standard di riferimento, è stato possibile risalire alla concentrazione dei composti identificati.



**Tabella 3.16.** Concentrazione dei diversi polifenoli identificati (ppm o mg/kg) nei campioni in esame.

	CONTR-UNIPR	ALB-FERM-UNIPR	CONTR-AZ	ALB-FERM-AZ
Idrossi-fenil-lattico	nd	0,84 ± 0,08	nd	1,81 ± 0,20
Fenil-lattico	nd	1,90 ± 0,40	nd	4,32 ± 1,21
3-Caffeoilchinico	150,67 ± 6,98	113,77 ± 4,61	64,68 ± 2,20	66,40 ± 3,54
4-Caffeoilchinico	49,95 ± 2,16	47,42 ± 1,68	73,21 ± 1,70	76,05 ± 3,05
5-Caffeoilchinico	2,82 ± 0,19	7,54 ± 1,06	7,68 ± 0,15	7,81 ± 1,86
Catechina	10,52 ± 0,61	2,80 ± 0,15	16,58 ± 0,53	17,61 ± 1,09
Epicatechina	21,72 ± 1,19	1,56 ± 0,17	3,72 ± 0,05	4,13 ± 0,19
Rutina	89,45 ± 3,94	91,60 ± 2,44	70,76 ± 0,63	68,96 ± 1,72
Quercetina esoside	7,25 ± 0,35	11,34 ± 0,19	6,78 ± 0,35	6,93 ± 0,28
Campferolo rutinoside	3,57 ± 0,30	5,34 ± 0,40	3,20 ± 0,19	2,86 ± 0,09

I dati evidenziano come i composti maggiormente rappresentativi della frazione polifenolica della purea di albicocca siano gli acidi caffeoilchinici, la rutina, seguita da catechina ed epicatechina. In generale, si può osservare come le concentrazioni dei diversi polifenoli identificati non cambino tra prodotto non fermentato e prodotto sottoposto a fermentazione. In alcuni casi si hanno delle fluttuazioni che non sono statisticamente significative. La quantità di polifenoli totali e di composti antiossidanti, come illustrato in precedenza, infatti risulta confrontabile. Interessante notare come per il campione prodotto in azienda i dati ottenuti per campione controllo e campione fermentato risultino in linea gli uni con gli altri. Questo è un aspetto importante, in un'ottica di produzione su larga scala.

#### 4.5 Caratterizzazione del profilo aromatico tramite micro-estrazione in fase solida dello spazio di testa e GC-MS (HS-SPME/GC-MS)

La tecnica della micro-estrazione in fase solida dello spazio di testa prevede l'utilizzo di una fibra in materiale polimerico, in grado di adsorbire e trattenere i componenti responsabili dell'aroma di un alimento. I componenti di interesse vengono desorbiti dalla fibra, inserendo questa nell'iniettore di un gas-cromatografo. Vengono quindi separati e analizzati. L'identificazione viene effettuata sulla base degli spettri di massa registrati dallo spettrometro di massa. Inoltre, è possibile associare a ciascun composto aromatico identificato la nota caratteristica grazie all'uso di database specifici (<http://www.thegoodscentscompany.com> e <https://www.flavor.net>). L'utilizzo di uno standard di riferimento permette di semi-quantificare i componenti identificati.

#### Materiali e metodi

Al fine di caratterizzare la componente aromatica dei campioni in esame, viene utilizzata un'aliquota pari 2-3g di campione addizionati di standard interno (5 µl di una soluzione acquosa di toluene; 100ppm in 10ml). L'estrazione viene effettuata a 40°C per 45 min utilizzando una fibra per SPME trifasica (DVB/CAR/PDMS) e le analisi vengono condotte tramite GC-MS su colonna capillare SupelcoWax (Ricci et al. 2018).

#### Risultati

Sono stati identificati 21 composti aromatici differenti, appartenenti a diverse classi chimiche e odorose. Di questi, solamente alcuni risultavano già presenti nei campioni di controllo (10 composti). Lo step di fermentazione ha quindi portato ad un aumento in composti aromatici, creando un aroma maggiormente complesso e ricco in componenti diversi e, allo stesso tempo, ha aumentato la concentrazione di alcuni dei componenti già presenti nei campioni.

**Tabella 3.17:** composti aromatici riscontrati nei campioni e relative note aromatiche.

	TR (min)	Nome	Nota aromatica
1	10,42	Acetoin	Burro, cremoso
2	14,53	Acetic acid	Acido
3	16,15	1,2-Ethanediol, diacetate	Vegetale
4	16,18	Benzaldehyde	Mandorla
5	17,08	Linalool	Floreale, lavanda
6	17,68	Acetol	Dolce
7	18,68	Butanedioldiacetate	(non identificata)
8	19,87	2-methyl-butyric acid	Fruttato
9	20,52	$\alpha$ -Terpineol	Oleoso, anice, menta
10	21,03	Citrol	Floreale
11	21,72	Citrol acetate	Floreale
12	22,79	Citrol isomer	Floreale
13	22,98	Acetic acid, 2-phenylethyl ester	Miele
14	23,79	Citrol isomer	Floreale
15	24,31	Benzyl alcohol	Floreale, dolce
16	24,66	Geranyl isobutyrate	Floreale
17	25,05	Octalactone	Coco
18	27,16	$\alpha$ -Terpineol isomer	Oleoso, anice, menta
19	28,01	(terpene)	(non identificata)
20	28,31	Glycerol diacetate	Alcolico
21	29,53	Decalactone	Grasso, pesca

I composti evidenziati in blu sono quelli non presenti nei campioni di controllo e quindi derivanti dalla fermentazione lattica. Si può quindi affermare che la fermentazione dovrebbe conferire prevalentemente note dolci e floreali al prodotto. Questo è un aspetto importante, dal momento che il prodotto fermentato viene preparato andando a ridurre il contenuto in zuccheri rispetto alla composta di albicocca normalmente prodotta dalle aziende partner. La fermentazione potrebbe quindi compensare le note dolci, venute meno diminuendo lo zucchero. Per confermare, è necessaria la valutazione sensoriale.

Di seguito si riportano le concentrazioni dei differenti composti aromatici identificati.

**Tabella 3.18.** concentrazione dei diversi composti aromatici identificati (ng/g) nei campioni in esame.

	CONTR UNIPR	CONTR AZ	FERM UNIPR	FERM AZ
Acetoin			19,37± 3,39	8,06± 1,67
Acetic acid	5,87± 1,70	8,27± 0,83	39,90± 3,61	14,37± 2,47
1,2-Ethanediol, diacetate			190,80± 28,61	78,75± 73,02
Benzaldehyde	9,31± 11,19	25,13± 2,51	212,02± 10,00	85,21± 69,66
Linalool	510,14± 140,29	311,74± 31,17	518,92± 12,30	315,81± 66,03
Acetol			86,43± 19,39	2,76± 0,21
Butanedioldiacetate			35,89± 9,25	9,91± 0,53
2-methyl-butyric acid	0,38± 0,93	1,69± 0,17	2,05± 0,19	1,58± 0,05
$\alpha$ -Terpineol	79,17± 1,48	77,07± 7,71	110,67± 27,65	92,9± 9,06
Citrol			3,10± 1,35	0,94± 0,05
Citrol acetate			5,10± 1,68	0,85± 0,28
Citrol isomer	7,38± 1,15	5,76± 0,58	11,18± 2,69	6,97± 1,71
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	42,14± 4,30	36,06± 3,61	74,79± 17,11	40,07± 6,64
Citrol isomer	18,28± 1,79	15,75± 1,57	29,73± 6,86	18,48± 3,25
Benzyl alcohol	0,88± 0,72	1,91± 0,19	6,26± 2,31	7,67± 0,76
Geranyl isobutyrate			8,23± 2,83	0,98± 0,26
Octalactone			7,39± 2,15	1,26± 0,30
$\alpha$ -Terpineol isomer			4,15± 0,26	
(terpene)	0,45± 0,19	0,71± 0,07	3,88± 0,65	0,91± 0,16
Glycerol diacetate			157,57± 63,10	18,12± 5,09
Decalactone			82,74± 24,62	11,67± 2,76

In **Tabella 3.18** è possibile notare come la fermentazione contribuisca a rendere maggiormente complesso il profilo aromatico della purea di albicocca producendo diversi composti ex-novo, ma anche incrementandone alcuni già presenti nel prodotto iniziale. Un esempio è sicuramente quello della benzaldeide, dalle caratteristiche note di mandorla, prodotta dal metabolismo batterico della fenilalanina.

## 5. Fase aggiuntiva: Prove di fermentazione in bagnetto e *sous-vide*

Come definito da progetto, l'azione 4 prevedeva il trasferimento tecnologico e la produzione di prototipi fermentati. A tal scopo, mentre nell'azienda agricola Sara Vespignani (Corte San Ruffillo), era già presente l'attrezzatura necessaria per condurre il processo fermentativo, nell'azienda agricola Punto Verde Bio era necessario l'acquisto di uno strumento che potesse essere adibito a questa fase. L'azienda aveva proposto l'acquisto di un bagnetto termostato dove far avvenire il processo fermentativo. Avendo effettuato in laboratorio tutti le fermentazioni in una stufa termostata era necessario testare questa nuova condizione prima di effettuare lo *scale-up* aziendale. Inoltre, l'azienda era interessata a capire se la fermentazione potesse essere condotta sia in vasetti che in sacchi sottovuoto, ottenendo i medesimi risultati. Pertanto, a tal scopo sono state allestite due prove sperimentali.

### Materiali e metodi

Sono state allestite due prove distinte, dettagliate di seguito:

#### **Prova 1. Fermentazione in bottiglia**

#### **Prova 2. Fermentazione *sous-vide***

Nella prova 1. la fermentazione è stata condotta in bottigliette da 250 mL, mentre nella prova 2. il processo fermentativo è avvenuto in sacchetti sottovuoto.

Subito dopo l'inoculo (T0) e terminata la fermentazione (T48), sono state allestite conte vitali in piastra su terreno elettivo De Man Rogosa and Sharpe Agar (MRS agar), al fine di stimare la carica microbica inoculata e dopo il processo fermentativo.

### Risultati

I risultati ottenuti mostrano un andamento paragonabile per entrambi i processi fermentativi testati. Dopo 48h di fermentazione nella matrice albicocca il ceppo *L. plantarum* 4193 mostra per entrambe le condizioni di fermentazione un incremento di ca. 1,5 Log UFC/g.

Concludendo, è stato possibile affermare che l'attrezzatura poteva essere idonea per le prove in azienda, e il processo fermentativo poteva essere condotto sia in vasetti che in sacchetti sottovuoto, non avendo osservato alcuna differenza nel profilo di crescita.

## 6. Valutazione della *shelf-life* del prodotto fermentato

Al fine di valutare la stabilità e il mantenimento delle caratteristiche organolettiche e nutrizionali nel prodotto fermentato, conservato a temperatura ambiente a seguito di trattamento termico di stabilizzazione, sono stati allestiti degli esperimenti di *shelf-life* a 1 e 3 mesi.

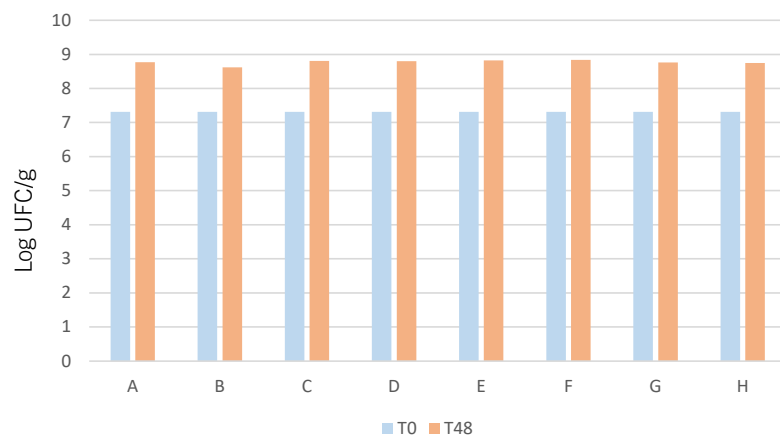
Inizialmente, sono state condotte 8 fermentazioni parallele, al fine di avere diversi campioni da analizzare, utilizzando come matrice la purea di albicocca. Il processo fermentativo è stato condotto, come riportato in precedenza, mediante l'inoculo del ceppo *L. plantarum* 4193 (7 Log UFC/g) seguito da un tempo di fermentazione di 48h a 25°C.

### Materiali e metodi

La carica microbica è stata valutata subito dopo l'inoculo iniziale (T0), per verificare l'effettiva carica inoculata, e alla fine del tempo di incubazione in termostato (T48), attraverso la conta vitale in piastra. I campioni sono stati poi trattati termicamente e conservati a temperatura ambiente. Passato un periodo definito di 1 e 3 mesi, sono state di

nuovo allestite delle conte vitali in piastra, su tre terreni differenti, Plate Count Agar (PCA) (VWR, Radnor, Pennsylvania, Stati Uniti), Yeast Extract-Dextrose-Chloramphenicol Agar (YEDC) (VWR, Radnor, Pennsylvania, Stati Uniti) e MRS agar (VWR, Radnor, Pennsylvania, Stati Uniti) con lo scopo di verificare la stabilità del prodotto. Inoltre, i diversi campioni sono stati valutati anche da un punto di vista organolettico in un panel test ristretto, costituito da 4 panelisti non esperti. Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti.

### Risultati



**Figura 3.9.** Andamento della crescita microbica espressa in Log UFC/g dei diversi fermentati prodotti. I diversi replicati sono stati nominati con lettere differenti.

In **Figura 3.9** è possibile osservare come al T0, la carica microbica è di ca. 7 Log UFC/g. Dopo 48 h di fermentazione a 25°C, viene rilevato, attraverso le conte vitali in piastra un incremento di ca. 2 Log UFC/g.

Successivamente, i campioni fermentati sono stati pastorizzati e analizzati a 1 e 3 mesi, attraverso le conte vitali in piastra. I dati ottenuti mostrano, per entrambi i tempi analizzati, la completa assenza di colonie nella prima diluizione per tutti i terreni analizzati, mostrando, almeno fino a 3 mesi una buona stabilità in termini di conservazione e stabilità. Dal punto di vista sensoriale, i panelisti hanno dichiarato un prodotto estremamente piacevole e particolarmente dolce rispetto al controllo non fermentato.

### **Bibliografia**

Khanizadeh, S., Tsao, R., Rekika, D., Yang, R., Charles, M.T., Rupasinghe, H.P.V. (2008) Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *Journal of Food Composition and Analysis* 21, 396–401.

Kedare & Singh. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* 48(4), 412–422

Nenadis, K., Wang, L.F., Tisimidou, M., Zhang, H.Y. (2004) Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4669-4674

Ricci, A., Cirlini, M., Calani, L., Bernini, V., Neviani, E., Del Rio, D., Galaverna, G., Lazzi, C. (2019). In vitro metabolism of elderberry juice polyphenols by lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, 276, 692–699

Cirlini, M., Caligiani, A., Palla, G. (2009). Formation of glucose and fructose acetates during maturation and ageing of balsamic vinegars. *Food Chemistry*, 112, 51-56.

Cirlini, M., Ricci, A., Galaverna, G., Lazzi, C. (2020). Application of lactic acid fermentation to elderberry juice: Changes in acidic and glucidic fractions. *LWT*, 118, 108779

	<p>Bureau, S., Ruiz, D., Reich, M., Gouble, B., Bertrand, D., Audergon, J.M., Renard, C.M.G.C (2009) Application of ATR-FTIR for a rapid and simultaneous determination of sugars and organic acids in apricot fruit. <i>Food Chemistry</i> 115, 1133–1140</p> <p>Matthes, A., Schmitz-Eiberger, M. (2009) Polyphenol content and antioxidant capacity of apple fruit: effect of cultivar and storage conditions. <i>Journal of Applied Botany and Food Quality</i> 82, 152 – 157</p> <p>Ricci, A., Cirlini, M., Calani, L., Bernini, V., Neviani, E., Del Rio, D., Galaverna, G., Lazzi, C. (2019). In vitro metabolism of elderberry juice polyphenols by lactic acid bacteria. <i>Food Chemistry</i>, 276, 692–699</p> <p>Dragovic-Uzelac, V., Delonga, K., Levaj, B., Djacovic, S., Pospisil, J. (2005) Phenolic Profiles of Raw Apricots, Pumpkins, and Their Purees in the Evaluation of Apricot Nectar and Jam Authenticity. <i>Agric. Food Chem.</i>, 53, 12, 4836–4842</p> <p>Ricci, A., Cirlini, M., Levante, A., Dall’Asta, C., Galaverna, G., Lazzi, C. (2018). Volatile profile of elderberry juice: Effect of lactic acid fermentation using <i>L. plantarum</i>, <i>L. rhamnosus</i> and <i>L. casei</i> strains. <i>Food Res. Int.</i>, 105, 412–422</p>
<p>Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità</p>	<p>Gli obiettivi riguardanti la caratterizzazione chimica e nutrizionale dei prodotti selezionati si possono considerare raggiunti con qualche variazione. In particolare, dal momento che i prodotti e quindi i campioni ottenuti dall’azione 2 erano più dei 5 inizialmente ipotizzati, al fine di capire meglio quale o quali potessero rappresentare il o i prodotti target da portare avanti per lo <i>scale-up</i> industriale, è stato deciso di focalizzare l’attenzione su alcuni parametri chimici, quali: zuccheri riducenti (liberi e totali) e concentrazione di polifenoli e antiossidanti. Sono stati scelti questi parametri dal momento che sono quelli maggiormente influenzati dal processo di fermentazione. La determinazione della quantità di zuccheri riducenti liberi e totali è stata eseguita tramite il metodo di Fehling e non via GC-MS, come indicato nel progetto. Il metodo Fehling permette di risalire alla quantità di zuccheri riducenti liberi e totali tramite un protocollo di facile applicazione, basato su di una titolazione per ossido-riduzione. In questo modo è stato possibile determinare se la fermentazione apportasse delle variazioni alla quantità di zuccheri riducenti.</p> <p>Gli ulteriori obiettivi prefissati, ovvero la caratterizzazione chimica e nutrizionale del prodotto target è stata raggiunta. Sono stati determinati parametri di interesse quali: profilo e concentrazione in zuccheri semplici e acidi organici, concentrazione di polifenoli e composti antiossidanti, profilo in polifenoli e componenti aromatici.</p> <p>Ai fini di caratterizzare al meglio il prodotto, anche in questo caso, è stata eseguita la determinazione della quantità di zuccheri riducenti liberi e totali tramite il metodo di Fehling, prima di passare alla caratterizzazione via GC-MS. In questo modo è stato possibile determinare se la fermentazione e/o il trattamento termico apportassero delle variazioni alla quantità di zuccheri riducenti, coinvolti nella reazione di Maillard, ma è stato utile per capire se il prodotto risultasse stabile durante la shelf life. Dal momento che la quantità degli zuccheri riducenti totali è simile per il prodotto fermentato, quello trattato termicamente e quello analizzato dopo 3 mesi di <i>shelf life</i>, si è ritenuto non necessario indagare eventuali cambiamenti nel profilo degli zuccheri dopo 3 mesi di <i>shelf life</i>. Il profilo in zuccheri e acidi organici è stato quindi determinato per via GC-MS solo sui campioni al tempo zero (controllo, fermentato e trattato termicamente).</p> <p>Al fine di caratterizzare il profilo in zuccheri semplici dei prodotti in esame è stata selezionata e applicata la tecnica GC-MS dal momento che, trattando opportunamente il campione, questa permette di determinare e quantificare contemporaneamente zuccheri semplici e acidi organici. Anche questi ultimi componenti sono stati determinati.</p> <p>Il profilo in polifenoli è stato determinato sui campioni di purea di albicocca controllo e purea fermentata, preparata presso i laboratori SITEIA-UNIPR e presso l’azienda Punto Verde Bio. Non sono stati analizzati in termini di profilo i campioni sottoposti a <i>shelf life</i>. Il motivo risiede nel fatto che i parametri come la quantità di polifenoli totali e di composti antiossidanti erano comparabili mettendo a confronto il campione controllo, con il campione fermentato e quello trattato termicamente. Questo comportamento è stato evidenziato sia per i campioni analizzati dopo la produzione (tempo zero), sia per i campioni analizzati dopo 3 mesi di <i>shelf life</i>. Questi hanno presentato concentrazioni</p>

simili tra loro ma minori rispetto al quantitativo iniziale. Ai fini di determinare il profilo in polifenoli, ovvero indagare sulla composizione molecolare della frazione fenolica, è stato ritenuto opportuno analizzare i campioni relativi al tempo zero, fermentati e non. La caratterizzazione del profilo aromatico è stata effettuata tramite tecnica HS-SPME/GC-MS. I campioni presi in considerazione per questo tipo di caratterizzazione sono stati i campioni controllo e i campioni fermentati, al tempo zero. Si è pensato di focalizzarsi sul contributo dato dalla fermentazione al prodotto. Dal momento che il profilo aromatico non è uno dei parametri fondamentali per la salubrità del prodotto stesso e che possa inficiare la sua stabilità, non sono state effettuate ulteriori analisi su altri campioni.

È stato deciso di valutare la stabilità e il mantenimento delle caratteristiche organolettiche solo nel prodotto target. Le prove di *shelf life* sono state effettuate a distanza di 1 e 3 mesi, dopo la pastorizzazione e la conservazione a temperatura ambiente del prodotto. È stato deciso, in accordo con tutte le aziende partner, di concentrarsi solo su questo tipo di conservazione, in quanto era maggiore l'interesse e la realizzazione per questa tipologia di prodotto.

### Costi personale: Azione 3

Cognome e nome	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Costo orario	Ore	Costo totale
	Prof. Associato	responsabile scientifico	€ 48,00	€ 80,00	€ 3.840,00
	Prof. Ordinario	gestione prove	€ 73,00	€ 70,00	€ 5.110,00
	Assegnista	analisi microbiologiche			€ 21.804,53
	Ricercatore T.D.	gestione analisi chimiche	€ 31,00	€ 100,00	€ 3.100,00
Totale:					€ 33.854,53

### Costi trasferta: Azione 3

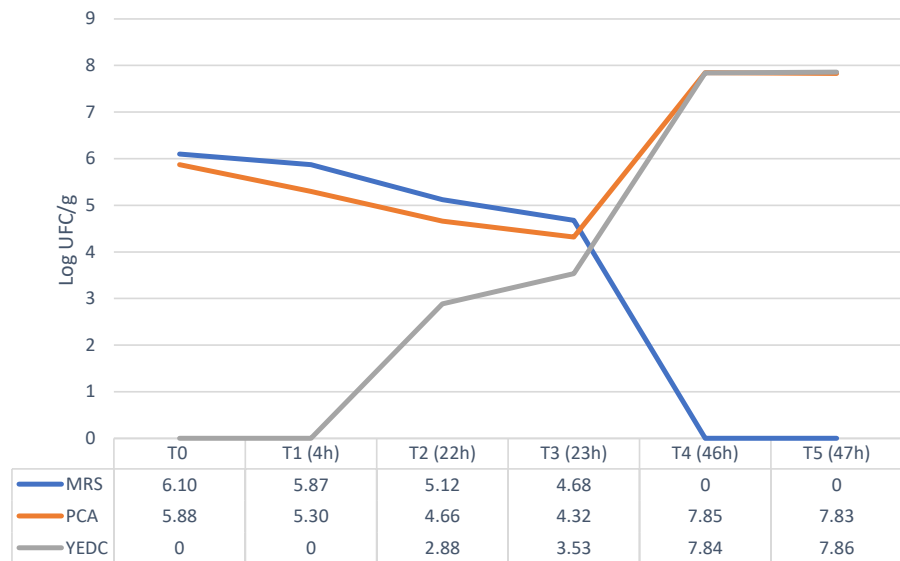
nome e cognome	descrizione	Costo
	Panel test presso azienda partner progetto	€ 47,18
	Duplica - panel test presso azienda partner progetto	€ 47,18
Totale:		€ 94,36

### Costi materiale consumabile: Azione 3

Fornitore	descrizione materiale	Costo
LABOINDUSTRIA - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	PROVETTE CONICHE STERILI 17X120 ML.15 EX T121-2	€ 436,80
INCOFAR - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	R401728S2 MRS AGAR ISO FORMULATION CF 500 g RCM785B M 17 AGAR 500 GR. RCM325B PLATE COUNT AGAR GR.500	€ 5.135,96
LABOINDUSTRIA - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	PROVETTE CONICHE STERILI 17X120 ML.15 EX T121-2	€ 524,16
FAVS DI GNUDIA. E.A. SRL - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	3) Gallic acid monohydrate 398225-100G 4) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl D9132-5G Spedizione Prevista 07/01/22 5) Trolox 238813-1G	€ 487,13
INCOFAR - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	CUVETTE PMMA MACRO 'UV GRADE' ml.4,5 CF.100 PZ.	€ 151,77
FAVS DI GNUDIA. E.A. SRL - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	3) Folin-Ciocalteu ml 500 LOTTO:3541122224 - SCAD.12/24	€ 65,88
Totale:		€ 6.801,70

<b>Azione 4</b>	<b>TRASFERIMENTO TECNOLOGICO E PRODUZIONE DI PROTOTIPI FERMENTATI</b>
Unità aziendale responsabile	SITEIA-UNIPR, Open Fields, Azienda agricola Sara Vespignani, Azienda agricola Punto Verde BIO
Descrizione delle attività	<p style="text-align: center;"><b>1. Scale up aziendale presso Sara Vespignani (Corte San Ruffillo)</b></p> <p>Come riportato in precedenza nella relazione intermedia, la prima prova di <i>scale-up</i> aziendale effettuata presso l'azienda agricola Sara Vespignani (Corte San Ruffillo), utilizzando come matrice la purea di lampone e come <i>starter</i> il ceppo <i>L. plantarum</i> 4932, non era andata a buon fine. Essendo il laboratorio di trasformazione vicino ad una cantina di vinificazione, tutti i campioni prelevati ed analizzati presentavano un'alta concentrazione di lieviti contaminanti che aveva preso il sopravvento sullo <i>starter</i>, dando origine ad una fermentazione alcolica piuttosto che una fermentazione lattica. Inoltre, lo <i>starter</i> liquido, impiegato per quella prova, aveva subito un netto decremento in cella frigorifera per una notte raggiungendo una carica di ca. 3 Log UFC/g.</p> <p>Di conseguenza per una seconda prova, era necessario introdurre una serie di accorgimenti per cercare di 'limitare' la crescita e lo sviluppo di questa microflora contaminante e allo stesso tempo mettere a punto uno <i>starter</i> che non perdesse di vitalità.</p> <p>Dopo una riunione con l'azienda partner coinvolta, è stato deciso di provare ad eseguire il processo fermentativo utilizzando lo <i>starter</i> in forma liofilizzata, al fine di velocizzare la fase di inoculo, evitando una serie di passaggi che potevano portare a contaminazione dello stesso da parte di microflora non desiderate.</p> <p><u>Materiali e metodi</u></p> <p>Inizialmente era necessario preparare lo <i>starter</i> di interesse in forma liofilizzata. Non avendo nei nostri laboratori di ricerca un liofilizzatore in grado di mantenere la sterilità, una volta preparato lo <i>starter</i> liofilizzato è stato necessario controllare la purezza dell'isolato. La purezza è stata verificata mediante microscopio ottico e sequenziamento della regione V3-V4 del gene 16S rDNA (Takahashi et al., 2014). Per il sequenziamento il DNA è stato estratto attraverso l'utilizzo di un estrattore automatico Maxwell® RSC, Promega (Madison, Wisconsin, Stati Uniti). Una volta confermata l'identificazione e la purezza dello <i>starter</i> sono state eseguite delle prove di vitalità a distanza di diversi mesi allo scopo di verificare che le <i>performances</i> del ceppo rimanessero invariate anche dopo diversi mesi dalla preparazione.</p> <p>Per la prova di <i>scale-up</i> aziendale, la fermentazione è stata condotta nella purea di lampone inoculando lo <i>starter</i> <i>L. plantarum</i> 4932 liofilizzato, preparato in precedenza. Diversi campioni prelevati sono stati analizzati attraverso le conte vitali in piastra, allestite in tre terreni differenti Plate Count Agar (PCA) (VWR, Radnor, Pennsylvania, Stati Uniti), Yeast Extract-Dextrose-Chloramphenicol Agar (YEDC) (VWR, Radnor, Pennsylvania, Stati Uniti) e MRS agar (VWR, Radnor, Pennsylvania, Stati Uniti). La carica microbica è stata valutata in diversi punti. Le piastre sono state incubate alla temperatura ottimale di crescita delle diverse specie ricercate per 48 h e in seguito la carica microbica è stata calcolata sulla base delle colonie osservate. La concentrazione microbica è stata espressa come Log UFC/g.</p> <p>Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti.</p> <p><u>Risultati</u></p> <p>Nel dicembre 2021 è stata effettuata una seconda prova di <i>scale-up</i> aziendale nel laboratorio di Corte San Ruffillo (Azienda agricola Sara Vespignani). Come definito in precedenza sono stati prelevati diversi campioni, al fine di monitorare l'intero processo fermentativo, e sono state allestite conte vitali in piastra su tre diversi terreni. Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti (<b>Figura 4.1</b>)</p>





**Figura 4.1.** Conta vitale in piastra effettuata sui diversi campioni prelevati durante lo *scale-up* aziendale

Dalle conte effettuate su questi campioni si evince che il ceppo in forma liofilizzata è idoneo e funzionale per lo *scale-up* aziendale. La discrepanza di 1 Log UFC/g che rileviamo rispetto alla concentrazione di inoculo teorica di 7 Log UFC/g potrebbe essere dovuta ad una non corretta omogeneizzazione dell'inoculo nella matrice. Se da un lato la problematica della vitalità dell'inoculo che avevamo nella prima prova di *scale-up* sembra essere risolta, dall'altro i dati mostrano, nonostante i diversi accorgimenti messi in campo dall'azienda, una certa abbondanza di lieviti contaminanti che si inizia a rilevare al T22, e che diventa dominante, sul nostro *starter* di interesse, dopo 48h di fermentazione. Anche in questa prova, i lieviti contaminanti hanno preso il sopravvento dando origine ad una fermentazione alcolica ed il prodotto finito è risultato essere molto diverso da un punto di vista sensoriale rispetto quello atteso.

## 2. *Scale up* aziendale presso Punto Verde Bio (Prodotto Target)

Per la fase di *scale-up* aziendale presso l'azienda agricola Punto Verde Bio la fermentazione è stata condotta in bagno termostato a 25°C per 48 h, inoculando nella purea di albicocca il ceppo *L. plantarum* 4193. Al termine della fermentazione sono stati prelevati diversi campioni, che sono stati analizzati attraverso la conta vitale in piastra.

### Materiali e metodi

Durante il processo fermentativo, sono stati prelevati e analizzati diversi campioni, al fine di monitorare il processo fermentativo e la stabilità dopo il trattamento termico. I diversi campioni analizzati sono riportati di seguito:

**T0 4193:** matrice di partenza inocolata con il ceppo 4193;

**T48 4193 F:** fermentato;

**T48 4193 FB:** fermentato con presenza bolle;

**T48 4193 FB:** fermentato con presenza bolle;

**T448 4932:** fermentato pastorizzato;

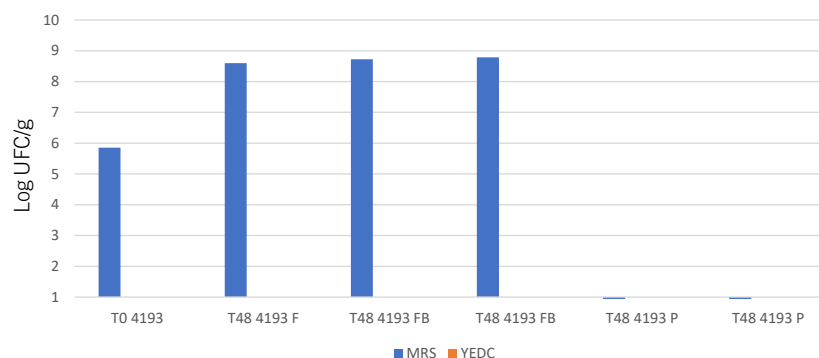
**T48 4932:** fermentato pastorizzato

Tra i campioni prelevati, vi sono due campioni, che secondo l'azienda risultavano essere 'anomali', in quanto presentavano numerose bolle, sviluppatesi dopo la fermentazione.

I diversi campioni sono stati analizzati attraverso le conte vitali in piastra, eseguite su due terreni differenti: YEDC (VWR, Radnor, Pennsylvania, Stati Uniti) e MRS agar (VWR, Radnor, Pennsylvania, Stati Uniti). Attraverso il conteggio delle colonie e la formula della media pesata è stato possibile calcolare le UFC/g, che successivamente sono state convertite in Log UFC/g.

Di seguito nella sezione dei risultati, vengono riportati i dati ottenuti.

#### Risultati



**Figura 4.2.** Conta vitale in piastra effettuata sui diversi campioni prelevati durante lo scale-up aziendale

Dalle conte effettuate su questi campioni si evince che l'inoculo iniziale è leggermente inferiore rispetto a quello teorico di 7 Log UFC/g (**Figura 4.2**). La discrepanza osservata di ca. 1 Log UFC/g potrebbe essere dovuta ad una non corretta omogeneizzazione dell'inoculo nella matrice di interesse. Dopo 48 h di fermentazione a 25°C, il ceppo è in grado di crescere di ca. 2 Log UFC/g, incremento del tutto paragonabile a quello osservato in precedenza in laboratorio. I due campioni consegnati dall'azienda e segnalati come 'anomali', per la presenza di una certa quantità di bolle, in realtà presentano un andamento pressoché paragonabile a quello del campione conforme. I campioni pastorizzati, risultano essere stabili, non mostrando alcuna colonia nella prima diluizione nei diversi terreni testati. Questi campioni sono stati conservati a temperatura ambiente per 3 mesi e analizzati nuovamente, sempre attraverso la conta vitale in piastra. Dai risultati ottenuti si osserva l'assenza di colonie nella prima diluizione nei diversi terreni utilizzati.

I dati ottenuti mostrano che il prodotto, dopo 3 mesi di conservazione a temperatura ambiente, è stabile. L'analisi sensoriale, svolta da un gruppo ristretto di panelisti, riporta una maggior dolcezza e piacevolezza rispetto al controllo non fermentato.

### 3. Etichetta nutrizionale e packaging (Prodotto Target)

Al fine di caratterizzare a pieno il prodotto finito, ottenuto andando a diminuire il contenuto di zuccheri rispetto alla composta normalmente prodotta dalle aziende partner (20% VS 29% di zuccheri), è stata stilata la tabella nutrizionale avvalendosi di metodiche ufficiali, come indicato nell'etichetta stessa di cui si riporta la copia (**Figura 4.3**).

Parametro - Note Parametro Metodo di Prova	U.M.	Risultato I.D.M
Valore energetico*	kJ/100g	369
<i>Reg UE 1169/2011 all. 1 e XIV</i>		
Valore energetico*	kcal/100g	87
<i>Reg UE 1169/2011 all. 1 e XIV</i>		
Grasso	g/100g	<0,4
<i>MP 5C / 2022 Rev 12</i>		
Carboidrati Totali (da calcolo)*	g/100g	20,02
<i>Reg UE 1169/2011 25/10/2011 all. 1 e XIV</i>		
Zuccheri*	g/100g	20,02
<i>Riporti ISTISAN 1996/34 pag 66</i>		
Proteine (N x 6,25)	g/100g	0,82
<i>ISO 16634-2:2016</i>		
Sale (espresso come cloruro di sodio calcolato dal sodio) (da calcolo)	g/100g	0,04
<i>UNI EN 13805:2014 + UNI EN 16943:2017</i>		
Umidità	g/100g	75,7
<i>MP 3C / 2022 Rev. 12</i>		
Ceneri	g/100g	3,70
<i>MP 7C / 2022 Rev 12</i>		
Sodio	mg/100g	17,8
<i>UNI EN 13805:2014 + UNI EN 16943:2017</i>		

**Figura 4.3.** Etichetta nutrizionale del prodotto fermentato a ridotto contenuto in zuccheri.

Nell'etichetta nutrizionale vengono indicati:

- il valore energetico del prodotto;
- il tenore in grassi, i quali risultano praticamente assenti;
- il valore in carboidrati, rappresentato da zuccheri e corrispondete ai valori riscontrati in laboratorio (metodo Fehling);
- il valore in proteine;
- valori di sale e sodio;
- valore in ceneri, comprensivo del contenuto in fibra;
- valore di umidità.

Il prodotto finito è stato sottoposto ad analisi sensoriale, andando a confrontarlo con il prodotto standard che le aziende partner già producevano. Dopo l'assaggio, i partecipanti hanno evidenziato come la composta di albicocca fermentata sia effettivamente diversa dal prodotto standard e, nonostante presenti un contenuto in zuccheri minore, sembri dolce allo stesso modo, se non quasi più dolce. Questo potrebbe essere dovuto alla formazione di composti aromatici dalle note dolci.

Rispetto al **packaging** del prodotto si potranno impiegare sia vasetti di vetro che "pouch" in materiale plastico dal momento che la sperimentazione ha validato la possibilità di effettuare la fermentazione sia in vasetto che in busta sotto vuoto dando origine a risultati del tutto confrontabili.

Bibliografia:

Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., Nishijima, M. (2014) Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. PLoS One. 21, 9(8): e105592.

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità

Gli obiettivi previsti dall'azione 4 sono stati raggiunti. Le numerose prove allestite in laboratorio hanno permesso la creazione di un protocollo per il trasferimento tecnologico semplice e facilmente realizzabile, anche impiegando una strumentazione dal costo contenuto (bagno termostato/Roner). È stato possibile, inoltre, mettere a punto la realizzazione di uno *starter* in forma liofilizzata. È stata portata avanti questa modalità di inoculo, a differenza di quanto si era proposto nel piano di innovazione, in quanto era maggiormente realizzabile e semplice nell'utilizzo aziendale.

Purtroppo per lo *scale up* aziendale effettuato presso l'azienda agricola Sara Vespignani, i diversi accorgimenti messi in atto non sono stati sufficienti a 'limitare' lo sviluppo di lieviti contaminanti. Pertanto crediamo che il processo fermentativo debba essere

allestito in un nuovo laboratorio confinato.

Al contrario, presso l'azienda agricola Punto Verde Bio si è ottenuto il prodotto target, che è stato caratterizzato e di cui è stata ottenuta l'etichetta nutrizionale. Il prodotto è risultato gradevole e paragonabile al fermentato ottenuto su piccola scala (in laboratorio).

## Costi personale: Azione 4

Cognome e nome	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Costo orario	Ore	Costo totale
	impiegato TI / quadro	responsabile organizzativo	€ 27 / € 43	€ 8,00	€ 344,00
	impiegato TI part time 50%	trasferimento tecnologico	€ 27,00	€ 11,50	€ 310,50
	impiegato TI part time 80%	trasferimento tecnologico	€ 27,00	€ 16,00	€ 432,00
	operaio agricolo	prove di produzione fermentati in azienda	€ 19,50	€ 100,00	€ 1.950,00
	Imprenditore agricolo	prove di produzione fermentati in azienda	€ 19,50	€ 40,00	€ 780,00
	operaio agricolo	prove di produzione fermentati in azienda	€ 19,50	€ 68,00	€ 1.326,00
	Imprenditore agricolo	prove di produzione fermentati in azienda	€ 19,50	€ 56,00	€ 1.092,00
	operaio agricolo	prove di produzione fermentati in azienda	€ 19,50	€ 78,00	€ 1.521,00
	operaio agricolo	prove di produzione fermentati in azienda	€ 19,50	€ 60,00	€ 1.170,00
	Prof. Associato	responsabile scientifico	€ 48,00	€ 70,00	€ 3.360,00
	Borsista	analisi microbiologiche			€ 3.190,00
	Prof. Ordinario	supervisione analisi chimiche	€ 73,00	€ 70,00	€ 5.110,00
	Borsista	analisi microbiologiche e chimiche			€ 3.000,00
	Assegnista	analisi microbiologiche			€ 3.964,46
	Borsista	analisi microbiologiche			€ 3.840,00
<b>Totale:</b>					<b>€ 31.389,96</b>

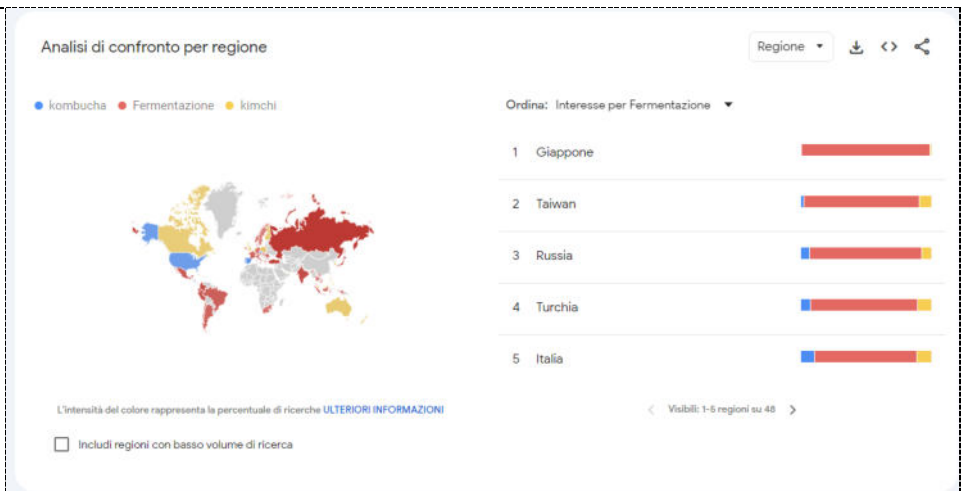
## Costi trasferta: Azione 4

nome e cognome	descrizione	Costo
	Ritiro campioni da analizzare	€ 85,60
	Prove in azienda di produzione di succo fermentato	€ 172,50
	Ritiro campioni per progetto regionale	€ 17,00
<b>Totale:</b>		€ 275,10

## Costi materiale consumabile: Azione 4

Fornitore	descrizione materiale	Costo
BIOSIGMA - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	PIPETTE MON. PS VOL.1ML GRAD.1/100	€ 373,32
BIOSIGMA - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	PIPETTE MON. PS VOL.2ML GRAD.1/100	€ 429,44
BIOSIGMA - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	PIPETTE MON. PS VOL.1ML GRAD.1/100	€ 559,98
BIOSIGMA - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	CLEARLINE SERUM PIPETTE 2ML STERILE	€ 67,10
BIOSIGMA - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	BACCHETTA A FORMA DI "L" STERILE	€ 951,60
VWR - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	1) ACQUA CHROMANORM PER HPLC 2) SPESE DI TRASPORTO	€ 76,49
VWR - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	1) GUANTI NITRILE LIGHT NO POLVERE TG. M 2) SPESE DI TRASPORTO	€ 39,85
VWR - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	1) GUANTI NITRILE LIGHT NO POLVERE TG. S 2) SPESE DI TRASPORTO	€ 26,57
VWR - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	1)  EN COLUMN BP5MS 0.25UM, 30MX 0.25MM I	€ 607,80
VWR - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	CRIMPATRICE X GHIERE DA 20mm	€ 242,66
VWR - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	GUANTI NITRILE LIGHT NO POLVERE TG. M	€ 358,63
VWR - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	1) GUANTI NITRILE LIGHT NO POLVERE TG. S 2) SPESE DI TRASPORTO	€ 272,03
VWR - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA (NOTA CREDITO)	Spese trasporto	-€ 32,94
<b>Totale:</b>		€ 3.972,53

<b>Azione 5</b>	<b>AZIONE 5 – STUDI DI MERCATO E ANALISI DI FATTIBILITA’</b>																						
Unità aziendale responsabile	EcorNaturaSì, Azienda Agricola Ca De Fra’																						
Descrizione delle attività	<p>Scopo dell’Azione è stato quello di mettere fin dall’inizio il progetto in relazione con il mercato, aumentandone le probabilità di successo.</p> <p>Si è pertanto inserito il prodotto – obiettivo nel contesto competitivo attuale, tramite una ricognizione dell’offerta attuale. Ciò ha permesso di inferire, dai benchmark esistenti, informazioni circa il formato preferibile (confezione, grammatura) ed un corretto posizionamento di prezzo.</p> <p>Grazie ai dati di EcorNaturaSì, inoltre, è stato possibile analizzare l’evoluzione recente della domanda per le categorie merceologiche nella quale s’inseriscono gli output del progetto, pur con i necessari caveat dovuti alla “turbolenza” dei mercati nel periodo di osservazione (che comprendono le modificazioni negli acquisti delle famiglie legate all’emergenza covid, alle dinamiche inflazionistiche e alle tensioni internazionali).</p> <p>Infine, pur disponendo di un prodotto ancora in fase di “definizione”, ci si è posti l’obiettivo di indirizzare il suo sviluppo sulla base di un’analisi del concept, condotta mediante somministrazione di questionari a un insieme di consumatori potenziali.</p> <p>A completamento dello studio, si è potuto ragionare sui canali di commercializzazione preferibili e sulle caratteristiche di un possibile conto economico di progetto.</p> <p><b>1. Analisi del contesto di mercato</b></p> <p>A livello mondiale, la domanda dei prodotti fermentati è prevista in aumento (fonte: Business Research Insights), con un ruolo significativo delle bevande e del dolciario.</p> <div data-bbox="523 1160 1457 1664" data-label="Figure"> <table border="1"> <caption>Global Fermented Food and Ingredients Market Size, 2028 (USD Billion)</caption> <thead> <tr> <th>Year</th> <th>Market Size (USD Billion)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>2018</td><td></td></tr> <tr><td>2019</td><td></td></tr> <tr><td>2020</td><td></td></tr> <tr><td>2021</td><td>58.823</td></tr> <tr><td>2022</td><td></td></tr> <tr><td>2023</td><td></td></tr> <tr><td>2024</td><td></td></tr> <tr><td>2025</td><td></td></tr> <tr><td>2026</td><td></td></tr> <tr><td>2027</td><td>91.900</td></tr> </tbody> </table> <p>www.businessresearchinsights.com</p> </div> <p>Del resto, anche fonti “indirette” come Google trends, che analizzano i termini più ricercati dai consumatori, confermano un interesse delle famiglie nei confronti della fermentazione, il cui valore salutistico è crescentemente comunicato.</p> <p>Recenti dati (anno mobile terminante ad ottobre 2022) pubblicati dalla rivista “Food magazine” evidenziano come, sia per le confetture che per i succhi, le versioni fresche, salutari (definite, complessivamente, come “healthy”) siano state in grado di mantenere trend crescenti in periodi di grande complessità ed incertezza per i consumatori, che – pur ponendo l’accento sull’alimentazione come potenziamento della salute – hanno anche introdotto pesanti incertezze sul fronte economico, rendendo erratici e quindi poco prevedibili preferenze e comportamenti.</p>	Year	Market Size (USD Billion)	2018		2019		2020		2021	58.823	2022		2023		2024		2025		2026		2027	91.900
Year	Market Size (USD Billion)																						
2018																							
2019																							
2020																							
2021	58.823																						
2022																							
2023																							
2024																							
2025																							
2026																							
2027	91.900																						



Sui Trend degli ultimi anni pesa, pertanto, la difficile situazione socio-economica, legata, ad esempio, a variabili come:

- prezzi del vetro
- prezzi dell'energia
- disponibilità delle Materie Prime
- incertezza nel consumatore
- tendenze inflattive

Portano, dal lato produttivo ad un aumento dei prezzi e compressione dei margini, e una contrazione dei volumi e frammentazione d'acquisto dal lato dei mercati.

L'analisi degli assortimenti di EcorNaturasi e delle dinamiche di vendita interne (prezzi e volumi) ha portato ad evidenziare alcune possibili linee di sviluppo pilota.

#### A) Succo fermentato

##### Frutti

Mela / Albicocca / Nettarina

Mela + lampone

##### Grammatura

200 -250 ml vetro, ma anche 100/150 considerando l'opzione Doypack, un packaging molto apprezzato per la sua comodità

##### Range di prezzo

1,60 – 2,50 euro al pezzo

8 -12 euro al kg

##### Claim

Focus sul contenuto di zuccheri

Succo e polpa

#### B) Composta

##### Frutti

Nettarina

Lampone

### **Grammatura**

200 -250 grammi

### **Range di prezzo al consumo (al pezzo)**

3,80 – 5,20 € Nettarina

2,80 – 3,10 € Lampone

### **Range di prezzo al consumo (al kg)**

15,00 – 17,50 € Nettarina

17,50 – 20,00 € Lampone

### **Claim**

Focus sul contenuto di zuccheri

«ricco di ...»

## **2. Concept test**

Il concept test condotto ha perseguito due ordini di obiettivi: la comprensione del potenziale di mercato e l'individuazione di spunti per la scelta della gamma di prodotto, dei prezzi e dei canali di commercializzazione.

L'attività è stata condotta mediante un mix di interviste CAWI e PAPI (vale a dire, online e di persona, quindi con modalità mista, per facilitare la somministrazione in diverse occasioni) con 172 rispondenti.

Per la strutturazione del questionario (fornito in appendice al presente documento), si sono considerate le principali determinanti della scelta di acquisto: il sapore e gli aspetti sensoriali - come ad esempio la consistenza - i benefici percepiti per la salute, la comodità di utilizzo – legata, ad esempio, alla grammatura e al tipo di packaging e, naturalmente, il prezzo.

Dall'indagine emerge come la fermentazione possa incrementare la frequenza di acquisto, da parte delle famiglie, di succhi e composte.

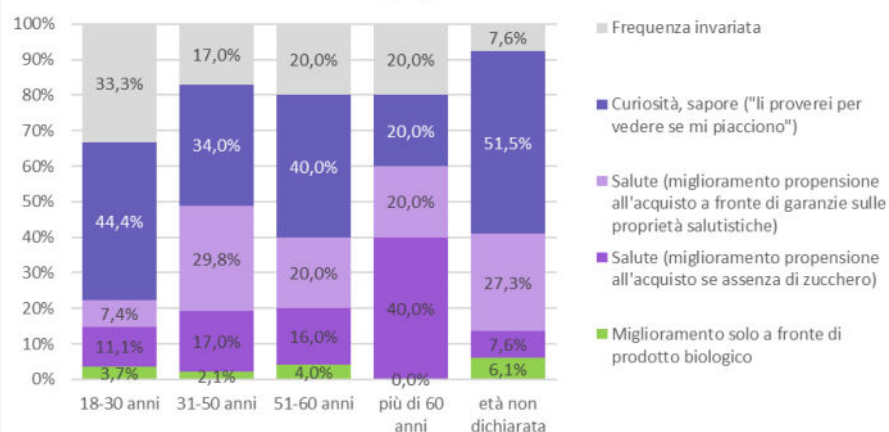
A fronte di un 40% di rispondenti che consuma “spesso” succhi di frutta e composte, è significativo il numero di soggetti che consuma questi prodotti “raramente” (43-44% per entrambe le merceologie) oppure “mai” (16%).

Le ragioni di queste scelte appaiono legate ad un impatto percepito sulla salute, che rende preferibili il consumo di prodotto fresco e/o la preparazione domestica.

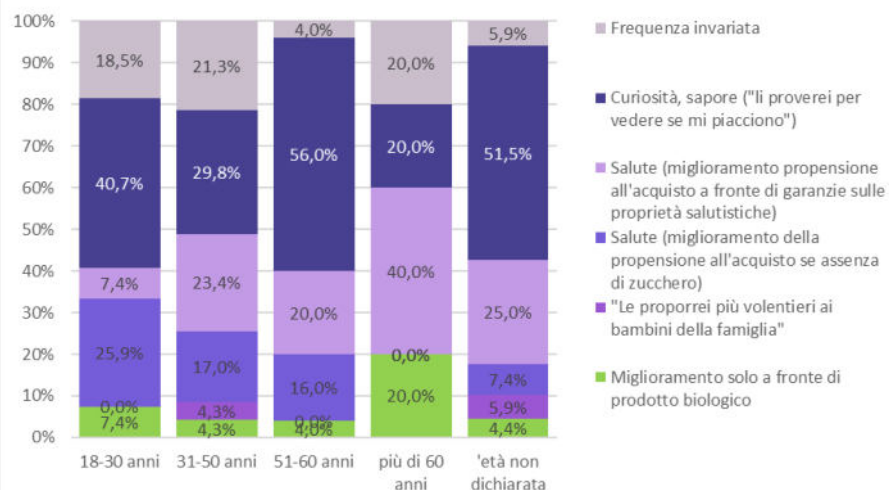
L'introduzione del prodotto fermentato – specie se privo di zucchero e biologico - tende a riequilibrare, nel vissuto dei consumatori, il binomio “sapore- salute”, inducendo l'interesse a provare il prodotto e ad apprezzarne le proprietà salutistiche.



Come cambierebbe la propensione ad acquistare succhi di frutta di fronte alla proposta di succhi fermentati?



Come cambierebbe la sua propensione ad acquistare composte di frutta se fossero proposte, in commercio, delle composte di frutta fermentate?



L'immissione sul mercato di prodotti con le caratteristiche desiderate esercita, pertanto, un effetto favorevole sulla frequenza d'acquisto.

Domanda n. 6 Qualora il prodotto avesse le caratteristiche evidenziate, con quale frequenza acquistereste, per la famiglia, il nuovo succo di frutta fermentato realizzato nel progetto "C'è Fermento"? Le risposte sono articolate per due gusti	Mela	Albicocca
	Più volte la settimana	6.4%
Una volta la settimana	24.6%	25.4%
Due volte al mese	19.3%	27.2%
Una volta al mese o meno	25.7%	19.5%
Lo acquisteremmo solo se biologico	7.0%	10.1%
Non lo acquisteremmo, non amiamo il succo di questo frutto	17.0%	8.9%
<b>Totale complessivo</b>	<b>100.0%</b>	<b>100.0%</b>

Domanda n. 10 [per tutti] Qualora il prodotto avesse le caratteristiche evidenziate, con quale frequenza acquistereste, per la famiglia, la nuova composta di frutta fermentata realizzata	Lampone	Nettarina

nel progetto “C’è Fermento”? Le risposte sono articolate per due ti		
Più volte la settimana	9.36%	8.93%
Una volta la settimana	23.98%	21.43%
Due volte al mese	27.49%	19.05%
Una volta al mese o meno	29.24%	41.67%
Lo acquisteremmo solo se biologico	2.34%	1.79%
Non lo acquisteremmo, non amiamo la composta di questo frutto	7.60%	7.14%
<b>Totale</b>	<b>100.00%</b>	<b>100.00%</b>

Per quanto riguarda gli aspetti sensoriali, dall’indagine è emersa in modo significativo l’esigenza che i nuovi prodotti siano, possibilmente, un po’ più saporiti e profumati rispetto a quelli abituali, che per il resto risultano apprezzati (lo si deduce dal fatto che non siano richiesti particolari miglioramenti, per la nuova produzione, rispetto a variabili come il colore, la densità, la consistenza).



La domanda, posta ad un sottoinsieme di rispondenti, circa il canale di acquisto preferito dei prodotti innovativi del progetto, evidenzia, naturalmente, un ruolo significativo della distribuzione moderna (45-50% delle risposte), con assegnazione, tuttavia, di un ruolo importante anche ai mercati (18-23%) e all’acquisto diretto dal produttore (27-32%).

### 3. Il conto economico di progetto: una catena del valore

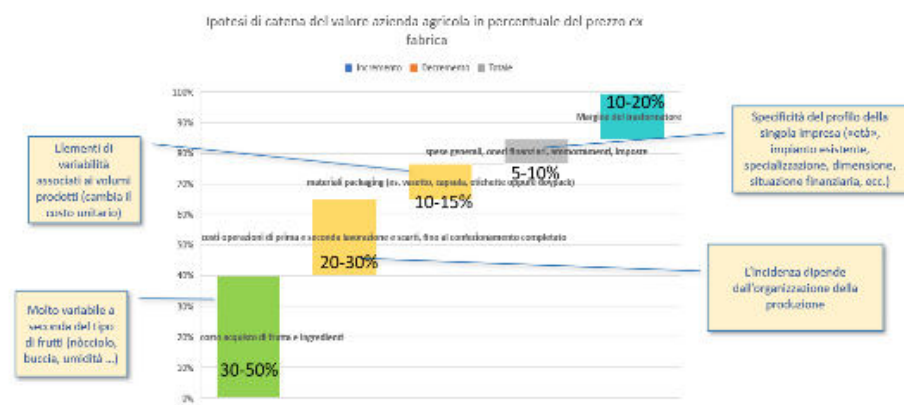
La catena del valore “potenziale” dei prodotti sviluppati nel progetto “C’è Fermento” mostra elevati elementi di variabilità legati a:

- il tipo di frutto trasformato in succo o composta, che può dar luogo a rese diverse - in relazione alla quota di scarto (es., presenza o meno del nocciolo), al diverso grado di umidità – e quindi a costi unitari diversi;
- la dimensione aziendale, che si riflette sui volumi acquistati di diversi input (come ad esempio le confezioni) e quindi sul loro costo unitario, generalmente strettamente collegato alla dimensione dei lotti movimentati;
- l’organizzazione della produzione (ad esempio: maggiore o minore automatismo e quindi labour intensity).

In base alle analisi effettuate da parte del team di progetto, è comunque possibile ipotizzare che l’incidenza maggiore sulla struttura dei costi (che può, ragionevolmente, oscillare in un range tra il 30 ed il 50%) sia da assegnare alla produzione / acquisto di frutta ed

ingredienti (ivi inclusi i ceppi necessari per la fermentazione). Seguono le operazioni di prima e seconda trasformazione, la cui incidenza sui costi può raggiungere il 20%. Considerando il costo delle confezioni e gli oneri generali aziendali (con ampia diversità tra aziende), in una fase iniziale il margine dell'azienda produttrice potrebbe collocarsi tra il 10 ed il 20%, come raffigurato nell'immagine seguente.

### Catena del valore



Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità

Gli obiettivi dell'azione 5 sono stati raggiunti. Non si segnalano criticità.

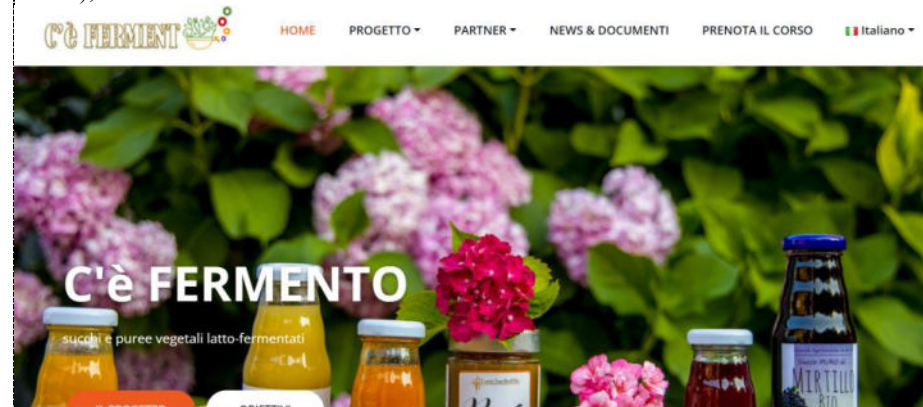
## Costi personale: Azione 5

Cognome e nome	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Costo orario	Ore	Costo totale
	Imprenditore agricolo	indagine sui consumatori	€ 19,50	136,00	€ 2.652,00
	Responsabile area R&D	indagine sui consumatori e di mercato	€ 27,00	120,00	€ 3.240,00
Totale:					€ 5.892,00

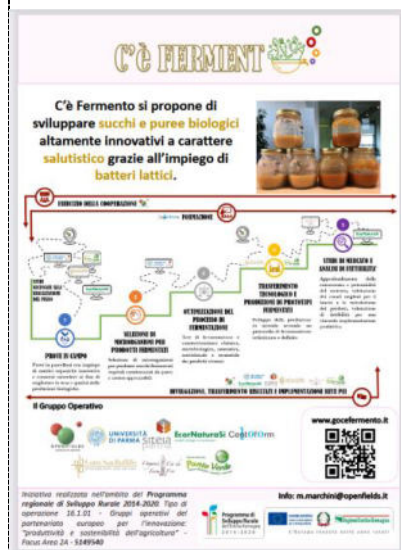
Azione	<b>DIVULGAZIONE</b>
Unità aziendale responsabile	Open Fields Srl.
Descrizione delle attività	<p>Nell'ambito dell'azione divulgazione sono stati realizzati:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>il logo di progetto (Open Fields);</li> </ul>  <p>pagine web sui siti internet dei partner del GO:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li><a href="https://www.openfields.it/progetto/ce-fermento/">https://www.openfields.it/progetto/ce-fermento/</a></li> </ul>

- <https://www.centritecnopolo.unipr.it/siteiaparma/ricerca-e-progetti/progetti/ce-fermento-sviluppo-di-nuovi-prodotti-latto-fermentati-a-base-di-frutta-e-verdura/>
- <https://www.naturasi.it/progetti-finanziati>
- <https://www.puntoverdeonline.com/ce-fermento-openfields/>
- [https://www.cortesanruffillo.it/ce\\_fermento/](https://www.cortesanruffillo.it/ce_fermento/)
- <https://www.agriturismocadefra.com/progetto-ce-fermento/>

il sito web <https://www.gocefermento.it/> in lingua italiana ed inglese. Il sito è stato aggiornato in tempo reale condividendo informative e documenti (a cura di Open Fields);



cartelli descrittivi del progetto per le Aziende partner coinvolte nella somministrazione dei questionari ai consumatori. I cartelli sono stati stampati in formato 70x50 cm (n=4);



un roll-up di progetto (a cura di Open Fields), esibito durante gli eventi divulgativi ed il convegno finale;

**C'è FERMENT**

C'è Fermento si propone di sviluppare **succhi e puree biologici** altamente innovativi a carattere **salutistico** grazie all'impiego di **batteri lattici**.

**Obiettivi specifici**

- Sviluppare protocolli per l'ottenimento di succhi e puree latte-fermentati ed applicarli nelle aziende partner
- Migliorare resa e qualità delle materie prime biologiche attraverso un'adeguata gestione agronomica
- Caratterizzare i prodotti sviluppati per la loro composizione e qualità nutrizionale
- Tramite una analisi di mercato, individuare nuovi canali di commercializzazione e modalità efficaci di comunicazione e valutare la fattibilità dell'innovazione proposta
- Diffondere la sensibilità verso una dieta sana e sostenibile attraverso adeguata formazione e divulgazione

**Il Gruppo Operativo**

UNIVERSITÀ DI PARMA **AREA** **EcoNatureS** **CeFitFirm**

INFORMAZIONI SUL PROGETTO: **PROGETTO DI COMMERCIALIZZAZIONE**

Il progetto è finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Rurali (MIPAF) attraverso il Programma di Sviluppo Rurale (PSR) 2014-2020, Azione 4.1 "Sostegno all'innovazione nelle filiere agroalimentari".

Info: [in.marchini@cefitfirm.it](mailto:in.marchini@cefitfirm.it)

-un articolo sulla rivista Assaggiarmi, free-press sull'enogastronomia emiliana, numero 36 di Dicembre 2021, a cura di Mia Marchini e Silvia Folloni.

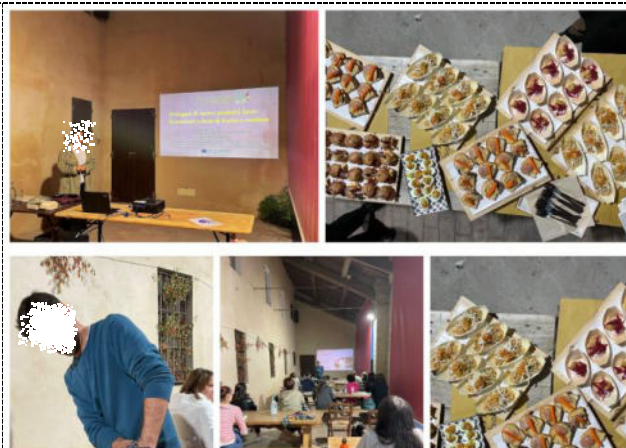
[http://www.assaggiamparma.it/images/assaggiarmi/sfogliabili/36/?fbclid=IwAR20CZzO VHQsNoYDB8gi7LjDgimPbU6cPCwg6Fc-iQSDq-314tx\\_YBIjlpA#p=19](http://www.assaggiamparma.it/images/assaggiarmi/sfogliabili/36/?fbclid=IwAR20CZzO VHQsNoYDB8gi7LjDgimPbU6cPCwg6Fc-iQSDq-314tx_YBIjlpA#p=19)

- presentazione del progetto C'è Fermento presso lo stand di Avenue Media al SANA (pad. 30 SANATECH) – Rassegna Internazionale della Filiera Produttiva del Biologico e del Naturale, tenutasi l'8-10 settembre 2022 a Bologna.



-presentazione della Prof.ssa Camilla Lazzi, responsabile scientifico del progetto, durante il corso “Le fermentazioni in cucina” tenuto dal biologo Flavio Sacco presso l’agriturismo Stuard a Parma il 21 ottobre 2022.





- redazione da parte del gruppo di ricerca in Microbiologia degli Alimenti di UNIPR-SITEIA di un technology report con descrizione del progetto, dei risultati ottenuti e delle diverse applicazioni possibili. Nei technology report i Laboratori della Rete Alta Tecnologia descrivono un caso concreto di collaborazione tra i Laboratori stessi e le imprese, esempi di come la ricerca industriale possa rispondere alle esigenze di innovazione. Per SITEIA è stato scelto il progetto C'è Fermento. Data di pubblicazione 27/02/2023; <https://www.retealtatecnologia.it/technology-report/ce-fermento-sviluppo-di-nuovi-prodotti-latto-fermentati-base-di-frutta-e-verdura>



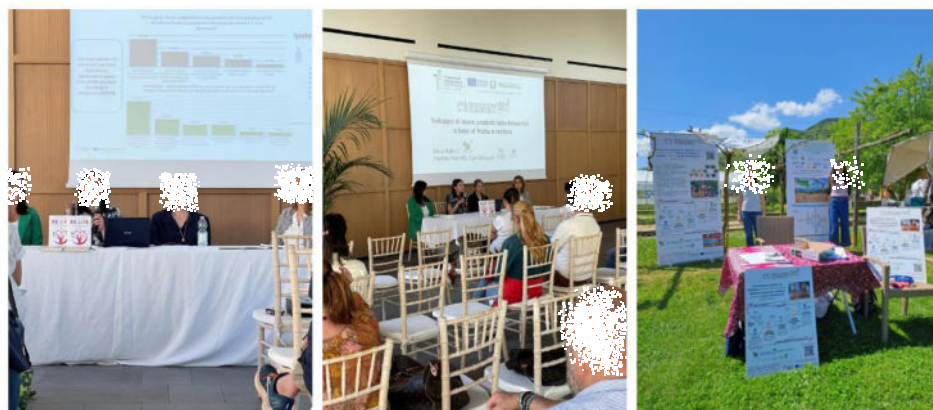
- presentazione del progetto dal gruppo di ricerca in Microbiologia degli Alimenti di UNIPR-SITEIA al MACFRUT 2023 – Fruit & Veg Professional Show tenutosi a Rimini Expo Fiere dal 2 al 5 maggio 2023.



C'è Fermento ha partecipato all'evento "SEMI PIACI - idee verdi in fermento", il 6 e 7 maggio 2023, presso Corte San Ruffillo a Dovadola, partner del progetto. L'evento si è concretizzato in una mostra mercato, laboratori, conferenze e workshop. Il

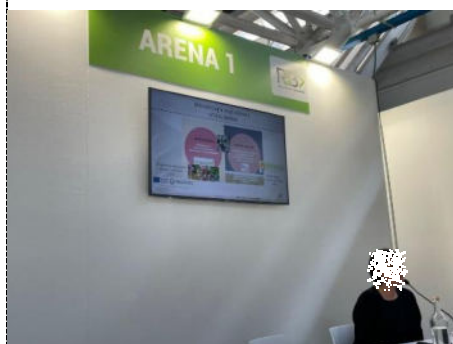
progetto C'è Fermento è stato presentato da Open Fields nell'area della mostra mercato e con un intervento orale durante un convegno dedicato a cibo e salute.

L'evento è stata l'occasione per somministrare il questionario previsto nell'azione 5 alle persone.



C'è Fermento è stato presentato dalla Prof.ssa Camilla Lazzi di SITEIA-UNIPR in occasione dell'iniziativa "R2B – research to business", salone internazionale della ricerca e delle competenze per l'innovazione, svoltosi l'8 e 9 giugno 2023 alle fiere di Bologna.

L'evento è organizzato da ART-ER e Bologna Fiere ed è promosso dalla Regione Emilia-Romagna.



Il progetto ha inoltre collaborato all'organizzazione del Festival "Biodiversità in Fermento" (<https://biodiversitainfermento.it/>), tenutosi il 17 giugno 2023 presso l'Azienda Stuard a Parma.

Questo evento ha radunato per la prima volta in Italia produttori, appassionati ed esperti di alimenti fermentati.

All'organizzazione hanno partecipato Open Fields, SITEIA-UNIPR, EcorNaturaSi e le aziende agricole partner.

Durante la giornata si sono svolti un mercatino di produttori, workshop e seminari gratuiti, laboratori per bambini. C'è Fermento è stato presentato dalla Prof.ssa Lazzi nella mattinata.

Di particolare rilevanza per il progetto C'è Fermento è stata la tavola rotonda con i produttori e con il progetto Europeo PIMENTO (<https://fermentedfoods.eu/>) "Promoting Innovation of ferMENTed fOods" - COST ACTION 2023, dalla quale è emersa la volontà di intraprendere iniziative comuni per l'avanzamento del settore, soprattutto al fine di partecipare attivamente all'adattamento della normativa alimentare per i prodotti fermentati "non classici".



L'evento è stato documentato dalla TV locale TV Parma, il cui servizio è visionabile al link <https://www.12tvparma.it/puntata/tg-parma-edizione-del-28-06-2023-ore-1930/successo-per-la-prima-edizione-del-festival-biodiversita-in-fermento/>

Il 20 giugno 2023 si è tenuto il convegno finale di progetto presso il Centro Santa Elisabetta (Campus) dell'Università di Parma.

Al convegno è intervenuto il Dott. Antonio Totaro, Area Innovazione, Formazione e Consulenza – Direzione Generale Agricoltura, Caccia e Pesca della Regione Emilia-Romagna;

Le presentazioni dei relatori sono state pubblicate sul sito del progetto al link <https://www.gocefermento.it/2023/07/13/convegno-finale-progetto-ce-fermento-2/>



Come indicato nel Piano di Innovazione è stata fatta una ricerca sul web dei GO italiani e stranieri per individuarne alcuni con tematiche affini nell'ottica di trasferirsi reciprocamente le migliori prassi. Dalla ricerca è emerso il carattere di unicità del progetto. Sono stati individuati due GO che hanno applicato la fermentazione con batteri lattici, il primo per l'alimentazione animale ed il secondo per il recupero degli scarti di taglio delle verdure:

1. Innovative technology of fermentation of rapeseed meal as feed for pigs (GO polacco)
2. Valorisation Rest flows Vegetable and Fruit Biorefinery – POP3 (GO olandese)

<https://amsterdamgreencampus.nl/valorisatie-van-restromen-van-groente-en->



	<p><a href="#">fruit/</a></p> <p>Tra questi il secondo presenta alcune caratteristiche di interesse per C'è Fermento quali l'impiego di frutta e verdura, l'impiego nel settore "food", l'impiego di batteri lattici, ed una differenza sostanziale, l'assenza di un pre-trattamento della verdura.</p> <p>Di seguito una sintesi del progetto olandese:</p> <p><i>Nel progetto POP3, Amsterdam Green Campus, insieme ai suoi partner, ha sviluppato una nuova tecnologia brevettata in grado di valorizzare residui derivanti dalla lavorazione di frutta e verdura. I prodotti di scarto di peperoni, broccoli, pomodori e simili sono stati fermentati a temperatura ambiente senza necessità di un pre-trattamento e senza l'aggiunta di acqua o nutrienti. Il processo sviluppato ha permesso di ottenere una polvere verde dal sapore neutro, contenente fibre, vitamine e minerali naturalmente presenti in frutta e verdura, e con un valore aggiunto dato dalla presenza di vitamina B12.</i></p> <p><i>Il prodotto così ottenuto può essere utilizzato per arricchire zuppe, salse, come condimento vegetale o in prodotti sostitutivi della carne a base vegetale. L'unico prerequisito alla base di questa tecnologia di fermentazione è la lavorazione di frutta e verdura fresca. La coltura starter isolata è infatti in grado di gestire bene miscele di diversa composizione, ma permette di ottenere un buon prodotto solamente se la materia prima viene lavorata subito dopo il taglio.</i></p> <p>Molto recentemente sono stati finanziati diversi progetti europei sul tema delle fermentazioni "non classiche" tra questi HealthFerm <a href="https://healthferm.eu/">https://healthferm.eu/</a>, DOMINO <a href="https://www.domino-euproject.eu/">https://www.domino-euproject.eu/</a> ed il progetto PIMENTO <a href="https://fermentedfoods.eu/">https://fermentedfoods.eu/</a> con quest'ultimo i partner di C'è Fermento hanno iniziato a collaborare a partire da una riunione con produttori di alimenti fermentati tenutasi durante il Festival "Biodiversità In Fermento".</p>
<p>Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate</p>	<p>Gli obiettivi sono stati raggiunti.</p> <p>Il Piano di Innovazione prevedeva la realizzazione di n° 2 visite organizzate nei siti sperimentali. Data l'emergenza sanitaria che ha caratterizzato le prime annualità del progetto e la riorganizzazione interna delle aziende partner che ne è derivata, le visite ai siti produttivi non sono state realizzate ma i partner hanno collaborato attivamente alla realizzazione della prima edizione del Festival Biodiversità in Fermento, che ha raccolto l'interesse di produttori e cittadini.</p> <p>In relazione alle spese sostenute per il catering del convegno finale si precisa che nel mese di maggio 2023, in fase di organizzazione del convegno finale di progetto che si sarebbe tenuto il 20 giugno 2023, il fornitore "Dolce e Salato", P.IVA 02670860341, selezionato in fase di presentazione della domanda di sostegno, a causa di difficoltà riscontrate in seguito alla pandemia da COVID-19, aveva cessato l'attività. Open Fields, dopo aver informato l'area Innovazione, formazione e consulenza del Settore Competitività delle imprese e sviluppo dell'innovazione della Regione Emilia-Romagna - Direzione generale agricoltura, caccia e pesca, ed in accordo con lo stesso, essendo ormai trascorsi più di 3 anni dai preventivi originali, ha proceduto a richiedere tre nuovi preventivi e selezionare quello più economico, inviato da Amoretti Milvia, P.IVA IT02901290342. La differenza dell'importo unitario sostenuto rispetto a quanto approvato in sede di domanda di concessione è stata pari a - 1,50 € (13,50 € preventivo in fase di presentazione della domanda di pagamento contro 12,00 € attuali).</p>

## Costi personale: Divulgazione

Cognome e nome	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Costo orario	Ore	Costo totale
	impiegato TI	attività divulgativa	€ 27,00	37,50	€ 1.012,50
	Prof. Associato	responsabile scientifico	€ 48,00	32,00	€ 1.536,00
	Agronomo	attività divulgativa	€ 27,00	40,00	€ 1.080,00
	Imprenditore agricolo	attività divulgativa	€ 36,41	16,00	€ 582,56
	impiegato TI part time 80%	attività divulgativa	€ 27,00	9,00	€ 243,00
	impiegato TI part time 50%	attività divulgativa	€ 27,00	86,00	€ 2.322,00
	Imprenditore agricolo	attività divulgativa	€ 36,41	16,00	€ 582,56
	impiegato TI / quadro	responsabile organizzativo	€ 27 / € 43	119,00	€ 4.093,00
	Responsabile area R&D	attività divulgativa	€ 27,00	40,00	€ 1.080,00
	Imprenditore agricolo	attività divulgativa	€ 36,41	16,00	€ 582,56
Totale:					€ 12.101,68

## Costi trasferta: Divulgazione

nome e cognome	descrizione	Costo
	per attività divulgativa del progetto C'è fermento con Mia Marchini / Divulgazione	€ 100,36
	per attività divulgativa del progetto C'è fermento evento Se Mi Piaci / Divulgazione	€ 155,95
	Partecipazione convegno finale	€ 91,68
	Partecipazione convegno finale	€ 61,49
	Partecipazione convegno finale	€ 149,85
	Incontro partner di progetto per sviluppo prove in impianti	€ 23,20
	Incontro partner di progetto per sviluppo prove in impianti	€ 96,64
	Incontro partner progetto in azienda per prove in impianto	€ 27,43
	Incontro SANA con Open Fields e UNIPR / presso Fiera Sana	€ 88,21
	Festival de la biodiversità / presso Festival de la biodiversità	€ 95,23
	Convegno Finale Parma / presso Convegno Finale Parma	€ 117,82
	<b>Totale:</b>	€ 1.007,86

## Costi materiale consumabile: Divulgazione

Fornitore	descrizione materiale	Costo
- OPEN FIELDS SRL	stampa materiale divulgativo	€ 53,50
- OPEN FIELDS SRL	stampa materiale divulgativo	€ 252,00
- OPEN FIELDS SRL	stampa materiale divulgativo	€ 236,50
- OPEN FIELDS SRL	stampa materiale divulgativo	€ 100,00
- OPEN FIELDS SRL	catering evento finale	€ 900,00
Totale:		€ 1.542,00

Azione	<b>FORMAZIONE</b>
Unità aziendale responsabile	Centoform
Descrizione delle attività	<p>Sono state realizzate due edizioni del corso dal titolo "Tecniche innovative per la trasformazione di prodotti ortofrutticoli"</p> <p>Durante le due edizioni i partecipanti hanno potuto conoscere tecniche innovative per la trasformazione di prodotti ortofrutticoli, tra cui quelle sviluppate nel GO C'è Fermento. Oltre all'apprendimento delle tecniche innovative, il corso ha consentito di acquisire le conoscenze necessarie per trasformare e conservare prodotti orto - frutticoli di qualità in azienda: normative, attrezzature, tecniche di lavorazione, autocontrollo, tipologie di prodotto, etichettatura.</p> <p>Edizione 1 numero 5377231 13 partecipanti Spesa totale 10,052.56 € Contributo richiesto 8.401,12 €</p> <p>Edizione 2 numero 5540001 14 partecipanti Spesa totale 9,334.52 € Contributo richiesto 9.047,36 €</p>
Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate	Gli obiettivi della formazione sono stati pienamente raggiunti.

FORMAZIONE	Costo	
ID PROPOSTA 5521242 - 5377231	€	19.387,08

### 3 - CRITICITÀ INCONTRATE DURANTE LA REALIZZAZIONE DELL'ATTIVITÀ

Lunghezza max 1 pagina

<b>Criticità tecnico-scientifiche</b>	Rispetto al Piano di lavoro iniziale sono state condotte prove aggiuntive per la necessità di adattare il processo alle matrici fornite di volta in volta dalle aziende partner. Queste infatti non si mantenevano costanti per caratteristiche chimico-fisiche (ad es. aspetto, consistenza, colore, umidità).
<b>Criticità gestionali</b> (ad es. difficoltà con i fornitori, nel reperimento delle risorse umane, ecc.)	Il completamento dell'attività formativa ha richiesto tempi più lunghi rispetto a quanto previsto a causa delle restrizioni dovute alla pandemia da COVID-19.
<b>Criticità finanziarie</b>	I partner di diritto privato hanno sostenuto sforzi economici notevoli derivanti dal prolungarsi del progetto molto oltre i tempi inizialmente previsti.

### 4 - RELAZIONE TECNICA

#### 4.1 – Sviluppo di succhi e/o puree latte-fermentati

Il progetto “C'è Fermento”, grazie ad una stretta collaborazione tra il mondo della ricerca e le aziende partner, ha consentito lo sviluppo di un protocollo, a livello sperimentale e aziendale, per l'ottenimento di una composta di albicocca latte-fermentata.

Inizialmente, cinque diverse matrici (mela, albicocca, pesca, lampone e pesca nettarina), provenienti da produzioni certificate biologiche, sono state fornite da due aziende agricole (azienda agricola Sara Vespignani e azienda agricola Punto Verde Bio) operanti sul territorio regionale. I diversi substrati sono stati caratterizzati chimicamente per il contenuto di zuccheri semplici e acidi organici e successivamente sono stati fermentati utilizzando 51 ceppi differenti di batteri lattici, appartenenti alla UPCC (University of Parma Culture Collection), ottenendo 510 prodotti

fermentati. Per ogni purea è stata valutata la crescita microbica associata ad una valutazione organolettica, al fine di selezionare i 5 ceppi migliori per matrice, che sono stati successivamente incrociati, ottenendo un totale di 108 fermentati in co-cultura. La valutazione della crescita microbica associata ad un'analisi sensoriale ha consentito di identificare le 5 co-culture migliori, che insieme alle 5 monoculture, selezionate in precedenza, sono state oggetto di studio per le analisi successive.

Vista l'astringenza e le valutazioni non sempre positive dei diversi panelisti, dopo una riunione di progetto con i partner è stato deciso di aggiungere uno step sperimentale, che prevedeva l'aggiunta di zucchero di canna biologico dopo fermentazione. Dal momento che il mercato è sempre più orientato verso prodotti a ridotto contenuto di zuccheri, è stato necessario definire una soglia minima di zucchero da aggiungere che permettesse di ottenere un prodotto apprezzato dal consumatore ma non eccedente di zuccheri. Da questa soglia minima sono state definite due concentrazioni intermedie ed una concentrazione massima, che era quella già utilizzata dall'azienda. Sono state eseguite prove di crescita microbica e analisi sensoriale su 3 ceppi monocultura che avevano già dato ottime performances, nelle analisi precedenti, dal punto di vista organolettico.

Nelle giornate del 15 e 16 Luglio 2021 si è svolto il panel test a EcorNaturaSì, dove sono stati portati all'assaggio i 4 migliori prodotti fermentati per matrice (2 monoculture e 2 miscele). Oltre ai 4 fermentati è stato assaggiato anche un controllo non fermentato. In generale, i prodotti fermentati sono stati maggiormente apprezzati per colore, densità, fragranza, aroma, dolcezza e intensità del sapore, rispetto al controllo non fermentato.

Oltre alla creazione di un prodotto fermentato buono e a basso contenuto di zuccheri, l'interesse del progetto era incentrato anche sull'aspetto funzionale. Pertanto, i diversi prodotti fermentati assaggiati presso EcorNaturaSì, sono stati caratterizzati per il contenuto in polifenoli totali e attività antiossidante. Purtroppo, per tutti i diversi fermentati analizzati, non è stato osservato alcun incremento rispetto al controllo non fermentato. È stato quindi deciso di ampliare nuovamente lo screening eseguito inizialmente, modificando la matrice iniziale, effettuando delle prove di diluizione e modulazione del pH, e cambiando le condizioni di fermentazione, al fine di migliorare il profilo di crescita e il profilo nutrizionale. Le diverse prove allestite, hanno consentito di identificare una nuova condizione di fermentazione, nella purea di albicocca, che ha permesso di osservare un incremento di ca. 1,5 Log UFC/g dopo 48h di fermentazione. Il prodotto target creato è stato successivamente caratterizzato, per il profilo sensoriale e funzionale. Dal punto di vista sensoriale, sono stati identificati 11 nuovi composti aromatici differenti, appartenenti a diverse classi chimiche e odorose, dato che ha confermato come il processo fermentativo, porti nella purea di albicocca un aroma peculiare, maggiormente complesso e ricco in componenti diversi, producendo sia diversi composti ex-novo, ma allo stesso tempo incrementandone altri già presenti nel prodotto non fermentato. D'altro canto, la fermentazione non ha apportato alcune differenze significative, in termini di contenuto di polifenoli totali e attività antiossidante. Tuttavia, la caratterizzazione eseguita tramite tecnica UHPLC-MS/MS ha permesso di rilevare la presenza di: catechina, epicatechina, acidi caffeoilchinici (3 forme isomeriche), quercetina esoside, campferolo rutoside e rutina, composti caratteristici dell'albicocca, ma anche di due composti fenolici, quali acido fenil-lattico e acido idrossifenil-lattico, composti interessanti, in quanto, come ampiamente riportato in letteratura, presentano proprietà antibatteriche fungendo da inibitori della crescita di microrganismi indesiderati (Figura 1).

VOLATILE PROFILE ↑

- Enrichment of aroma compound profile in fermented products
  - Acetoin, acetol, Glycerol diacetate, Decalactone  
Sweet, buttery, alcoholic, peach notes

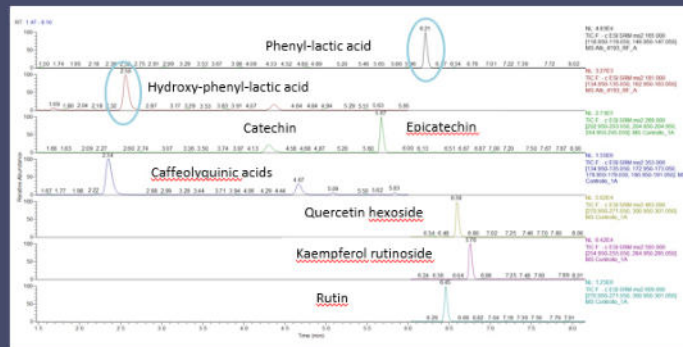
TOTAL POLIPHENOL  
CONTENT AND  
ANTIOXIDANT ACTIVITY



No differences between Fermented and Control

### INTERESTING COMPOUNDS

Antimicrobial  
compounds (Phenyl-  
lactic acid and hydroxy-  
phenyl-lactic acid), are  
present in the  
fermented samples



**Figura 1.** Caratterizzazione chimica del prodotto target

Il processo per la creazione del prodotto target realizzato in laboratorio è stato trasferito presso le realtà aziendali, grazie a prove di scale up aziendale. Le prime prove sono state eseguite presso l'azienda agricola Sara Vespignani, utilizzando come matrice il lampone, un piccolo frutto di interesse per l'azienda. Nelle prove effettuate da questa azienda i lieviti contaminanti hanno preso il sopravvento dando origine ad una fermentazione alcolica ed il prodotto finito è risultato essere molto diverso da un punto di vista sensoriale rispetto quello atteso. D'altro canto, presso l'azienda agricola Punto Verde Bio, utilizzando come matrice la purea di albicocca, è stata ottenuta una composta fermentata molto simile al prodotto ottenuto in laboratorio. Il prodotto è stato caratterizzato chimicamente da un punto di vista sensoriale e funzionale, e i dati ottenuti erano del tutto in linea e paragonabili a quelli ottenuti per il prodotto target prodotto da UNIPR-SITEIA. Pertanto, la creazione di un protocollo, semplice e facilmente attuabile da parte delle aziende, ha permesso la realizzazione di un prototipo aziendale, stabile a temperatura ambiente almeno fino a 3 mesi (Figura 2). Il prodotto target ha mostrato un profilo sensoriale particolarmente apprezzato dal consumatore, risultando altrettanto dolce, se non di più, rispetto alla purea non fermentata, pur contenendo una percentuale di zuccheri minore. Questo risultato porta a supporre che si potrebbero produrre puree fermentate con un tenore di zucchero aggiunto notevolmente inferiore, aumentando il valore salutistico del prodotto.



**Figura 2. Trasferimento tecnologico**

La purea biologica fermentata potrebbe dunque contribuire in modo positivo all'evoluzione del prodotto biologico verso nuove referenze sempre più orientate alla salute e all'innovazione e permettere la diffusione di prodotti della trasformazione ortofrutticola alternativi alle tradizionali composte zuccherine. Anche le indagini di mercato svolte, hanno mostrato come i prodotti risultanti dal progetto C'è Fermento presentino un buon potenziale di successo sul mercato. E' tuttavia importante rinforzarne gli aspetti salutistici, intensificare gli sforzi per accentuare tale connotazione e, in parallelo, costruire uno storytelling robusto ed affidabile intorno ai prodotti. Questo aspetto può essere rafforzato dalla loro commercializzazione in canali più "specializzati" come EcorNaturaSì, il normale trade biologico, i mercati, la vendita diretta. Un altro aspetto fondamentale riguarda il perseguimento di una buona efficienza produttiva, che permetta di mantenere una sufficiente competitività di prezzo.

#### 4.2 - Utilizzo di biostimolanti nelle produzioni frutticole

I biostimolanti sono sostanze e/o microrganismi che, se applicati alla pianta o alla rizosfera, stimolano i processi naturali che migliorano l'efficienza d'assorbimento e d'assimilazione dei nutrienti, aumentano la tolleranza a stress abiotici e la qualità delle produzioni (*European Biostimulants Industry Council*).

Le tipologie di biostimolanti possono variare, da estratti di alghe e altri vegetali a inoculi di funghi micorrizici e batteri, così come i loro effetti che possono riguardare la stimolazione della crescita dei tessuti vegetali, il contrasto agli stress abiotici, il miglioramento dell'efficienza d'uso di acqua e nutrienti.

In particolare i consorzi microbici (es. batteri azotofissatori e funghi micorrizici) hanno dimostrato di essere



molto interessanti per migliorare l'assorbimento dei nutrienti e si integrano con l'uso di altri fertilizzanti.

L'obiettivo della sperimentazione di campo del progetto C'è Fermento è stato quello di verificare l'effetto di biostimolanti microbici in frutticoltura biologica. Per due annualità (2020-2021 e 2021-2022) sono state realizzate attività sperimentali presso le due aziende agricole Sara Vespignani (Corte San Ruffillo – Marzeno di Brisighella, RA) e Punto Verde (Savignano sul Panaro, MO) allo scopo di verificare l'effetto di biostimolanti microbici in frutticoltura biologica.

La sperimentazione ha interessato, presso Punto Verde, un impianto di pere Williams di 14 anni. Nell'impianto il suolo è inerbito tra le file e scalzato sulla fila, l'irrigazione è a goccia. In autunno tutto l'impianto viene fertilizzato con Phenix (concime organico Italtollina). Presso l'Azienda Sara Vespignani, la sperimentazione ha riguardato un impianto di nettarine var. Alma di 12 anni. Nell'impianto il suolo è inerbito tra le file e scalzato sulla fila, l'irrigazione è a goccia. In autunno tutto l'impianto viene fertilizzato Letame maturo aziendale (100 q.li/ha).

In base ad una ricerca sui prodotti presenti sul mercato, sono stati selezionati 2 consorzi microbici commerciali tra quelli più utilizzati: i) *Ceres Biotics (Simbiotik Npk - Nutribio N)*, ammendante organico semplice non compostato costituito da **micorrize (2%) e batteri della rizosfera azotofissatori** (*Azotobacter salinestris* ceppo CECT 9690; *Bacillus megaterium* (CB1802 strain). ii) *MICOSAT (Centro Colture Sperimentali)* costituito da micorrize vescicolo-arbuscolari, batteri benefici della rizosfera (*Bacillus* spp BP 79 *Bacillus subtilis* BR62 *Streptomyces* spp SB14 *Streptomyces* spp. SP80), funghi saprofiti (*Trichoderma harzianum* TH01 *Trichoderma* spp TV60) e Lieviti (*Pichia pastoris* PP59) in rapporto di tipo simbiotico con le radici delle piante. In entrambi i campi di sperimentazione sono state individuate 3 parcelle di circa 1.500 mq dove sono stati applicati i protocolli di trattamento riportati in tabella (tesi 1 e 2) ed il controllo che ha seguito la normale gestione aziendale (tesi 3).

Il calendario effettivo dei trattamenti ha rispettato in linea di massima quello descritto dal protocollo anche se per motivi climatici ci sono state delle differenze tra il 2021 e il 2022 (es. nel 2021 la stagione è stata ritardata a causa di temperature sotto la media nei mesi di marzo e aprile).

**Tabella 1. Calendario dei trattamenti**

Azienda Punto verde				Azienda Vespignani			
tesi 1	ceres prodotto	2021	2022	tesi 1	ceres prodotto	2021	2022
1° tratt	simbiotik npk 15 gr + siapton 0,45 lt	03-mag	15-apr	1° tratt	simbiotik npk 15 gr + siapton 0,45 lt	29-mar	12-apr
2° tratt	simbiotik npk 15 gr + siapton 0,45 lt	20-giu	24-mag	2° tratt	simbiotik npk 15 gr + siapton 0,45 lt	14-mag	19-mag
3° tratt	nutribio 7 gr + siapton 0,45 lt	26-lug	18-giu	3° tratt	nutribio 7 gr + siapton 0,45 lt	16-giu	21-giu
tesi 2 micosat				tesi 2 micosat			
1° tratt fogl.	Micosat TAB 0,22 kg + nutribacter 0,75 kg	08-apr	15-apr	1° tratt fogl.	Micosat TAB 0,22 kg + nutribacter 0,75 kg	29-mar	12-apr
2° tratt fert	Micosat F 0,75 kg + nutribacter 0,75 kg	03-mag	30-apr	2° tratt fert	Micosat F 0,75 kg + nutribacter 0,75 kg	19-apr	24-apr
3° tratt fogl.	Micosat TAB 0,22 kg + nutribacter 0,75 kg	14-mag	4-mag	3° tratt fogl.	Micosat TAB 0,22 kg + nutribacter 0,75 kg	01-giu	23-mag
4° tratt fert	Micosat F 0,75 kg + nutribacter 0,75 kg	17-mag	11 mag	4° tratt fert	Micosat F 0,75 kg + nutribacter 0,75 kg	07-giu	30-mag

I rilievi hanno riguardato diversi aspetti, sia con l'obiettivo di valutare gli effetti dei trattamenti sulla fertilità del suolo, sia gli effetti sulla pianta e sulla produttività. In particolare:

- salute del suolo: analisi del terreno nell'area interessata dall'apparato radicale (tessitura, carbonio totale, carbonio organico, azoto disponibile, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O, MgO, SO<sub>3</sub>). Per ogni tesi sono stati raccolti all'inizio del progetto (autunno 2020) e al termine di ogni annualità (autunno 2021 e autunno 2022) campioni di suolo che sono stati analizzati per le principali caratteristiche qualitative presso un laboratorio accreditato.
- stato generale della coltura: vigore vegetativo, malattie;
- qualità e quantità delle produzioni:
  - o Il primo parametro considerato è stata la **produttività** considerando le produzioni totale delle singole tesi (considerando che ogni tesi era composta dallo stesso numero di piante);
  - o Il secondo parametro considerato è stato il contenuto totale di **solidi solubili** misurato mediante analisi rifrattometrica ed i risultati sono stati espressi come °Brix su 20 frutti scelti casualmente dopo la raccolta;
  - o L'ultimo parametro considerato è stato il **calibro** (extra, AAA, AA, A, B) su 100 frutti scelti casualmente dopo la raccolta.

I dati raccolti hanno indicato che, per entrambe le aziende, i terreni risultano ricchi in sostanza organica e ben dotati di tutti gli elementi nutritivi tranne il boro solubile (per entrambe le aziende) ed il fosforo assimilabile (solo per l'azienda Vespignani Sara). Tutti i valori osservati sono compatibili con una gestione biologica di un frutteto. Considerando l'evoluzione dei principali parametri, si può osservare un aumento della sostanza organica, che per Punto Verde è stato in media dal 3,7 al 5%, e per Vespignani Sara dal 3,2 al 4,1%, con la tesi 2 che ha avuto un aumento relativo maggiore delle altre tesi.

**Tabella 2.** Risultati delle analisi del suolo della Tesi 1 (T1), tesi 2 (T2) e Tesi 3 (T3) al tempo zero (2021) e al termine del progetto (2023) per l'azienda Punto Verde.

analisi chimiche varie	T1 2021	T1 2023	T2 2021	T2 2023	T3 2021	T3 2023	Media 2021	Media 2023	
Calcare totale	6,2	6,9	5,2	6,1	5,1	6,6	5,5	6,5	lievemente calcareo
Calcare attivo	2,5	2,3	4,6	2,9	3,6	2,7	3,6	2,6	medio
Carbonio organico	2,49	3,9	1,71	3,2	2,18	3,09	2,1	3,4	
Sostanza organica	4,29	5,2	2,95	5,1	3,76	5,3	3,7	5,2	ben dotato
azoto totale	0,26	0,57	0,22	0,6	0,25	0,58	0,2	0,6	ricco
fosforo assimilabile	77,5	78,3	44	78,9	63	76,9	61,5	78,0	ricco
boro solubile	0,24	0,3	0,2	0,32	0,22	0,33	0,2	0,3	povero
rapporto Carbonio/azoto	9,5	10,8	7,8	10,9	8,6	10,9	8,6	10,9	carezza C
analisi strumentali varie									
Scheletro	0,2	0,2	0,6	0,2	0,3	0,2	0,4	0,2	
Tessitura	Arg-lim		Arg-lim		Arg-lim				Arg-lim
pH	8	8	8	8	8	8	8,0	8,0	alcalino
CSC	27,7	27,1	27,2	27,8	28	27,7	27,6	27,5	eccesso
Cationi									
Calcio Ossido scambiabile	6583	6601	6598	6601	6776	6601	6652,3	6601,0	
Calcio scambiabile	4706	4790	4716	4790	4843	4789	4755,0	4789,7	ben dotato
Magnesio ossido scambiabile	538	583	482	583	488	583	502,7	583,0	
magnesio scambiabile	325	381	291	380	294	380	303,3	380,3	ricco
potassio ossido scambiabile	664	699	502	699	607	699	591,0	699,0	
Prova									
Potassio scambiabile	551	595	416	590	504	588	490,3	591,0	molto ricco
sodio scambiabile	26	31	27	31	25	32	26,0	31,3	
rapporto									
Magnesio/potassio	1,9	2,2	2,3	2,9	1,9	2,4	2,0	2,5	eccesso K
Rapporto Calcio/magnesio	8,8	9,6	9,8	9,6	10	9,6	9,5	9,6	
Rapporto Calcio/potassio	16,7	17,5	22,1	17,5	18,8	17,9	19,2	17,6	

**Tabella 3.** Risultati delle analisi del suolo della Tesi 1 (T1), tesi 2 (T2) e Tesi 3 (T3) al tempo zero (2021) e al termine del progetto (2023) per l'azienda Vespignani Sara.

analisi chimiche varie	T1	T1	T2	T2	T3	T3	Media	Media	
	2021	2023	2021	2023	2021	2023	2021	2023	
Calcare totale	9,6	16,9	12,6	16,4	15,1	15,9	12,4	16,4	mediamente calcareo
Calcare attivo	7,1	7	6,7	7,8	6,9	6,9	6,9	7,2	ricco
Carbonio organico	1,9	2,04	1,74	2,12	1,84	1,8	1,8	2,0	
Sostanza organica	3,28	4,34	3	4,12	3,17	3,98	3,2	4,1	ben dotato
azoto totale	0,18	0,97	0,18	0,67	0,16	0,39	0,2	0,7	ben dotato
fosforo assimilabile	2,8	9,7	6	9,1	8	8,9	5,6	9,2	scarsamente dotato
boro solubile	0,14	0,4	0,16	0,29	0,16	0,26	0,2	0,3	scarsamente dotato
rapporto Carbonio/azoto	10,8	12,9	9,7	12,2	11,3	12,9	10,6	12,7	carenza di azoto
analisi strumentali varie									
Scheletro	0,9	0,4	0,9	0,4	0,5	0,5	0,8	0,4	
tessitura	Arg-lim		Arg-lim		Arg-lim				
pH	8,1	8,3	8,2	8,5	8,1	8,9	8,1	8,6	alcalino
CSC	30,8	31	30	31	30,9	31	30,6	31,0	eccesso
Cationi									
Calcio Ossido scambiabile	7449	7455	7636	7467	7404	7466	7496,3	7462,7	
Calcio scambiabile	5325	5329	5458	5321	5292	5323	5358,3	5324,3	ricco
Magnesio ossido scambiabile	548	578	577	570	568	579	564,3	575,7	
magnesio scambiabile	330	369	348	367	342	367	340,0	367,7	molto ricco
potassio ossido scambiabile	680	745	747	745	725	745	717,3	745,0	

I due anni di sperimentazione sono stati caratterizzati da stagioni primaverili tendenzialmente secche, di conseguenza non sono stati osservati sintomi di malattie fungine in nessuna delle tesi osservate in entrambe le aziende. Anche per quanto riguarda lo stato generale della coltura non si segnalano differenze tra i diversi trattamenti.

Rispetto alla qualità e quantità delle produzioni, per quanto riguarda l'azienda Punto Verde, il 2021 è stato caratterizzato da diverse gelate tardive (aprile 2021, 8 giorni sotto zero), che hanno causato gravi danni alla coltivazione e rese ridotte al minimo (circa 1/10 delle rese abituali). La raccolta è stata effettuata in un unico passaggio il 18 agosto 2021.

Nell'annata 2022 invece non ci sono da segnalare problematiche particolari. La raccolta è stata effettuata il 15 agosto e la resa è stata di circa 40 tonnellate per ettaro, i °brix 14,7 e il 55% dei frutti avevano un calibro maggiore di 60 mm. Nessun parametro mostrava differenze significative tra le diverse tesi.

**Tabella 4.** Dati produttivi 2021 e 2022 - nettarine per le prove presso l'Azienda Sara Vespignani

anno	Resa ton/ha				°brix 50 frutti				% calibro > 60 mm diametro (cat I o extra)			
	tesi 1	tesi 2	Tesi 3	media	tesi 1	tesi 2	Tesi 3	media	tesi 1	tesi 2	Tesi 3	media
	(Nut)	(Mic)	(con)		(Nut)	(Mic)	(con)		(Nut)	(Mic)	(con)	
2021	7,46	8,06	7,86	7,80	17,3	15,5	14,7	15,8	100%	100%	100%	100%
2022	40,33	40,66	39,66	40,22	15,1	14,7	14,1	14,7	73%	53%	40%	55%

Per quanto riguarda l'azienda Vespignani Sara, nel 2021 la raccolta è stata effettuata in 3 passaggi (3, 9 e 18 agosto), le rese sono state in media di 8,5 t/ha, i °brix 14,8 e il 78% avevano un calibro maggiore della categoria A. Nel 2022 la raccolta è stata effettuata il 5, l'11 e il 15 agosto e le rese sono state in media di 6,9 t/ha, i °brix 18,8 e l'89% dei frutti aveva un calibro maggiore della categoria A.

Anche se è possibile notare una tendenza positiva nei risultati produttivi della tesi trattate con biostimolanti, l'unico parametro significativamente differente è risultato essere per la Tesi 1 il grado brix.

**Tabella 5. Dati produttivi 2021 e 2022 - nettarine per le prove presso l'Azienda Sara Vespignani**

anno	Resa ton/ha				brix 100 frutti				calibro > A (%) 100 frutti			
	tesi 1 (Nut)	tesi 2 (Mic)	Tesi 3 (con)	media	tesi 1 (Nut)	tesi 2 (Mic)	Tesi 3 (con)	media	tesi 1 (Nut)	tesi 2 (Mic)	Tesi 3 (con)	media
2021	8,79	8,62	8,20	<b>8,53</b>	15,0	14,4	15,0	<b>14,8</b>	77,3%	82,7%	74,7%	<b>78,2%</b>
2022	7,03	6,84	6,87	<b>6,91</b>	19,4 a	18,4 b	18,6 ab	<b>18,8</b>	92,7%	93,3%	83,3%	<b>89,8%</b>

In generale, le due annate di sperimentazione hanno presentato un'elevata variabilità climatica caratterizzata da gelate tardive e primavere secche, condizioni che hanno causato gravi problemi alle produzioni (specialmente nel 2021 presso l'azienda Punto Verde) e che non sono quelle ideali per l'adesione e lo sviluppo dei consorzi microbici.

Considerando i risultati della sperimentazione nel biennio 2021-2022, l'utilizzo dei due tipi di biostimolanti pur mostrando una tendenza positiva sui principali indici quali-quantitativi, mostravano differenze significative rispetto al controllo solo nel caso dei °Brix nella tesi trattata con il protocollo Ceres nel 2022 presso l'azienda Vespignani Sara. Per quanto riguarda il livello di sostanza organica dei suoli è stato osservato un miglioramento nel biennio oggetto di studio che è sembrato più rilevante per la tesi trattata con il protocollo Ceres.

E' necessario anche aggiungere che l'effetto dell'utilizzo dei biostimolanti risulta più evidente in terreni e coltivazioni in condizioni di stress, diversamente da quello che riguarda i due frutteti oggetto della sperimentazione, ben gestiti e con indici di fertilità elevati. Ulteriori investigazioni dovrebbero essere effettuate sull'utilizzo di consorzi microbici in frutticoltura sia considerando impianti di diversa tipologia sia valutando per esempio altri aspetti come quelli della microbiologia del suolo.

Data 10/09/2024

IL LEGALE RAPPRESENTANTE

Roberto Ranieri